



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

Σχολή: Χημικών Μηχανικών

Τομέας: Ι Χημικών Επιστημών

Εργαστήριο: Ανόργ. και Αναλυτικής Χημείας

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΩΝ

ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΒΙΟΤΟΞΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ

ΣΤΟ ΓΑΛΑ ΚΑΙ ΣΤΟ ΝΕΡΟ

ΣΤΕΦΑΝΟΣ ΚΑΡΑΠΕΤΗΣ

Χημικός ΕΚΠΑ

Msc Ανόργ. Χημ. και Τεχνολογία

ΑΘΗΝΑ 2019

*Η παρούσα διατριβή αφιερώνεται
σε όσους με βοήθησαν να την
ολοκληρώσω*

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ:

Ν. Τζαμτζής, Καθηγητής Ε.Μ.Π.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Ν. Τζαμτζής, Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Σ. Λιοδάκης, Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Δ. Νικολέλης, Καθηγητής ΕΚΠΑ.

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Ν. Τζαμτζής, Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Σ. Λιοδάκης, Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Δ. Νικολέλης, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Ν. Φαρουδάκης, Επ.Καθηγητής ΕΚΠΑ

Κ. Μεθενίτης, Αν.Καθηγητής ΕΚΠΑ

Α. Παππά, Καθηγήτρια ΕΜΠ

Κ. Κορδάτος, Αν. Καθηγητής ΕΜΠ

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ανώτατη Σχολή Χημικών Μηχανικών του Ε.Μ.Πολυτεχνείου δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα. (Ν. 5343/1932, Άρθρο 202)»

Περιεχόμενα

Περίληψη (εκτενής) -----	i
Abstract-----	iii
Πρόλογος-----	v
Εισαγωγή-----	vii
A. Θεωρητικό Μέρος-----	1
Κεφ 1:Εισαγωγή στους αισθητήρες -----	2
1.1.Ορισμός -----	2
1.2.Λειτουργικά χαρακτηριστικά -----	3
1.3.1.Στατικά χαρακτηριστικά-----	3
1.3.2.Δυναμικά χαρακτηριστικά-----	4
1.4.Ταξινόμηση-----	4
Κεφ 2:Βιοαισθητήρες -----	6
2.1.Ορισμός -----	6
2.2.Λειτουργικά χαρακτηριστικά -----	8
2.3.Ταξινόμηση-----	9
2.3.1.Ταξινόμηση με βάση το φυσικό στοιχείο αναγνώρισης (transducer) -----	9
2.3.2.Ταξινόμηση με βάση το χημικό στοιχείο αναγνώρισης (receptor)-----	13
Κεφ 3: Τυπικές εφαρμογές Βιοαισθητήρων γραφενίου και χρυσού-----	16
3.1.Εισαγωγή -----	16
3.2.Εφαρμογές -----	18
3.2.1.Έλεγχος γλυκόζης -----	20
3.2.2.Έλεγχος υπεροξειδίου του υδρογόνου -----	23
3.2.3.Έλεγχος ντοπαμίνης -----	25
3.2.4.Έλεγχος χοληστερόλης-----	26
3.2.5.Έλεγχος κυτοχρώματος c-----	27
3.2.6.Έλεγχος Νικοτιναμίδο-αδενινο-δινουκλεοτιδίου (NADH) -----	28
3.2.7.Έλεγχος DNA -----	28
3.2.8.Έλεγχος βαρέων μετάλλων -----	30
Κεφ 4: Βιβλιογραφική ανασκόπηση στον έλεγχο των τοξινών στο γάλα και στο νερό με βιοαισθητήρες χρυσού και γραφενίου-----	32
4.1.Εισαγωγή -----	32
4.2.Η τοξίνη της Χολέρας -----	33
4.3. Έλεγχος της τοξίνης της Χολέρας στο νερό-----	34
4.4.Η Αφλατοξίνη M1-----	36

4.5.Έλεγχος της Αφλατοξίνης M1 στο γάλα	37
B.Πειραματικό Μέρος	42
Κεφ 5: Ανάπτυξη πρότυπου βιοαισθητήρα γραφενίου/Χαλκού με ακινητοποίηση λιπιδικής μεμβράνης τροποποιημένης με GM1 για τον προσδιορισμό της τοξίνης της Χολέρας στο νερό	43
5.1. Εισαγωγή	43
5.2. Χημικά αντιδραστήρια	43
5.3.Οργανολογία	44
5.4.Κατασκευή βιοαισθητήρα	45
5.4.1.Κατασκευή των φύλλων γραφενίου και εναπόθεση στα φύλλα χαλκού	45
5.4.2. Κατασκευή των λιπιδικών μεμβρανών (BLMs) και ακινητοποίησή τους επάνω στην επιφάνεια των φύλλων γραφενίου/χαλκού	46
5.5.Λειτουργικός έλεγχος του βιοαισθητήρα	47
5.5.1.Προκαταρκτικοί έλεγχοι σε πρότυπα δείγματα	47
5.5.2.Έλεγχος σε πρότυπα δείγματα	49
5.5.3.Έλεγχος σε πραγματικά δείγματα	50
5.6. Συζήτηση αποτελεσμάτων	51
5.7.Συμπεράσματα	52
Κεφ 6: Ανάπτυξη πρότυπου απτοαισθητήρα χρυσού με ακινητοποίηση δενδριμερούς για τον προσδιορισμό της Αφλατοξίνης M1 στο γάλα	53
6.1.Εισαγωγή	53
6.2.Οργανολογία	53
6.3.Χημικά αντιδραστήρια	54
6.4.Κατασκευή του απτοαισθητήρα	54
6.5.Λειτουργικός έλεγχος του απτοαισθητήρα	55
6.5.1. Έλεγχος σε πρότυπα δείγματα	56
6.5.2.Έλεγχος σε δείγματα γάλακτος	57
6.6.Συζήτηση αποτελεσμάτων	59
6.7.Συμπεράσματα	60
Κεφ 7: Ανάπτυξη πρότυπου απτοαισθητήρα χρυσού με ακινητοποίηση Neutravidin/Fe-COOH για τον προσδιορισμό της Αφλατοξίνης M1 στο γάλα	61
7.1.Εισαγωγή	61
7.2. Οργανολογία	61
7.3.Χημικά αντιδραστήρια	62
7.4.Κατασκευή του απτοαισθητήρα	63
7.5.Λειτουργικός έλεγχος του απτοαισθητήρα σε πρότυπα δείγματα	64
7.6.Συζήτηση αποτελεσμάτων	66

7.7.Συμπεράσματα	67
Κεφ 8: Ανάπτυξη πρότυπου απτοαισθητήρα χρυσού με απευθείας ακινητοποίηση του με μερκαπτοεξανόλη για τον προσδιορισμό της Αφλατοξίνης M1 στο γάλα	68
8.1. Εισαγωγή	68
8.2. Οργανολογία	69
8.3. Χημικά αντιδραστήρια	69
8.4. Κατασκευή του απτοαισθητήρα	70
8.5. Λειτουργικός έλεγχος του απτοαισθητήρα σε πρότυπα δείγματα	70
8.6.Συζητηση αποτελεσμάτων	71
8.6.Συμπεράσματα	71
Κεφ 9: Συμπεράσματα-Προοπτικές	73
9.1. Συμπεράσματα	73
9.2. Προοπτικές	78
Γ.Βιβλιογραφία	79
Δ.Παραρτήματα	91
I.Ακρωνύμια	92
II. Τίτλοι Σχημάτων-εικόνων-πινάκων	95
III.Poster σε συνέδριο	98
IV.Δημοσιεύσεις σε διεθνή περιοδικά	99
V. Βιογραφικά στοιχεία Στέφανου Καραπέτη	122

Περίληψη (εκτενής)

Οι βιοαισθητήρες έχουν ένα σημαντικό ρόλο στην επιστήμη της χημικής ανάλυσης κυρίως στο πεδίο των ηλεκτροχημικών μεθόδων. Τα κύρια χαρακτηριστικά των βιοαισθητήρων, που τους τοποθετούν στις πλέον σύγχρονες τεχνικές της χημικής ανάλυσης, είναι η υψηλή ευαισθησία, η μεγάλη εκλεκτικότητα, η γρήγορη απόκριση και η επαναχρησιμότητα. Σε αναλύσεις πραγματικών δειγμάτων κρίνεται επιπλέον ως απαραίτητη μέθοδος αξιολόγησης το ποσοστό της ανάκτησης, δηλαδή η κλασματική διαφορά του σήματος μεταξύ των πραγματικών και των πρότυπων δειγμάτων. Στα πλεονεκτήματα της ανάπτυξης και χρήσης των βιοαισθητήρων για εμπορικούς σκοπούς, εντάσσονται η εύκολη κατασκευή, η φορητότητά τους και το χαμηλό κόστος. Η αναλυτική αξιοπιστία των βιοαισθητήρων είναι παρόμοια με αυτή άλλων πολύ πιο ακριβών μεθόδων της ενόργανης χημικής ανάλυσης. Η εφαρμογή τους στην γρήγορη ανίχνευση τοξινών σε είδη, που καταναλώνουμε στην καθημερινή μας ζωή, είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για την δημόσια υγεία.

Στην παρούσα διατριβή αναπτύχθηκε κατ' αρχήν ένας πρότυπος βιοαισθητήρας ροής (flow injection με ταχύτητα 2 ml/min) για προσδιορισμό της τοξίνης της χολέρας σε υδατικά μικρο-δείγματα (10 μ L ή 20 μ L). Ο βιοαισθητήρας αυτός κατασκευάστηκε με εναπόθεση νανοστιβάδων γραφενίου σε φύλλα χαλκού με ενσωματωμένες λιπιδικές μεμβράνες (BLMs), που τροποποιήθηκαν με φυσικούς υποδοχείς GM1 (receptors). Στον προτεινόμενο βιοαισθητήρα έγινε έλεγχος της αναγεννησιμότητας ανά 6 λεπτά με 10 επιτυχείς αναγεννήσεις (διατήρηση της αρχικής δραστηριότητάς του). Ο έλεγχος του βιοαισθητήρα σε πρότυπα δείγματα νερών λίμνης ήταν επιτυχής και δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές υπό την επίδραση 7 συνηθισμένων παρεμποδιστών που εισήχθησαν σε πρότυπα δείγματα. Το πλέον κατάλληλο περιβάλλον για να γίνουν οι μετρήσεις βρέθηκε να είναι pH=7. Ο βιοαισθητήρας ελέγχθηκε σε ένα δυναμικό εύρος της τοξίνης (10nM-10 μ M) και το όριο ανίχνευσης προσδιορίστηκε σε (LOD=1nM). Στην συνέχεια έγινε μελέτη αυτού του βιοαισθητήρα σε 10 δείγματα πραγματικού νερού λίμνης και υπολογίστηκε το ποσοστό της ανάκτηση σε δύο συγκεντρώσεις της Τοξίνης (Χαμηλή 50 nM και υψηλή 7 μ M). Τα ποσοστά της ανάκτησης που βρέθηκαν είναι αποδεκτά σύμφωνα με τα κριτήρια του ICH2005 για τη καταλληλότητα του βιοαισθητήρα για χρήση σε επαναλαμβανόμενη παρακολούθηση των υδάτων.

Στη συνέχεια αναπτύχθηκαν τρεις πρότυποι απτοαισθητήρες για την ανίχνευση της Αφλατοξίνης (AFM1) στο γάλα.

Ο πρώτος απτοαισθητήρας χωρίς δείκτη (Label-free) κατασκευάστηκε με επιφανειακή εναπόθεση δενδριμερούς (PAMAM-4G) σε ηλεκτρόδιο χρυσού όπου ακινητοποιήθηκε ένα αμινοτροποποιημένο DNA απταμερές (aptamer 1-receptor). Ο απτοαισθητήρας αυτός χρησιμοποιήθηκε ως ηλεκτρόδιο στην ενόργανη μέθοδο ανάλυσης της διηλεκτρικής φασματοσκοπίας (EIS). Έγινε έλεγχος σε πρότυπα δείγματα γάλακτος σε δυναμικό εύρος συγκέντρωσης της τοξίνης (15-120 ng/l) και προσδιορίστηκε το όριο

ανίχνευσης της τοξίνης σε (LOD=8.47 ng/l). Επίσης έγινε έλεγχος σε πραγματικά δείγματα στο ίδιο δυναμικό εύρος με παρόμοιο όριο ανίχνευσης και ανάκτηση (recovery) σήματος μεγαλύτερη από 78%.

Στη συνέχεια κατασκευάστηκε ο δεύτερος απτοαισθητήρας με επιφανειακή εναπόθεση Neutravidin/Fe-COOH και ακινητοποίηση τροποποιημένων απταμερών (aptamer 2-receptor) με βιοτίνη. Ο απτοαισθητήρας αυτός χρησιμοποιήθηκε ως ηλεκτρόδιο στην ενόργανη μέθοδο ανάλυσης της Διαφορικής παλμικής βολταμετρίας (DPV). Έγινε έλεγχος σε πρότυπα δείγματα γάλακτος σε δυναμικό εύρος συγκέντρωσης της τοξίνης (15-120 ng/l) και προσδιορίστηκε το όριο ανίχνευσης της τοξίνης σε (LOD=8,52 ng/l). Ο απτοαισθητήρας αυτός έχει επιπλέον το καινοτόμο στοιχείο του μικρού εργαστηριακού χρόνου κατασκευής (περίπου 3 ώρες).

Τέλος κατασκευάστηκε ο τρίτος απτοαισθητήρας με ακινητοποίηση τροποποιημένου απταμερούς με κυανό του μεθυλίου (receptor) αναμειγμένο με μερκαπτοεξανόλη. Ο απτοαισθητήρας αυτός χρησιμοποιήθηκε ως ηλεκτρόδιο στην ενόργανη μέθοδο ανάλυσης της Διαφορικής παλμικής βολταμετρίας (DPV). Έγινε έλεγχος σε πρότυπα δείγματα γάλακτος σε δυναμικό εύρος συγκέντρωσης της τοξίνης (31.45-3145 ng/l) και βρέθηκε όριο ανίχνευσης της τοξίνης σε (LOD=37.7 ng/l). Ο συγκεκριμένος απτοαισθητήρας παρουσίασε μεγάλες τυπικές αποκλίσεις στις καμπύλες βαθμονόμησης και για αυτό χαρακτηρίστηκε ως αντικείμενο περαιτέρω μελέτης. Όμως το όριο ανίχνευσης είναι συγκρίσιμο με βιβλιογραφικά δεδομένα.

Τα όρια ανίχνευσης (LOD) και των τριών ανωτέρω πρότυπων απτοαισθητήρων, που αναπτύχθηκαν, είναι κάτω από το επιτρεπόμενο όριο τιμών που έχουν ορίσει τόσο η ΕΕ (47 ng/l) όσο και οι ΗΠΑ (471 ng/l) και δύνανται να χαρακτηριστούν κατάλληλοι για την ανίχνευση της Αφλατοξίνης M1 στο γάλα.

Λέξεις κλειδιά: Αφλατοξίνη M1, Τοξίνη της Χολέρας, βιοαισθητήρας, απτοαισθητήρας, Διαφορική παλμική βολταμετρία (DPV), Διηλεκτρική φασματοσκοπία (EIS), σταθεροποιημένες λιπιδικές μεμβράνες (BLMs), γραφένιο, χρυσός

Abstract

The biosensors have important role in science of chemical analysis in the field of electrochemical methods. Their application in rapid detection of toxins in types, we consume in our daily lives, is particularly useful for public health. The main characteristics of evaluation of biosensors is the high sensitivity, high selectivity, the quick response and the reusability. Analysis of the real samples need additionally a method of evaluating the rate of recovery that is the fractional difference of signal between real and simulated samples. The advantages of the use of biosensors are part of the easy construction, portability and low cost. The provision of analytical results of biosensors is similar to that of other far more expensive methods of instrumental chemical analysis.

In this thesis developed a principle flow injection biosensor (velocity at 2 ml/min) for detection of cholera toxin in aqueous fractions of samples (10 μ L or 20 μ L). The biosensor constructed by depositing copper-coated graphene nanoparticles with integrated lipid membranes (BLMs), modified with native GM1 receptors. In the proposed biosensor, regeneration was checked every 6 minutes with 10 successful regenerations retaining its original potency. Control of the biosensor in simulated samples of lake waters was successful and no significant changes were observed under the influence of 7 conventional inhibitors introduced into the samples. The appropriate environment to perform the measurements was set at pH = 7. The biosensor was tested in a dynamic range of the toxin (10nM-10 μ M) and the detection limit was determined to (LOD = 1nM). This biosensor was studied also in 10 samples of real lake water and the recovery rate was calculated at two concentrations of Toxin (Low 50 nM and High 7 μ M). The recovery rates found are acceptable according to the ICH2005 criteria for the suitability of the biosensor for use in repeated water monitoring.

Three standard aptasensors were then developed to detect Aflatoxin (AFM1) in milk. The first Label-free aptasensor was made by surface deposition of dendrimer (PAMAM-4G) on a gold electrode where an amino-transformed aptamer -receptor was immobilized. This aptasensor was used as an electrode in the instrumental analysis of the electrochemical impedance spectroscopy (EIS). Control was performed on simulated milk samples at a dynamic range of toxin concentration (15-120 ng/l) and the toxin detection limit was determined at (LOD = 8.47 ng/l). Also, the aptasensor tested in real samples at the same dynamic range with a similar limit of detection and signal recovery greater than 78%.

The second aptasensor was made by surface deposition of Neutravidin/Fe-COOH on a gold electrode, where a modified aptamer-receptor with biotin was immobilized. This aptasensor was used as an electrode in the instrumental method of Differential Pulse Voltammetry (DPV). Control was performed on simulated milk samples at a dynamic range of toxin concentration (15-120 ng / l) and the toxin limit of detection was

determined at (LOD = 8.52 ng / l). This aptasensor also has the innovative element of the small laboratory manufacturing time (about 3 hours).

Finally, an aptasensor was constructed by immobilizing modified aptamer with methylene blue (receptor) that mixed with mercaptohexanol. This sensor was used as an electrode in the instrumental method of Differential Pulse Voltammetry (DPV). Control was performed on simulated milk samples at a dynamic range of toxin concentration (31.45-3145 ng / l) and a limit of detection of the toxin in (LOD = 37.7 ng/l) was found. This particular aptasensor exhibited large standard deviations in the calibration curves and was therefore characterized as a subject of further study. However, the limit of detection is comparable to past data.

The limits of detection (LODs) in the three aptasensors are below the permitted limit either in the EU (47 ng / l) or in the USA (472 ng / l) and can be qualified as good aptasensors in a detection of Aflatoxin M1 in milk.

Keywords: Aflatoxin (AFM1), Cholera toxin, Biosensor, Aptasensor, Differential pulse voltammetry (DPV), Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS), cyclic voltammetry (CV), stabilized Bilayer Lipid Membranes (BLMs), graphene, gold

Πρόλογος

Η παρούσα διατριβή ανατέθηκε από τον Κο Νικόλαο Τζαμτζή-Πιλάλη Καθηγητή στη σχολή Χημικών μηχανικών του ΕΜΠ το 2015. Η συνολική διάρκεια της διατριβής ήταν 3 έτη. Ώθηση για την διαμόρφωση του θέματος της παρούσας διατριβής ήταν το μεγάλο ενδιαφέρον που παρουσιάζεται σήμερα για τις χρήσεις των βιοαισθητήρων σε διάφορους τομείς της Χημικής Ανάλυσης. Η τεχνολογία κατασκευής και ανάπτυξης βιοαισθητήρων εντάσσεται στο επιστημονικό πεδίο της Ενόργανης Χημικής Ανάλυσης και ειδικότερα κυρίως στον τομέα της Ηλεκτροχημείας. Οι βιοαισθητήρες, σε συνδυασμό με διάφορες ηλεκτροχημικές μεθόδους ανάλυσης, μπορούν να βρουν εφαρμογή σε πλείστες εξειδικευμένες Χημικές Αναλύσεις όπως στην ανίχνευση διάφορων τοξινών που υπάρχουν σε είδη διατροφής που καταναλώνουμε καθημερινά αλλά και στην γρήγορη παραλαβή ιατρικών αποτελεσμάτων που αφορούν την ανθρώπινη υγεία.

Ορισμένες τοξίνες έχουν ενδιαφέρον και ελέγχθηκαν με την βοήθεια των πρότυπων βιοαισθητήρων αυτής της διατριβής ήταν:

(α) Η Τοξίνη της Χολέρας, που είναι μια εξόχως βλαπτική ουσία για την ανθρώπινη υγεία που προκαλεί την ομώνυμη ασθένεια με κύρια συνέπεια την σοβαρή αφυδάτωση και σε πολλές περιπτώσεις τον θάνατο. Η δυνατότητα ανίχνευσης της τοξίνης αυτής στο νερό σε γαλακτοκομικά προϊόντα και σε άλλες τροφές που έχουν μολυνθεί εξαιτίας των ανθυγιεινών τρόπων λειτουργίας των συστημάτων ύδρευσης και αποχέτευσης κρίνεται ιδιαίτερα σημαντική.

(β) Η Αφλατοξίνη, που είναι μια ισχυρότατα τοξική και καρκινογόνα μυκοτοξίνη, που μπορεί να αναπτυχθεί σε γαλακτομικά προϊόντα, ξηρά φρούτα, ξηρούς καρπούς (ιδιαίτερα στα αράπικα φιστίκια και αμύγδαλα), μπαχαρικά, και σε σιτηρά. Έτσι η ανίχνευση αυτής της μυκοτοξίνης, που είναι άκρως επικίνδυνη για την ανθρώπινη υγεία, είναι μείζονος σημασίας, ιδίως στην γαλακτοκομική βιομηχανία.

Έχοντας υπόψη τις ανωτέρω επιβλαβείς δράσεις των συγκεκριμένων τοξινών, είναι σημαντικότερος παράγοντας η έγκαιρη, εύκολη, γρήγορη και αξιόπιστη ανίχνευση τους με νέες αναλυτικές τεχνικές που θα ενσωματώνουν οργανολογία χαμηλού κόστους, αυτονομία στην χρήση τους και εύκολο χειρισμό ακόμα και από μη εξειδικευμένο προσωπικό. Επιπλέον οι νέες αυτές τεχνικές πρέπει να συναγωνίζονται σε αξιοπιστία με άλλες, μεθόδους Ενόργανης Χημικής Ανάλυσης μεγαλύτερου κόστους. Η συγκεκριμένη διατριβή συμβάλλει σημαντικά σε αυτό το πεδίο της ανάπτυξης νέων αναλυτικών συσκευών, των βιοαισθητήρων, που έχουν αυτά τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά.

Για την επίτευξη των στόχων της διατριβής χρησιμοποιήθηκε η οργάνωση, η τεχνογνωσία και η οργανολογία τριών εργαστηρίων. Δύο από τα εργαστήρια αυτά ανήκουν στην Ελληνική επικράτεια και ήταν το εργαστήριο περιβαλλοντικής ανάλυσης του ΕΚΠΑ και της Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας του ΕΜΠ. Το τρίτο

εργαστήριο ήταν του Πανεπιστημίου Comenius της Μπρατισλάβα της Σλοβακίας υπό την διεύθυνση του καθηγητή Tibor Hianik.

Η θεωρητική μελέτη και η εν συνεχεία ανάπτυξη διάφορων πρότυπων βιοαισθητήρων βασίστηκε κατά πολύ στο ερευνητικό έργο του Κου Δ. Νικολέλη Καθηγητή ΕΚΠΑ. Με βάση το προγενέστερο ερευνητικό του έργο έγινε δυνατή η ανάπτυξη ενός εκ των πρότυπων βιοαισθητήρων και η εφαρμογή του σε έλεγχο της τοξίνης της χολέρας. Στο πανεπιστήμιο Comenius της Μπρατισλάβα έγινε η υπόλοιπη έρευνα και ανάπτυξη των τριών επόμενων πρότυπων απτοαισθητήρων, με τη συμβολή του καθηγητή Tibor Hianik αλλά και των συνεργατών του. Η μελέτη εστίασε την προσοχή της στην ανίχνευση της Αφλατοξίνης Μ1 στο γάλα. Τα πολύτιμα ερευνητικά εργαλεία των μελετών αυτών δοθήκαν από το ευρωπαϊκό πρόγραμμα Horizon 2020- MSCA-RISE-for milk, που ξεκίνησε το 2014 και συμμετέχει το πανεπιστήμιο της Μπρατισλάβα με αντικείμενο μελέτης τις νέες μεθόδους ανίχνευσης της δραστηριότητας των ενζύμων που περιέχονται στο γάλα. Το πρόγραμμα αυτό εστιάζει κυρίως στην πλασμίνη και την λακτάση. Όμως περιλαμβάνει και την ανίχνευση διαφόρων τοξινών που βρίσκονται στο γάλα όπως η Αφλατοξίνη Μ1.

Μέρος των εξόδων για την διαμονή μου στην χώρα αυτή καλύφθηκε από το πρόγραμμα Erasmus του ΕΜΠ. Η εξ ολοκλήρου παρακολούθηση όλων των σταδίων της διατριβής έγινε από τον Διευθυντή του Εργαστηρίου της Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας του ΕΜΠ Κο Τζαμτζή Πιλάλη, Καθηγητή ΕΜΠ που με την συνεχή καθοδήγησή του και με την μεθοδολογία στην διαμόρφωση και παρακολούθηση των πειραματικών κύκλων της διατριβής, οδήγησε στην επιτυχή ολοκλήρωσή της. Πρέπει να σημειωθεί ότι το θέμα της διατριβής έχει μεγάλο πρακτικό ενδιαφέρον και η τυχόν ένταξή του σε ερευνητικό πρόγραμμα δύναται να επιφέρει περαιτέρω τεχνολογικές βελτιώσεις.

Από τη θέση αυτή θεωρώ υποχρέωση να ευχαριστήσω όλους τους κύριους συντελεστές για την ολοκλήρωση αυτής της διατριβής, όπως: (α) τον κύριο επιβλέποντα της διδακτορικής μου διατριβής Κο Τζαμτζή-Πιλάλη καθηγητή ΕΜΠ, (β) όλος ιδιαίτερα τον Κο Δημήτρη Νικολέλη Καθηγητή του Χημικού τμήματος του ΕΚΠΑ για τις θεωρητικές βάσεις που αποκόμισα και τις πολύτιμες συμβουλές του, (γ) τον Κο Tibor Hianik καθηγητή του Πανεπιστημίου Comenius της Μπρατισλάβα, όπου ο ίδιος και τα μέλη της ερευνητικής του ομάδας Lenka Babelova, Marianna Sohova και Alexandra Rotunayona, με βοήθησαν στην κατανόηση των πειραματικών διατάξεων και στην τεχνογνωσία ανάπτυξης πρότυπων απτοαισθητήρων (βιοαισθητήρων).

Κλείνοντας θα ήθελα να ευχαριστήσω τόσο το προσωπικό της Σχολής των Χημικών Μηχανικών του ΕΜΠ που με διευκόλυνε ποικιλοτρόπως σε πολλούς τομείς για την διεκπεραίωση της διατριβής. Αναμφίβολα τέλος ευχαριστώ την οικογένειά μου, που με στήριξε ηθικά και οικονομικά για στην ολοκλήρωση του κύκλου των κύριων σπουδών μου στο Χημικό τμήμα του ΕΚΠΑ, στην ολοκλήρωση του μεταπτυχιακού μου, αλλά και στην την ολοκλήρωση της παρούσας διδακτορικής διατριβής στο ΕΜΠ που αποτελεί το επιστέγασμα των σπουδών μου.

Εισαγωγή

Οι βιοαισθητήρες ως αναλυτικά στοιχεία χημικού ελέγχου δύνανται να συνδυαστούν με διάφορες ηλεκτροχημικές μεθόδους χημικής ανάλυσης και να αποτελέσουν αυτοτελείς αναλυτικές συσκευές. Η διαφοροποίηση των βιοαισθητήρων σε σχέση με τις άλλες συναφείς κλασικές ηλεκτροχημικές μεθόδους ανάλυσης είναι πως πρόκειται για μικρές φορητές συσκευές, που δύνανται να κάνουν γρήγορες ανιχνεύσεις και ποσοτικούς προσδιορισμούς με μεγάλη ακρίβεια σε μικρά συνήθως δείγματα. Στόχος της τεχνολογίας είναι η χρήση αυτών από μη εξειδικευμένο προσωπικό, άρα είναι σημαντική η χρησιμότητά τους σε ανθρώπους που έχουν ελάχιστη ή μηδαμινή σχέση με την επιστήμη. Ουσιαστικά αποτελούν μια εφαρμογή επιστημονικών μεθόδων που απευθύνεται σε λαϊκή βάση και που αφορά κύρια στον έλεγχο της ανθρώπινης υγείας.

Η ραγδαία ανάπτυξη των βιοαισθητήρων, κατά κύριο λόγο, υπαγορεύτηκε από ανάγκες της ιατρικής διάγνωσης και της ταχείας ανάλυσης κλινικών δειγμάτων. Οι φορητές συσκευές που κυκλοφορούν κατά κόρον στο εμπόριο, για την μέτρηση του επιπέδου της γλυκόζης στο αίμα (συσκευές μέτρησης διαβήτη) βασίζονται στην ενσωμάτωση βιοαισθητήρα στο σώμα της αναλυτικής συσκευής. Η έρευνα που είναι σε εξέλιξη τα τελευταία χρόνια γίνεται στην κατεύθυνση της εμπορικής παραγωγής φορητών συσκευών με βελτιωμένα χαρακτηριστικά. Τέτοιες εμπορικές συσκευές σήμερα κυκλοφορούν για τον έλεγχο του επιπέδου σημαντικών δεικτών για την ανθρώπινη υγεία, όπως η κρεατίνη, η ουρία κ.λπ. Οι βιοαισθητήρες βρίσκουν εφαρμογές και σε άλλους τομείς, όπως στην κτηνιατρική, στον έλεγχο των τροφίμων [1-15] και στην προστασία του περιβάλλοντος [16-27].

Η ανίχνευση συγκεκριμένων τοξινών με βιοαισθητήρες, όπως της αφλατοξίνης M1 στα γαλακτομικά προϊόντα [1-15] και της τοξίνης της χολέρας σε νερά [16-27], κρίνονται αρκετά ενδιαφέροντα θέματα προς μελέτη. Πάνω σε αυτό το εξειδικευμένο αντικείμενο υπάρχει ελάχιστη ερευνητική εμπειρία λόγω του ότι εφαρμόζονται άλλες εξαιρετικά αξιόπιστες συναφείς ηλεκτροχημικοί μέθοδοι, όπως η ELISA, που δεν έχουν όμως τα πλεονεκτήματα των βιοαισθητήρων που αναφέρθηκαν.

Η τοξίνη της Χολέρας (Cholera toxin ή CT) παράγεται από το βακτήριο του δονακίου της Χολέρας (*Vibrio cholerae*), που προκαλεί την ομώνυμη ασθένεια, όπου χαρακτηρίζεται από έντονη διάρροια, η οποία μπορεί να προκαλέσει σοβαρή αφυδάτωση και μπορεί να αποβεί θανατηφόρα. Η τοξίνη της Χολέρας βρίσκεται συνήθως στο νερό, σε γαλακτομικά προϊόντα, ή τροφές που έχουν μολυνθεί εξαιτίας των ανθυγιεινών τρόπων λειτουργίας των συστημάτων ύδρευσης και αποχέτευσης [28].

Οι εργασίες [16-27] που αφορούν την ανίχνευση του δονακίου της Χολέρας με συστήματα βιοαισθητήρων επικεντρώνονται κυρίως σε λειτουργικές παραμέτρους που σχετίζονται με την σταθερότητα του συστήματος ανίχνευσης (όρια ανίχνευσης-αναγεννησιμότητα και χρόνοι απόκρισης). Η πρώτη εργασία [16] πάνω στο θέμα

δημοσιεύτηκε το 1989 με σκοπό την ανάλυση του μηχανισμού της ηλεκτροχημικής αντίδρασης της τοξίνης της Χολέρας με τη λιπιδική μεμβράνη όπου βρέθηκε υψηλά διηλεκτρική και ιοντικά διαπερατή στις διαταραχές των μονοστιβάδων.

Ο πρώτος βιοαισθητήρας για την ανίχνευση της τοξίνης της χολέρας αναπτύχθηκε από τον Fischer και τους συνεργάτες του [17] το 2000. Στην εργασία αυτή περιγράφονται τρεις βιοαισθητήρες που είχαν βάση λιπιδικές μεμβράνες για την ανίχνευση του δονακίου της Χολέρας με πολύ απλό τρόπο κατασκευής, καλό χρόνο απόκρισης αλλά όχι καλή αναγεννησιμότητα και όρια ανίχνευσης, άρα όχι τόσο σταθερό σύστημα. Το ίδιο έτος επίσης αναφέρθηκε μια απευθείας ομογενής ανίχνευση της CT με τη μέθοδο μεταφοράς ενέργειας του φθορισμού (FRET) [18] με καλό όριο ανίχνευσης (LOD=10 pM) αλλά μεγάλο χρόνο απόκρισης (30 min).

Μια ερευνητική ομάδα [19] το 2001 συνδύασε ένα εξειδικευμένο αντίσωμα (HRP) με ανιχνευτή λιποσώματος ενσωματωμένου σε GM1 επισημασμένου με αντιδραστήρια ενζύμων για την ανίχνευση της τοξίνης της Χολέρας. Το σύστημα αυτό ήταν αρκετά περίπλοκο με καλό όμως όριο ανίχνευσης (LOD=0,1pM) αλλά με μεγάλο χρόνο απόκρισης (10 min). Από το 2002 και μετά έγινε μια προσπάθεια να βελτιωθεί η σταθερότητα [20-22] των συστημάτων αλλά όχι σε εφαρμογές ανίχνευσης της τοξίνης της Χολέρας.

Το 2006 αναπτύχθηκε ένας οπτικός βιοαισθητήρας χρυσού με ακινητοποιημένο λιπιδικό φιλμ που είχε ενσωματωμένο το GM1 χρησιμοποιώντας SPR [23] με πολύ μικρό όριο ανίχνευσης (LOD=0,01 pM) αλλά με μεγάλο σχετικά χρόνο απόκρισης (15 min). Επιπρόσθετα το ίδιο έτος αναπτύχθηκε μια πολύπλοκη τεχνική με ηλεκτροενεργά δείγματα [24]. Το 2007 αναπτύχθηκε μια εξίσου πολύπλοκη τεχνική με επισημασμένα αντιδραστήρια φθορισμού [25], που είχαν καλά όρια ανίχνευσης και χρόνους απόκρισης αλλά μεγάλο χρόνο κατασκευής και όχι καλή αναγεννησιμότητα. Το ίδιο έτος επίσης μια ερευνητική ομάδα κατασκεύασε έναν βιοαισθητήρα χρυσού/λακτόζης με ακινητοποιημένο λιπιδικό φιλμ που έχει ενσωματωμένο το GM1 χρησιμοποιώντας UV φασματοσκοπία [26] με πολύ μεγάλο όριο ανίχνευσης (LOD=54 nM) και βελτιωμένη απόκριση (10 min).

Το 2010 κατασκευάστηκε ένας πιεζοηλεκτρικός βιοαισθητήρας με ακινητοποιημένη λιπιδική μεμβράνη τροποποιημένη με επιφανειακά συγκολλημένα λιποσώματα που φέραν το GM1 [27] χρησιμοποιώντας έναν περίπλοκο τρόπο κατασκευής. Ο χρόνος απόκρισης αυτού του βιοαισθητήρα εξακολουθούσε να είναι υπερβολικός (8 min).

Οι αφλατοξίνες (aflatoxins) είναι ισχυρότατα τοξικές και καρκινογόνες μυκοτοξίνες, που παράγονται από τους μύκητες (*Aspergillus flavus* και *Aspergillus parasiticus*), που αναπτύσσονται κυρίως σε ξηρά φρούτα, ξηρούς καρπούς (ιδιαίτερα στα αράπικα φιστίκια και αμύγδαλα), μπαχαρικά, σιτηρά, σε τυριά (όταν υπάρξουν κατάλληλες συνθήκες) και στα γαλακτομικά προϊόντα. Έτσι αυτές οι μυκοτοξίνες είναι μείζονος σημασίας για την γαλακτοκομική βιομηχανία και ιδιαίτερα η αφλατοξίνη M1 (AFM1), που είναι η μόνη που εμφανίζεται σε γαλακτοκομικά προϊόντα. Η AFM1

ανήκει στην κατηγορία των δευτερογενών μεταβολιτών που παράγονται από οργανισμούς του μυκητιακού βασιλείου [29].

Οι εργασίες [1-15] που αφορούν την ανίχνευση της AFM1 με συστήματα βιοαισθητήρων επικεντρώνονται κυρίως σε λειτουργικές παραμέτρους που σχετίζονται με την σταθερότητα του συστήματος ανίχνευσης (όρια ανίχνευσης-αναγεννησιμότητα και δυναμικό εύρος). Σε προηγούμενες μελέτες για την ανίχνευση της AFM1 με βιοαισθητήρες χρυσού χρησιμοποιήθηκαν τα αντισώματα (antibodies) [1-9] και τα απταμερή (aptamers) DNA/RNA [10-15] ως υποδοχείς (receptors).

Η ανίχνευση της AFM1 με απτοαισθητήρες αναφέρεται για πρώτη φορά από τον Nguyen [10] το 2013 με δυναμικό εύρος (6-60 ng/l) και πολύ χαμηλό όριο ανίχνευσης (LOD=1.98 ng/l). Στα πλεονεκτήματα της εργασίας εντάσσεται η εύκολη κατασκευή τους και η ανίχνευση της AFM1 με την μέθοδο της Διαφορικής Παλμικής Βολταμετρίας (DPV). Το μειονέκτημα της παραπάνω εργασίας είναι το μικρό δυναμικό εύρος.

Μια ερευνητική ομάδα [11] το 2016 εφάρμοσε μια εξίσου απλή μέθοδο κατασκευής απτοαισθητήρα χρησιμοποιώντας εκτυπωμένα ηλεκτρόδια με πτύχωση επί των οποίων ακινητοποιήθηκαν τροποποιημένα αμινοαπταμερή με ομοιοπολική σύνδεση. Το όριο ανίχνευσης της AFM1 ήταν ικανοποιητικό (LOD=1,15 ng/L).

Στην εργασία [12] το 2017 αναφέρεται παρόμοιο LOD με την εργασία [11], με τον απτοαισθητήρα αυτό να βασίζεται στην ακινητοποίηση βιοτινωμένων απταμερών σε στρώμα streptavidin. Για την ανίχνευση με βολταμετρία τετραγωνικού κύματος (SWV) χρησιμοποιήθηκαν 5mM $K_3 [Fe(CN)_6]$. Ο απτοαισθητήρας είχε ένα εκπληκτικά μεγάλο δυναμικό εύρος ($1-10^5$ ng/L) και η αναγέννηση γινόταν με 10% SDS (Sodium Dodecyl Sulfate).

Σε δημοσίευση του Jalalian [13] το 2018 επιτεύχθηκε πολύ καλό όριο ανίχνευσης της AFM1 (LOD=0,9 ng/L). Ο μηχανισμός ανίχνευσης σε αυτή την περίπτωση βασίζεται σε μεταβολές διαμόρφωσης των απταμερών παρουσία της AFM1 με επακόλουθο υβριδισμό των απταμερών με προστιθέμενες συμπληρωματικές ίνες DNA ακινητοποιημένες σε νανοσωματίδια χρυσού. Αυτός ο απτοαισθητήρας όμως χρειάζεται ένα περίπλοκο σχέδιο για την ανάπτυξη του.

Ένας οπτικός απτοαισθητήρας παρουσιάζεται στην εργασία [14] που χαρακτηρίζεται από ένα όριο ανίχνευσης της AFM1 (LOD=10 ng/L). Για την ανίχνευση της αφλατοξίνης χρησιμοποιήθηκε η ελλειψομετρία εσωτερικής ανάκλασης (TIRE) (Total Internal Reflection Ellipsometry) σε συνδυασμό με το φαινόμενο του επιφανειακού συντονισμού πλασμονίου (LSPR) (Localized Surface Plasmon Resonance). Η βάση της εργασίας αυτής είναι μια διέγερση που προκύπτει από την κβάντωση των ταλαντώσεων του πλάσματος, ακριβώς όπως τα φωτόνια. Παρόλο που ο απτοαισθητήρας αυτός είναι εύκολα κατασκευάσιμος το βασικό μειονέκτημα του είναι η περίπλοκη και πλέον εξελιγμένη μέθοδος που χρησιμοποιεί για την ανίχνευση της AFM1.

Η πλέον πρόσφατη μελέτη για την ανίχνευση της AFM1 με απτοαισθητήρες, είναι εκείνη του Smolko [15] το 2018, με όριο ανίχνευσης. Αυτός ο απτοαισθητήρας είχε ένα εξαιρετικά καλό όριο ανίχνευσης (LOD=0.5 ng/l) και κατασκευάστηκε χωρίς δείκτες (Label-free) και έγινε εφαρμογή του με επιτυχία σε δείγματα γάλακτος. Το μειονέκτημα ήταν η πιο σύνθετη κατασκευή του.

Ανακεφαλαιώνοντας συνοπτικά, στις υπάρχουσες μελέτες που αφορούν κατά πρώτον την ανίχνευση της τοξίνης της χολέρας, διαπιστώθηκε μια έλλειψη σταθερότητας των συστημάτων των βιοαισθητήρων η οποία οφείλεται στον μηχανισμό της αλληλεπίδρασης μεταξύ της τοξίνης και του υποδοχέα. Οι ανωτέρω μελέτες δίνουν καλά όρια ανίχνευσης όμως όχι καλούς χρόνους απόκρισης. Οι μέχρι τώρα μελέτες κατά δεύτερον που αφορούν την ανίχνευση με βιοαισθητήρες της αφλατοξίνης M1, χαρακτηρίζονται από την πολυπλοκότητα κατασκευής των περισσότερων συστημάτων, από τους μεγάλους χρόνους κατασκευής, τα σχετικώς καλά όρια ανίχνευσης και δυναμικά εύρη.

Στην παρούσα διατριβή έγινε κατά πρώτον ανάπτυξη ενός πρότυπου βιοαισθητήρα για την ανίχνευση της τοξίνης της Χολέρας με βάση τα χαρακτηριστικά που πρέπει να παρουσιάζουν τα σύγχρονα αναλυτικά όργανα τα οποία προορίζονται για μαζική χρήση στον δημόσιο τομέα. Στην ανάπτυξη του βιοαισθητήρα δόθηκε έμφαση στην εύκολη κατασκευή του, στη ταχεία ανίχνευση, στην αξιόπιστη αναγέννησή του, στην εφαρμογή του σε προσωμοιωμένα όσο και σε πραγματικά δείγματα και στην εύκολη συναρμογή του με σκοπό να εξελιχθεί σε ένα φορητό ανιχνευτή πεδίου.

Κατά δεύτερον έγινε ανάπτυξη απτοαισθητήρων για την ανίχνευση της AFM1, με χρήση απταμερών (receptors) Τα απταμερή υπερέχουν από άλλους υποδοχείς ως προς το κόστος και την δυνατότητα αναγεννησιμότητας. Τα στοιχεία αυτά, σε συνδυασμό με την προσπάθεια που γίνεται για την βελτίωση των ορίων ανίχνευσης και της δυναμικής περιοχής λειτουργίας που παρουσιάζονται στην βιβλιογραφία, μας έδωσαν το έναυσμα για την ανάπτυξη τριών πρότυπων βιοαισθητήρων για την ανίχνευση της AFM1 και για συγκεκριμένες εφαρμογές σε γαλακτοκομικά προϊόντα. Σε αυτούς τους απτοαισθητήρες δόθηκε έμφαση σε θέματα που σχετίζονται με το χρόνο κατασκευής τους, τον τρόπο ακινητοποίησης των απταμερών στο ηλεκτρόδιο εργασίας και την απλότητα στην ανίχνευση της AFM1. Η δομή της παρούσας διατριβής παρουσιάζεται κατωτέρω και περιλαμβάνει συνολικά 4 μέρη (Θεωρητικό μέρος-πειραματικό μέρος-βιβλιογραφία-παραρτήματα).

Στο θεωρητικό μέρος υπάρχουν 4 κεφάλαια. Στο κεφάλαιο 1 γίνεται εισαγωγή γενικά στην έννοια των αισθητήρων, στο κεφάλαιο 2, γίνεται μια εισαγωγή στους βιοαισθητήρες, στο κεφάλαιο 3 δίνεται μια βιβλιογραφική ανασκόπηση συναφών βιοαισθητήρων που αναπτύχθηκαν στο πειραματικό μέρος και των εφαρμογών τους, στο κεφάλαιο 4 δίνονται εξειδικευμένες εφαρμογές βιοαισθητήρων στις τοξίνες που ασχοληθήκαμε.

Στο πειραματικό μέρος υπάρχουν 4 κεφάλαια. Στο κεφάλαιο 5 γίνεται η παρουσίαση του πρώτου πειραματικού κύκλου που αφορά την ανάπτυξη βιοαισθητήρα ροής για την ανίχνευση της τοξίνης της Χολέρας. Στο κεφάλαιο 6 παρουσιάζεται ο δεύτερος πειραματικός κύκλος που αφορά την ανίχνευση της AFM1 με απτοαισθητήρα χωρίς δείκτες που έγινε ακινητοποίηση δενδριμερούς και έπειτα η ακινητοποίηση του απταμερούς. Στο κεφάλαιο 7 παρουσιάζεται ο τρίτος πειραματικός κύκλος που αφορά την ανίχνευση της AFM1 με απτοαισθητήρα με δείκτες που έγινε ακινητοποίηση Neutravidin/Fe-COOH και έπειτα η ακινητοποίηση του απταμερούς και στο κεφάλαιο 8 παρουσιάζεται ο τέταρτος πειραματικός κύκλος που αφορά την ανίχνευση της AFM1 με απευθείας ακινητοποίηση του απταμερούς με μερκαπτοεξανόλη

Ακολουθεί το τελευταίο κεφάλαιο 9, όπου δίνονται τα γενικά συμπεράσματα μαζί με τις προοπτικές. Στη συνέχεια ακολουθούν οι βιβλιογραφικές αναφορές και τα 5 παραρτήματα. Το πρώτο είναι τα ακρωνύμια, το δεύτερο οι τίτλοι των σχημάτων, των εικόνων και των πινάκων, το τρίτο ένα poster που παρουσιάστηκε σε διεθνές συνέδριο, που έγινε στο πανεπιστήμιο Comenius της Μπρατισλάβα και το τέταρτο οι 2 δημοσιεύσεις σε διεθνή περιοδικά (Electroanalysis-Sensors) που είναι απόρροια των πειραματικών κύκλων αυτής της διατριβής και το πέμπτο τα μέχρι τώρα βιογραφικά στοιχεία του συγγραφέα αυτής της διατριβής.

A. Θεωρητικό Μέρος

Κεφ 1:Εισαγωγή στους αισθητήρες

Κεφ 2:Βιοαισθητήρες

Κεφ 3: Τυπικές εφαρμογές Βιοαισθητήρων γραφενίου και χρυσού

Κεφ 4: Βιβλιογραφική ανασκόπηση στον έλεγχο των τοξινών στο γάλα και στο νερό με βιοαισθητήρες χρυσού και γραφενίου

Κεφ 1:Εισαγωγή στους αισθητήρες

1.1.Ορισμός

Αισθητήρας ονομάζεται μία συσκευή που ανιχνεύει ένα φυσικό μέγεθος και παράγει από αυτό μία μετρήσιμη έξοδο. Κατά τη διάρκεια της ανίχνευσης γίνεται μεταφορά ενέργειας οποιασδήποτε μορφής στο μετρήσιμο μέγεθος. Το πιο κλασσικό παράδειγμα αισθητήρα είναι το υδραργυρικό θερμόμετρο, που έχει έναν βαθμονομημένο σωλήνα ανάγνωσης της διαστολής του υδραργύρου, που ανιχνεύει τις αλλαγές στη θερμοκρασία του περιβάλλοντος και τις μετατρέπει σε διαστολή με μετρήσιμο μέγεθος τους βαθμούς κελσίου. Το θερμόμετρο μαζί με το βαρόμετρο ήταν από τους πρώτους αισθητήρες που αναπτύχθηκαν στην ανθρώπινη ιστορία. Με την ανάπτυξη όμως της τεχνολογίας οι αισθητήρες πλέον χρησιμοποιούνται σε ένα ευρύ φάσμα καθημερινών αντικειμένων, όπως τους ανελκυστήρες, τις λάμπες φωτισμού, τις πόρτες του αυτοκινήτου, τα συστήματα συναγερμού κ.τ.λ.[30].

Οι αισθητήρες είναι μέρη ενός ευρύτερου συστήματος, που ονομάζεται **σύστημα ανίχνευσης (detection system)**. Το σύστημα αυτό ενεργοποιείται όποτε υπάρχει το σήμα εισόδου για το οποίο είναι εξειδικευμένο. Για παράδειγμα στα θερμόμετρα όποτε υπάρξει αλλαγή θερμοκρασίας. Το **ερέθισμα (σήμα εισόδου)** ορίζεται ως η ποσότητα, η ιδιότητα ή η κατάσταση που λαμβάνεται και μετατρέπεται σε ένα ηλεκτρικό σήμα. Το ερέθισμα ταξινομείται σε δύο μεγέθη, δηλαδή τα **φυσικά**, που μπορεί να είναι από το φως μέχρι τη δόνηση ή τη θέση και τα **χημικά** που μπορεί να είναι από τη θερμοκρασία ως την πίεση ή τη συγκέντρωση των ιόντων.

Το ερέθισμα μπορεί να μετατραπεί σε σήμα με δύο τρόπους, δηλαδή τον **άμεσο**, όπου μετατρέπεται το ερέθισμα σε ηλεκτρικό σήμα ή τροποποιείται το σήμα χρησιμοποιώντας όμως ένα κατάλληλο φυσικό φαινόμενο και τον **περίπλοκο**, όπου χρειάζεται επιπλέον ένας ή περισσότεροι **μετατροπείς ενέργειας (επεξεργαστές)** πριν ο άμεσος αισθητήρας χρησιμοποιηθεί για να δημιουργήσει μια ηλεκτρική έξοδο.

Το **υποκείμενο μιας μέτρησης** μπορεί να είναι οτιδήποτε, από ένα αυτοκίνητο ως ο χώρος ενός πλοίου ή ένα ζώο ή κάποιο υγρό, ή αέριο. Το υποκείμενο αυτό μπορεί να μην βρίσκεται σε άμεση επαφή με τον αισθητήρα π.χ. συσκευές που ανιχνεύουν ακτινοβολίες ή εικόνες (κάμερες) αλλά η μεταφορά ενέργειας άρα και το σήμα εισόδου σε αυτή την περίπτωση να προέρχεται από έναν **ενεργοποιητή (actuator)**, που τροφοδοτείται από ένα ηλεκτρικό σήμα και το μετατρέπει σε μια άλλη μορφή ενέργειας. Για παράδειγμα στην ψηφιακή μηχανή, ο φακός χρησιμοποιείται για να συγκεντρώνει το φως στον αισθητήρα της μηχανής, ο οποίος το μετατρέπει σε ηλεκτρικό σήμα. Ο φακός λοιπόν είναι ο ενεργοποιητής. Οι αισθητήρες, που χρησιμοποιούν ενεργοποιητή ονομάζονται **ανέπαφοι**.

Οι αισθητήρες από τότε που ανακαλύφθηκε ο ηλεκτρισμός, μετεξελίχθηκαν και έφτασαν στην ευρεία σημερινή χρήση τους. Οι σύγχρονοι πια αισθητήρες είναι **ηλεκτρικοί**. Οι πρώτοι **ηλεκτρικοί αισθητήρες** είχαν **αναλογική** έξοδο, στη συνέχεια όμως ανακαλύφθηκαν οι **ημιαγωγοί** και αυτό είχε ως αποτέλεσμα η αναλογική έξοδο να γίνει **ψηφιακή**. Ο ηλεκτρισμός και οι ημιαγωγοί δώσανε μια πολύ σοβαρή ώθηση στην ανάπτυξη των σύγχρονων αισθητήρων, που μέχρι εκείνο το σημείο ήταν **μηχανικοί**. Όμως η ανακάλυψη των οπτικών ινών έδωσε μια περαιτέρω ώθηση για την μετατροπή των αισθητήρων σε οπτικούς.

1.2.Λειτουργικά χαρακτηριστικά

Τα χαρακτηριστικά ενός αισθητήρα μπορεί να ταξινομηθούν είτε ως **στατικά** είτε ως **δυναμικά**. Οι παράμετροι αυτοί είναι απαραίτητοι στη χαρτογράφηση της πιστότητας των σημάτων εξόδου έναντι των σημάτων εισόδου [31] και ιδιαίτερα σε ότι αφορά τα στατικά χαρακτηριστικά.

1.3.1.Στατικά χαρακτηριστικά

Στατικά είναι τα χαρακτηριστικά που μπορούν να μετρηθούν όταν οι παροδικές επιπτώσεις έχουν σταθεροποιηθεί στην τελική ή σταθερή κατάσταση. Μερικά από αυτά περιγράφονται παρακάτω:

1. **Η Πιστότητα (Accuracy)** ενός αισθητήρα που καθορίζει την εγγύτητα της τιμής εξόδου προς τη τιμή εισόδου.
2. **Το Σφάλμα (Error)**, που είναι η διαφορά μεταξύ της πραγματικής τιμής και της μετρούμενης τιμής που λαμβάνεται από τον αισθητήρα.
3. **Η ανοχή**, που είναι το μέγιστο σφάλμα που μπορεί να δημιουργήσει ο αισθητήρας.
4. **Η Διακριτική ικανότητα (Resolution)** που σηματοδοτεί την ελάχιστη δυνατή αυξητική μεταβολή στο μετρούμενο μέγεθος που θα οδηγήσει σε μία ανιχνεύσιμη αύξηση στο σήμα εξόδου. Η διακριτική ικανότητα περιορίζεται έντονα από κάθε θόρυβο στο σήμα.
5. **Η Ευαισθησία (Sensitivity)** είναι ο λόγος της αυξητικής μεταβολής στο σήμα της εξόδου του αισθητήρα προς την αυξητική μεταβολή του μετρούμενου μεγέθους στην είσοδο.
6. **Η Εκλεκτικότητα (Selectivity)** ενός αισθητήρα είναι η ικανότητα να μετρήσει ένα μόνο συστατικό υπό την παρουσία άλλων.
7. **Ο Θόρυβος (Noise)** αναφέρεται σε τυχαίες διακυμάνσεις στο σήμα εξόδου, όταν το μετρούμενο μέγεθος δεν αλλάζει. Η αιτία του θορύβου μπορεί να οφείλεται είτε σε εσωτερικούς (π.χ. ηλεκτρονικοί θόρυβοι) ή σε εξωτερικούς παράγοντες (π.χ. μηχανικές δονήσεις).
8. **Το όριο ανίχνευσης (Limit of detection, LOD)**, που είναι η μικρότερη τιμή του μετρούμενου μεγέθους. Το όριο αυτό μπορεί να μετρηθεί σε έναν αισθητήρα με ακρίβεια ως $S/N = 3$, όπου S = το μετρούμενο σήμα και N = ο θόρυβος.

9. **Η αναγεννησιμότητα (Regeneration)** είναι η ικανότητα του αισθητήρα να δώσει την ίδια τιμή για διαδοχικές μετρήσεις της ίδιας εισόδου, όταν όλες οι λειτουργικές και περιβαλλοντικές συνθήκες παραμένουν σταθερές.
10. **Η υστέρηση (Hysteresis)** είναι η εξάρτηση του σήματος εξόδου ενός συστήματος όχι μόνο από το σήμα εισόδου αλλά και από την «ιστορία» του.
11. **Η σταθερότητα (Stability)** είναι η ικανότητα του αισθητήρα να παράγει την ίδια τιμή εξόδου κατά τη μέτρηση μιας σταθερής τιμής εισόδου για ένα χρονικό διάστημα.
12. **Ο Χρόνος Απόκρισης (Response Time)** είναι αυτός που απαιτείται ώστε ο αισθητήρας να φθάσει σε μια σταθερή τιμή, δηλαδή είναι ο χρόνος κατά τον οποίο το σήμα εξόδου φθάνει σε ένα ορισμένο ποσοστό της τελικής τιμής, σε απόκριση σε μία εκθετική αλλαγή της εισόδου. Ο χρόνος αποκατάστασης ορίζεται με παρόμοιο τρόπο αλλά και αντιστρόφως.
13. **Το Δυναμικό εύρος (Dynamic Range)** είναι το φάσμα των σημάτων εισόδου που θα οδηγήσουν σε ένα ουσιαστικό σήμα εξόδου για τον αισθητήρα. Όλοι οι αισθητήρες έχουν σχεδιαστεί για να εκτελέσουν σε ένα καθορισμένο εύρος μετρήσεις. Σήματα έξω από αυτό το εύρος μπορεί να είναι ακατανόητα, να προκαλέσουν απαράδεκτες μεγάλες ανακρίβειες, ακόμη και να προκαλέσουν μη αναστρέψιμη ζημιά στον αισθητήρα.

1.3.2. Δυναμικά χαρακτηριστικά

Τα **δυναμικά χαρακτηριστικά** περιγράφουν παροδικές ιδιότητες του αισθητήρα. Για να περιγράφουν αυτές γίνεται χρήση μαθηματικών εξισώσεων, από τις οποίες μπορούμε να αποσπάσουμε πληροφορίες εύκολα και να πάρουμε μια γενική εικόνα σχετικά με τα συστήματα ανίχνευσης {Περισσότερες πληροφορίες [31-32]}.

1.4. Ταξινόμηση

Μια ταξινόμηση για να γίνει πρέπει να ορίσεις το κριτήριο ταξινόμησης. Έτσι ανάλογα το κριτήριο μπορούμε να διαχωρίσουμε τους αισθητήρες. Εάν το κριτήριο ταξινόμησης αποτελεί την **πρόσθετη πηγή ενέργειας**, τότε οι αισθητήρες διαχωρίζονται σε **παθητικούς**, που δεν χρειάζονται καμία πρόσθετη πηγή ενέργειας, αφού παράγουν άμεσα ένα ηλεκτρικό σήμα που προέρχεται από ένα εξωτερικό ερέθισμα, και σε **ενεργητικούς**, που απαιτούν εξωτερική τροφοδοσία ρεύματος για τη λειτουργία τους.

Οι ενεργητικοί αισθητήρες λειτουργούν με τροφοδοσία που ονομάζεται σήμα διέγερσης. Το εν λόγω σήμα τροποποιείται από τον αισθητήρα για να παράξει το σήμα εξόδου. Οι ενεργητικοί αισθητήρες μερικές φορές ονομάζονται παραμετρικοί επειδή οι δικές τους ιδιότητες μπορούν να αλλάξουν σε απόκριση με μία εξωτερική επίδραση και οι ιδιότητες αυτές μπορούν στη συνέχεια να μετατραπούν σε ηλεκτρικά σήματα.

Εάν το κριτήριο ταξινόμησης είναι το **σημείο αναφοράς**, τότε οι αισθητήρες διαχωρίζονται σε **απόλυτους**, που ανιχνεύουν ένα ερέθισμα σε σχέση με την απόλυτη

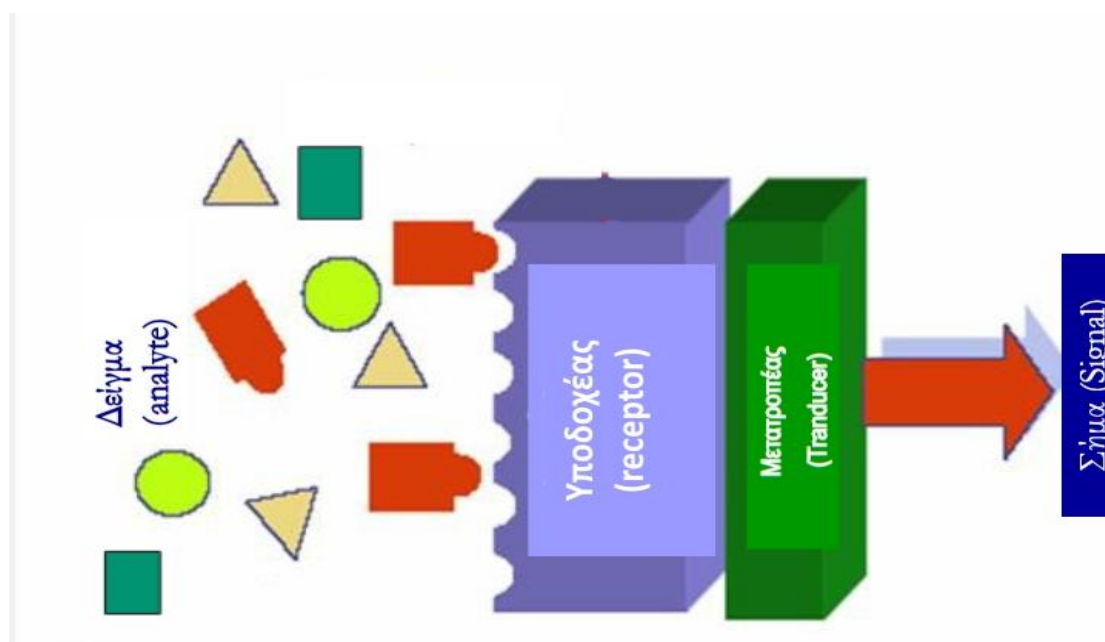
φυσική κλίμακα η οποία είναι ανεξάρτητη από τις συνθήκες μέτρησης, και σε **σχετικούς**, που παράγουν ένα σήμα το οποίο σχετίζεται με κάποιο σήμα αναφοράς.

Εάν το κριτήριο είναι το υποκείμενο που βρίσκονται, τότε οι αισθητήρες διαχωρίζονται σε **φυσικούς**, που βρίσκονται στους ζωντανούς οργανισμούς που περιέχουν βιολογικούς αισθητήρες με λειτουργίες παρόμοιες με εκείνες των μηχανικών συσκευών, π.χ. το ανθρώπινο μάτι, και σε **χημικούς**, που είναι αυτοδύναμες συσκευές που παράσχουν πληροφορίες σχετικά με τη χημική σύνθεση του περιβάλλοντος. Σε αυτή την κατηγορία υπάρχουν και αισθητήρες αερίων και υγρών [33].

Κεφ 2:Βιοαισθητήρες

2.1.Ορισμός

Οι βιοαισθητήρες έχουν παρόμοιες λειτουργίες με τους απλούς αισθητήρες και ισχύουν όλα τα χαρακτηριστικά που αναλύθηκαν στο κεφάλαιο 1. Η διαφορά όμως σε σχέση με τους αισθητήρες έγκειται στο γεγονός ότι χρησιμοποιούν στοιχεία βιολογικής αναγνώρισης ως υποδοχείς (receptor) που βρίσκονται σε άμεση χωρική επαφή με έναν μετατροπέα σήματος (transducer).

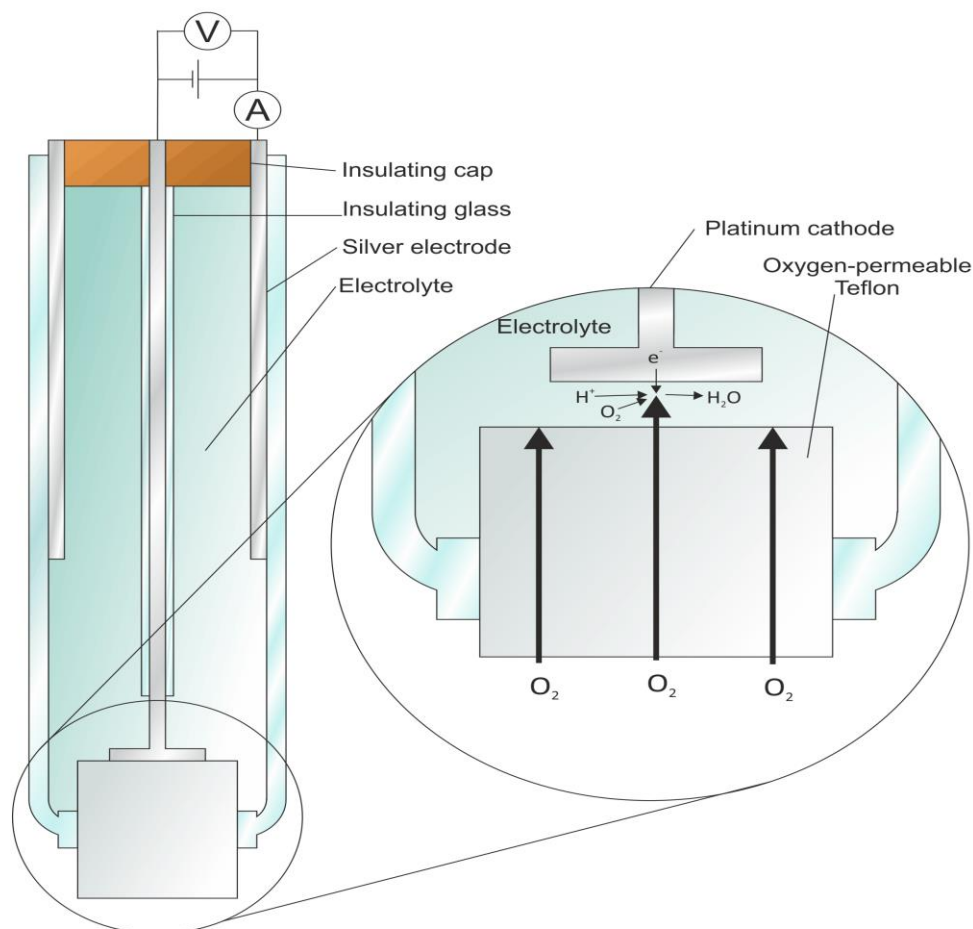


Σχήμα 2.1: Τυπική απεικόνιση της λειτουργίας ενός κοινού βιοαισθητήρα

Ο **βιοαισθητήρας (biosensor)** γενικότερα ορίζεται ως μια ενιαία αναλυτική διάταξη που περιέχει ενσωματωμένο έναν παράγοντα βιοαναγνώρισης, ο οποίος είναι ένα βιολογικό υλικό (π.χ. ιστοί, μικροοργανισμοί, οργανίδια, νουκλεϊκά οξέα, τμήμα DNA, ένζυμα, αντισώματα, κτλ.) που δρα ως υποδοχέας προσαρμοσμένος σε ένα φυσικοχημικό μετατροπέα σήματος. Ο μετατροπέας αυτός μπορεί να είναι οπτικός, ηλεκτροχημικός, θερμομετρικός ή ακουστικός [34-35]. Ο **μετατροπέας σήματος** αποτελεί τον φυσικό ανιχνευτή που μετατρέπει τις φυσικοχημικές μεταβολές, που προκαλούνται από τη βιοχημική αλληλεπίδραση της προσδιοριζόμενης ουσίας με το βιολογικό μόριο σε αναλυτικό σήμα. Ο **υποδοχέας** συνήθως είναι ακινητοποιημένος (immobilized) στην επιφάνεια του μετατροπέα σήματος.

Ο βιοαισθητήρας μπορεί να είναι ένας χημικός αισθητήρας που μετατρέπει την εκλεκτική βιοχημική αντίδραση σε αναλυτικό σήμα [36] και ως ιδέα ξεκίνησαν μετά την εφεύρεση του ηλεκτροδίου του οξυγόνου από τον καθηγητή Leland Clark το 1956. Το ηλεκτρόδιο αυτό ονομάστηκε αργότερα τιμητικά προς τον εφευρέτη του ως ηλεκτρόδιο του Clark και αποτέλεσε την βάση για τον πρώτο βιοαισθητήρα που

κατασκευάστηκε το 1962 από τον εφευρέτη του ηλεκτροδίου αυτού [37]. Αυτός ο βιοαισθητήρας χρησιμοποιεί το ηλεκτρόδιο του Clark μαζί με ένα αντισταθμιστικό ηλεκτρόδιο (counter electrode) και ένα εξωτερικό πολυανθρακικό φιλμ διαπερατό από μόρια γλυκόζης αλλά αδιαπέραστο από πρωτεΐνες και άλλα συστατικά του αίματος (Σχήμα 2.2). Είναι ουσιαστικά ο τρόπος που λειτουργούν τα μηχανήματα μέτρησης του διαβήτη που πρωτοκυκλοφόρησαν τη δεκαετία του 70'.



Σχήμα 2.2: Τυπική απεικόνιση του ενζυματικού βιοαισθητήρα του Clark

Το 1969 εφευρέθηκε ο πρώτος ποτενσιομετρικός βιοαισθητήρας, όπου γινόταν ακινητοποίηση ενός ενζύμου σε ηλεκτρόδιο αμμωνίας για την ανίχνευση της ουρίας. Έναν χρόνο αργότερα ευρέθηκε ο πρώτος ιοντικός βιοαισθητήρας (ISFET).

Το 1980 δημιουργήθηκε ο πρώτος βιοαισθητήρας για μετρήσεις *in vivo* (σε ιστούς εντός του οργανισμού) των αερίων του αίματος. Το 1983 αναπτύχθηκε ο πρώτος ανοσοαισθητήρας (SPR) ενώ μέσα στη δεκαετία του 90 μπήκαν οι βάσεις για να φτάσουμε σε βιοαισθητήρες που χρησιμοποιούσαν πλέον οπτικές ίνες (οι περισσότεροι σύγχρονοι αισθητήρες χρησιμοποιούν πλέον οπτικές ίνες) και από τις αρχές του 21^{ου} αιώνα η έρευνα πλέον στρέφεται σε βιοαισθητήρες που χρησιμοποιούν νανοδομημένα υλικά, δηλαδή φυσικά, τυχαία ή κατασκευασμένα υλικά που περιέχουν σωματίδια, σε μια αδέσμευτη κατάσταση ως ένα συσσωμάτωμα, όπου για το 50% ή περισσότερο των σωματιδίων του, η κατανομή του μεγέθους βρίσκεται στην περιοχή μεταξύ 1-100 nm.

Πριν όμως από το 1956 και τη χρονιά σταθμός (1962) υπήρξαν κάποιοι ουσιαστικοί σταθμοί για να φτάσουμε στην εφεύρεση του βιοαισθητήρα, αφού από το 1916 είχε επιτευχθεί η πρώτη ακινητοποίηση πρωτεϊνών ενώ το 1922 ανακαλύφθηκε το πρώτο ηλεκτρόδιο υάλου για τη μέτρηση pH. Όλη αυτή η ιστορική πορεία απεικονίζεται στον πίνακα 2.1.

Πίνακας 2.1: Η ιστορική εξέλιξη των βιοαισθητήρων

Έτος	Σημείωση σε σχέση με την εξέλιξη των βιοαισθητήρων
1916	Πρώτη αναφορά στην ακινητοποίηση πρωτεϊνών
1922	Ηλεκτρόδιο υάλου για τη μέτρηση pH
1956	Ηλεκτρόδιο του οξυγόνου (από τον Clark)
1962	Πρώτη περιγραφή βιοαισθητήρα: αμπερομετρικό ενζυμικό ηλεκτρόδιο για την γλυκόζη
1969	Ποτενσιομετρικός βιοαισθητήρας: ακινητοποίηση ενζύμου σε ηλεκτρόδιο αμμωνίας για την ανίχνευση ουρίας
1970	Εύρεση Ion-Selective field-Effect Transistor (ISFET)
1972/1975	Εμπορικός βιοαισθητήρας (Yellow spring instrument): Βιοαισθητήρας γλυκόζης
1980	Αισθητήρας pH για in vivo μετρήσεις αερίων αίματος
1982	Βιοαισθητήρας γλυκόζης (με οπτικές ίνες)
1983	Πρώτος ανοσοαισθητήρας SPR
1984	Αμπερομετρικός βιοαισθητήρας: Οξειδάση γλυκόζης και φεροκενίου για την ανίχνευση γλυκόζης
1987	Βιοαισθητήρας ανίχνευσης γλυκόζης αίματος
1990	Εμπορικά διαθέσιμος βιοαισθητήρας
1992	i-STAT φορητός αναλυτής αίματος
1998	Βιοαισθητήρας γλυκόζης αίματος
1999- Σήμερα	Quantum dots, Νανοϋλικά (νανοσωματίδια, νανοσωλήνες κ.λπ.)

2.2. Λειτουργικά χαρακτηριστικά

Το βασικό πλεονέκτημα των βιοαισθητήρων είναι η αυτόνομη χρήση τους και η παροχή ορθών πειραματικών αποτελεσμάτων σε πολύ μικρό χρόνο. Ο άμεσος εκλεκτικός, ευαίσθητος και συχνά in situ (επί τόπου) προσδιορισμός είναι ένα σοβαρό πλεονέκτημα, αφού με την απλοποίηση της μεθοδολογίας είναι δυνατόν να πραγματοποιηθούν συνήθεις αναλύσεις και από μη εξειδικευμένο προσωπικό.

Σε ένα αναλυτικό εργαστήριο γενικά επιζητούνται ιδιαίτερα χαρακτηριστικά αξιοπιστίας και προσδιορισμού των τεχνικών ανάλυσης και έτσι χρησιμοποιούνται ιδίως κλασσικές μέθοδοι ανάλυσης, όπως η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), η φασματομετρία μάζας (MS), η φασματομετρία ατομικής απορρόφησης, η φασματοσκοπία υπέρυθρου (IR) και άλλες αναλυτικές τεχνικές. Η αγορά αυτών των

οργάνων συνήθως έχει μεγάλο κόστος και χρειάζεται εξειδικευμένο προσωπικό για την χρήση τους. Μπορεί βέβαια αυτό το κόστος να αντισταθμίζεται από τον αριθμό των ημερήσιων αναλύσεων και των εργασιών. Αυτά τα εργαστήρια όμως είναι είτε κομμάτι μιας εταιρείας ή ενός πανεπιστημίου ή ενός ερευνητικού κέντρου και όχι κάτι που μπορεί να δημιουργήσει ένα απλός ιδιώτης.

Οι βιοαισθητήρες όμως είναι εργαλεία με χαμηλό κόστος που μπορεί να τα αγοράσει ο έκαστος ιδιώτης και να κάνει αναλύσεις ίσες και όμοιες με αυτές που κάνουν τα εξειδικευμένα εργαστήρια. Ουσιαστικά με αυτήν την τεχνολογία έχουμε ένα εργαστήριο τσέπης με κόστος και χρόνο ανάλυσης σημαντικά μειωμένο, με αποτελέσματα εξίσου αξιόπιστα και όργανα τα οποία προσφέρουν αυξημένη εκλεκτικότητα και ευαισθησία ως προς το υποκείμενο έρευνας [38] και τη δυνατότητα εξωεργαστηριακών ή *in situ* ή *in vivo* ή σε πραγματικό χρόνο μετρήσεις [39]. Έτσι τα σημαντικότερα στατικά χαρακτηριστικά, που απαιτείται να έχει ένας βιοαισθητήρας, πέρα από αυτά των αισθητήρων που αναλύθηκαν στο κεφάλαιο 1, είναι τα εξής:

- Η Γραμμική ή λογαριθμική απόκριση με τη συγκέντρωση της προσδιοριζόμενης ουσίας.
- Η Βιοσυμβατότητα (κατάλληλο για μετρήσεις *in vivo*).
- Το Μικρό κόστος και χρόνος κατασκευής.
- Η Ανάκτηση σήματος, δηλαδή η καλή κλασματική διαφορά του σήματος μεταξύ των πραγματικών και των πρότυπων δειγμάτων

2.3. Ταξινόμηση

Για να κατασκευαστεί ένας βιοαισθητήρας πρέπει να ληφθεί υπόψη ο τρόπος με τον οποίο θα γίνει η αλληλεπίδραση του υποδοχέα (ένζυμα, αντισώματα, φυσικούς υποδοχείς, κτλ.) και της προσδιοριζόμενης ουσίας. Αυτό εξαρτάται κυρίως από το εάν το μόριο-υποδοχέας έχει ή δεν έχει βιοκαταλυτικές ιδιότητες. Όταν χρησιμοποιούνται ως υποδοχείς μόρια **χωρίς καταλυτική δράση**, όπως τα αντισώματα ή τα νουκλεϊκά οξέα, η αντίδραση δέσμευσης μπορεί να γίνει στη βάση **μεσοεπιφανειακών φυσικοχημικών μεταβολών**, όπως π.χ. οι μεταβολές του δείκτη διάθλασης του διαλύματος κοντά στην επιφάνεια και κατά την διάρκεια της ακινητοποίησης ενός αντιδραστήριου δέσμευσης από το συγκεκριμένο αντιδραστήριο.

Τα είδη των βιοαισθητήρων μπορούν να διακριθούν με βάση το φυσικό στοιχείο αναγνώρισης (μεταλλάκτης) και το χημικό στοιχείο αναγνώρισης, όπως τα ένζυμα, οι ιστοί, τα κύτταρα κ.τ.λ.

2.3.1. Ταξινόμηση με βάση το φυσικό στοιχείο αναγνώρισης (transducer)

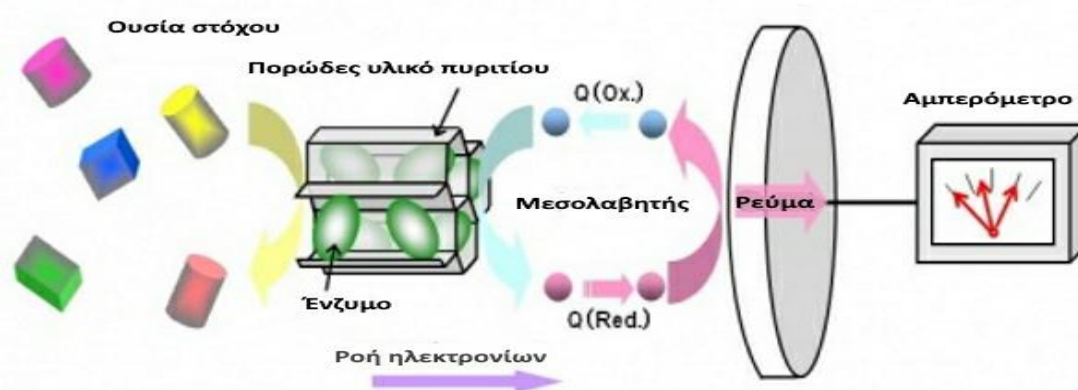
Το φυσικό στοιχείο αναγνώρισης συνδέεται με τον τρόπο που γίνεται η αντίχενυση και τον τύπο του μετατροπέα σήματος (transducer) που χρησιμοποιούμε (Πίνακας 2.2).

Πίνακας 2.2: Ταξινόμηση βιοαισθητήρων ανάλογα με την αρχή της μεθόδου και με το είδος του μετατροπέα σήματος (φυσικό στοιχείο αναγνώρισης)

Βιοαισθητήρες	Μετατροπέας σήματος
Ηλεκτροχημικοί	Ποτενσιομετρικοί
	Αμπερομετρικοί
	Αγωγιμομετρικοί/εμπέδησης
Ακουστικοί	Πιεζοηλεκτρικοί κρύσταλλοι
Θερμικοί	Θερμίστορ
Οπτικοί	Ανιχνευτές απορρόφησης
	Φωταύγειας
	Φθορισμού
	Συμβολής

Οι βιοαισθητήρες που χρησιμοποιούν είτε αμπερομετρία ή ποτενσιομετρία ή αγωγιμομετρία ως μέσο ανίχνευσης ονομάζονται **ηλεκτροχημικοί**.

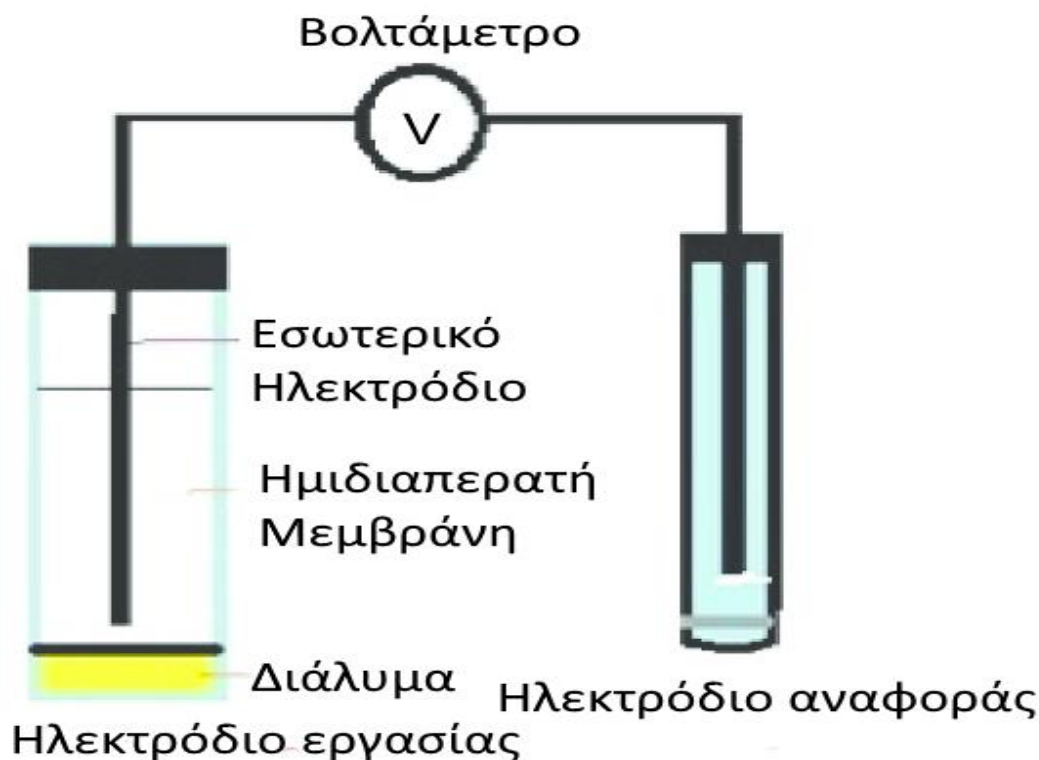
Στην **αμπερομετρία**, η ανίχνευση γίνεται με μέτρηση της πυκνότητας του ηλεκτρικού ρεύματος που παράγεται επί ενός ηλεκτροδίου εργασίας το οποίο έχει πολωθεί σε κάποια τιμή δυναμικού όταν ένα ηλεκτροχημικά ενεργό σωματίδιο υφίσταται οξείδωση ή αναγωγή στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου [40] (Σχήμα 2.3).



Σχήμα 2.3: Τυπική απεικόνιση βιοαισθητήρα που χρησιμοποιείται στην αμπερομετρία

Στην **ποτενσιομετρία** η ανίχνευση γίνεται με Εκλεκτικά Ηλεκτρόδια Ιόντων (EHI) [41], δηλαδή με εκλεκτική μεμβράνη ιόντων με συνεχή επιφάνεια και χαρακτηριστικά εκλεκτικότητας, που διαχωρίζουν τα δύο διαλύματα. Η μεμβράνη αυτή είναι υπεύθυνη για τη δημιουργία μιας διαφοράς δυναμικού μεταξύ των δύο

πλευρών του όταν υπάρχει φυσική επαφή με ηλεκτρολυτικά διαλύματα, που περιέχουν το ιόν για το οποίο είναι εκλεκτική. Η διαφορά δυναμικού λοιπόν εξαρτάται από τις ενεργότητες του ιόντος σε κάθε πλευρά της μεμβράνης και εφόσον η ενεργότητα του στο εσωτερικό διάλυμα αναφοράς είναι σταθερή, η μετρούμενη διάφορα δυναμικού εξαρτάται μόνο από την ενεργότητα του ιόντος στο εξωτερικό διάλυμα.

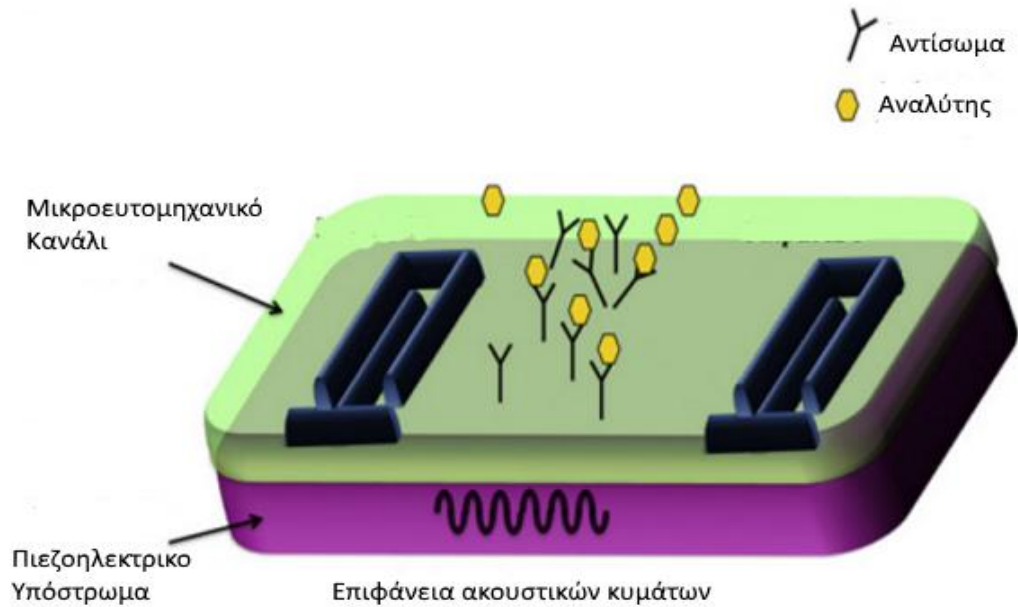


Σχήμα 2.4 :Τυπική απεικόνιση βιοαισθητήρα που χρησιμοποιείται στην ποτενσιομετρία.

Στην αγωγιμομετρία γίνεται παρακολούθηση των μεταβολών της αγωγιμότητας των βιολογικών υγρών και σύγκριση μεταξύ των τιμών αγωγιμότητας σε αντίστοιχες καταστάσεις (φυσιολογικές ή παθολογικές) του οργανισμού [40]. Η αγωγιμότητα συσχετίζεται με την περιεκτικότητα του διαλύματος σε ιόντα. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις η ειδική αγωγιμότητα συνήθως μεταβάλλεται σχεδόν γραμμικά με τη συγκέντρωση των ιόντων.

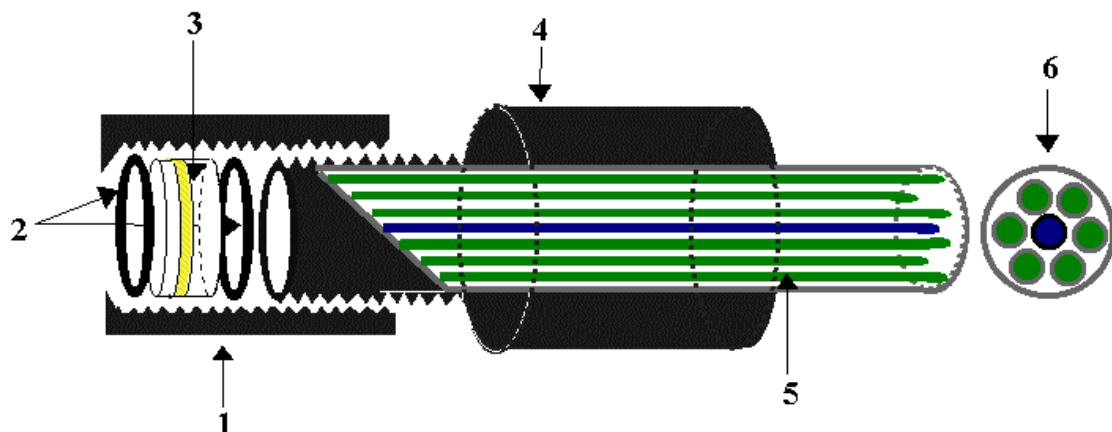
Οι βιοαισθητήρες που χρησιμοποιούν ακουστικά κύματα ως μέσο ανίχνευσης ονομάζονται **ακουστικοί ή συσκευές Επιφανειακών Ακουστικών Κυμάτων [Surface Acoustic Wave (SAW) devices]**. Οι μεταλλάκτες σε αυτήν την περίπτωση είναι ιδίως πιεζοηλεκτρικοί κρύσταλλοι άρα εναλλακτικά ονομάζονται **πιεζοηλεκτρικοί βιοαισθητήρες** [43]. Το ακουστικό κύμα σε αυτή την περίπτωση προέρχεται από μεταβολή του ηλεκτρικού πεδίου στον κρύσταλλο εξαιτίας μιας χημικής αντίδρασης που προκαλείται μηχανική παραμόρφωση του υποστρώματος κατά μήκος της επιφάνειας του βιοαισθητήρα. Η αλληλεπίδραση των ακουστικών κυμάτων με μία ουσία που έχει αποτεθεί στην επιφάνεια των κρυστάλλων μπορεί να

προκαλέσει μεταβολές στις αρχικές ιδιότητες των κυμάτων, το πλάτος, τη φάση ή τη συχνότητα τους.



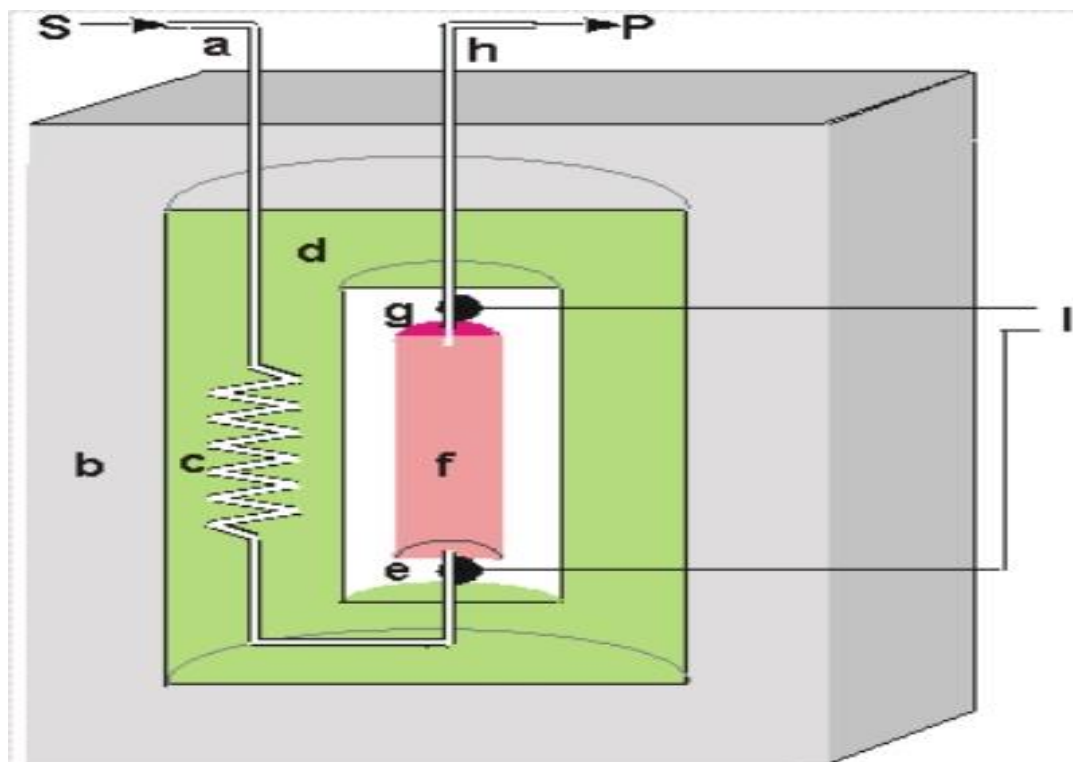
Σχήμα 2.5: Τυπική απεικόνιση ενός πιεζοηλεκτρικού βιοαισθητήρα

Οι βιοαισθητήρες που χρησιμοποιούν τα οπτικά κύματα ως μέσο ανίχνευσης ονομάζονται **οπτικοί**. Τα οπτικά κύματα συνήθως προέρχονται από τους κυματοδηγούς (waveguides), που είναι οι οπτικές ίνες, που μεταφέρουν το οπτικό σήμα, όπως τα μεταλλικά καλώδια το ηλεκτρικό ρεύμα. Η κατηγορία αυτή αναπτύχθηκε έπειτα από την ανακάλυψη των οπτικών ινών και ειδικότερα μετά την ανακάλυψη της εξ' αποστάσεως ανίχνευσης (remote sensing). Συνηθισμένα φαινόμενα που χρησιμοποιούνται κατά την ανίχνευση είναι η απορρόφηση, η φωταύγεια, ο φθορισμός ή η συμβολή των κυμάτων.



Σχήμα 2.6: Τυπική απεικόνιση ενός οπτικού βιοαισθητήρα. [(1) Αφαιρούμενο τμήμα περιβλήματος, (2) στεγανοποιητικοί δακτύλιοι, (3) βιοενεργά σάντουιτς (4) κύριο σώμα περιβλήματος (5) τομή οπτικής ίνας, όπου αναπτύσσονται τα επιμέρους στοιχεία φθορισμού (περιμετρικά) και “ανάγνωσης” (κέντρο).]

Οι βιοαισθητήρες που χρησιμοποιούν τη θερμότητα ως μέσο ανίχνευσης ονομάζονται **θερμικοί**. Οι βιοαισθητήρες αυτοί αποτελούνται από έναν συνδυασμό ενός βιοκαταλύτη και ενός αισθητήρα θερμοκρασίας, που είναι συνήθως ένζυμο (Enzyme Thermistor, ET), που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό κάποιας ουσίας σε ένα δείγμα [44]. Οι αντιδράσεις που γίνονται σε αυτούς είναι συνήθως εξώθερμες.



Σχήμα 2.7: Τυπική απεικόνιση ενός θερμικού βιοαισθητήρα [Το ρεύμα (a) διέρχεται μέσω του μονωμένου εξωτερικά κιβωτίου (b) στον εναλλάκτη θερμότητας (c) διαμέσω ενός αλουμινίου (d). Από εκεί διαχέεται στον θερμίστορ και μέσα σε έναν βιοαισθητήρα (f), που γίνονται οι αντιδράσεις. Οι αλλαγές στη θερμοκρασία καθορίζονται από τον θερμίστορ (g) και το διάλυμα διαχέεται στα απόβλητα (h). Τα εξωτερικά ηλεκτρονικά εξαρτήματα (I) καθορίζουν την διαφορά στην αντίσταση και επομένως τη θερμοκρασία μεταξύ των θερμικών αντιστάσεων]

2.3.2. Ταξινόμηση με βάση το χημικό στοιχείο αναγνώρισης (receptor)

Το χημικό στοιχείο αναγνώρισης είναι κάποιο βιολογικό μόριο, ακινητοποιημένο στην επιφάνεια του φυσικού μεταλλάκτη, δηλαδή ένζυμο, ιστοί ή κύτταρα, αντισώματα, νουκλεϊκά οξέα (DNA ή RNA), λιπιδικές μεμβράνες ή νανοδομήσιμα υλικά.

Όταν το χημικό στοιχείο αναγνώρισης είναι ένα ένζυμο οι βιοαισθητήρες αυτοί ονομάζονται **βιοκαταλυτικοί ή ενζυμικοί**. Το ένζυμο δρα σε ένα υπόστρωμα που είτε **ακινητοποιείται (immobilized)** σε αυτό ή δρα ελεύθερα ή διαλυτοποιείται εντός της επιφάνειάς του βιοαισθητήρα. Η ανίχνευση του υποκειμένου γίνεται με προσδιορισμό του υποστρώματος, όπου προκύπτει το αναλυτικό σήμα.

Όταν το ένζυμο είναι ακινητοποιημένο υπάρχει σημαντική αύξηση στην σταθερότητα του βιοαισθητήρα που εκφράζεται με τον χρόνο ημιζωής του ενζύμου, που του δίνει την δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης σε πολλές μετρήσεις, άρα υπάρχει δυνατότητα **αναγεννησιμότητας** του βιοαισθητήρα. Αυτό συνέβη λόγω του ότι τα ακινητοποιημένα ένζυμα μπορούν να μην υφίσταται κάποια μόλυνση για αρκετές μετρήσεις, διότι το ακινητοποιημένο ένζυμο μπορεί να διαχωριστεί πλήρως από το αναλυόμενο διάλυμα.

Σύμφωνα με διάφορες δημοσιεύσεις [45-48], τρεις είναι οι κύριες τεχνικές ακινητοποίησης των ενζύμων οι οποίες περιλαμβάνουν τις:

1. **Φυσικές μεθόδους**, όπου η ακινητοποίηση γίνεται χωρίς το σχηματισμό ομοιοπολικών δεσμών,
2. **Χημικές μεθόδους**, όπου μεταξύ ενζύμου και υποστρώματος ή μεταξύ δύο ενζύμων σχηματίζεται ομοιοπολικός δεσμός
3. **Υβριδικές τεχνικές**, οι οποίες είναι συνδυασμός φυσικών και χημικών τεχνικών.

Όταν το χημικό στοιχείο αναγνώρισης είναι ένα κύτταρο ή ένας ιστός οι βιοαισθητήρες αυτοί ονομάζονται **κυτταρικοί** [49-51]. Τα ενεργά συστατικά που περιέχονται στα κύτταρα ή στους ιστούς έχουν μια αυξημένη σταθερότητα λόγω του ότι βρίσκονται συνήθως στο φυσικό τους περιβάλλον και έτσι οι βιοαισθητήρες αυτοί έχουν χαμηλό κόστος. Έχουν όμως συνήθως μειωμένη εκλεκτικότητα και μεγάλους χρόνους απόκρισης. Το εξαιρετικά όμως ενδιαφέρον στοιχείο είναι ότι πέρα από το να καταγράφεται ένα αναλυτικό σήμα αναλύονται και οι άμεσες βιολογικές επιδράσεις στις ουσίες που αναλύονται.

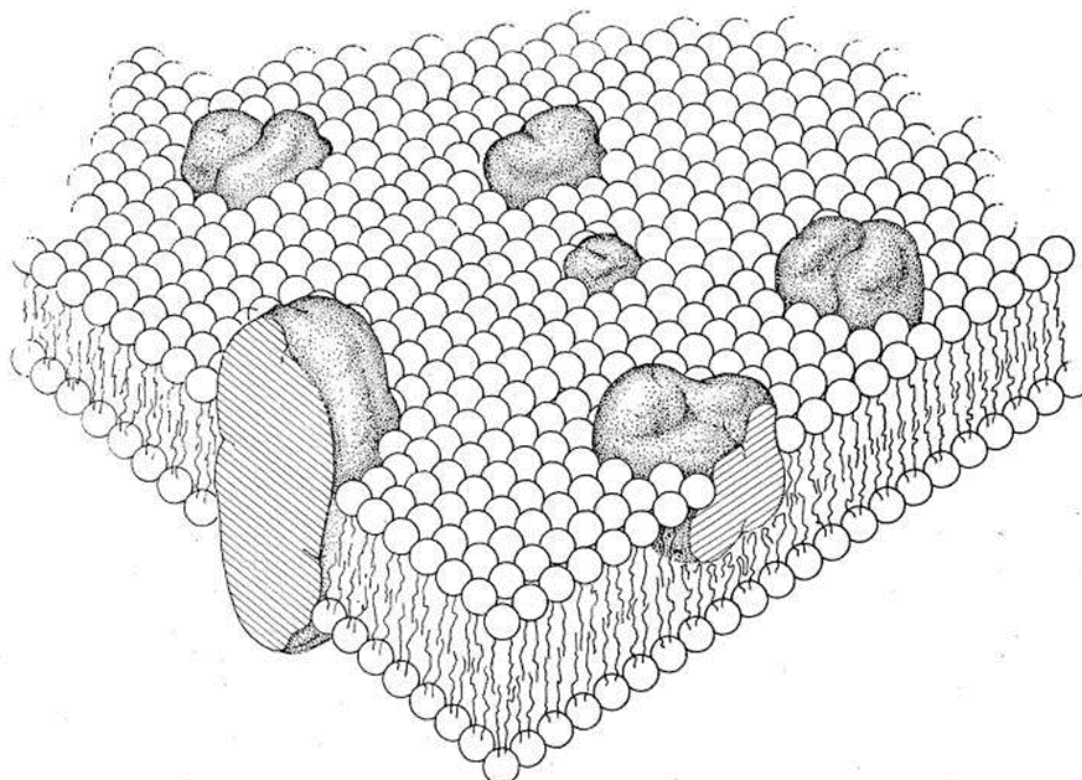
Όταν το χημικό στοιχείο αναγνώρισης είναι νουκλεϊκά οξέα (DNA ή RNA) οι βιοαισθητήρες αυτοί ονομάζονται **DNA ή RNA αισθητήρες (DNA or RNA Sensors)**. Σε αυτούς του βιοαισθητήρες γίνονται εξειδικευμένες διαμοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του νουκλεϊκού οξέος και του αναλύτη.

Όταν το χημικό στοιχείο αναγνώρισης είναι τα αντισώματα οι βιοαισθητήρες ονομάζονται **ανοσοαισθητήρες (immunosensors)**. Η σχέση μεταξύ του υποδοχέα και της προσδιοριζόμενης ουσίας ορίζεται ως βιολογική συγγένεια. Η προσδιοριζόμενη ουσία είναι ένα αντιγόνο ή μικροοργανισμός με χαρακτηριστική αλληλουχία νουκλεοτιδίων, που δεσμεύεται εκλεκτικά από υποδοχείς και η ανάλυση των μακρομορίων γίνεται είτε έμμεσα ή άμεσα.

Η έμμεση ανάλυση γίνεται με τροποποίηση των ανιχνεύσιμων ουσιών με κατάλληλο τρόπο ώστε να απομονωθούν από το φυσικό τους περιβάλλον και να γίνουν ανιχνεύσιμες. Η τροποποίηση συνήθως είναι απαραίτητη σε φυτικούς και ζωικούς ιστούς. Η εξειδικευμένη αλληλεπίδραση που πραγματοποιείται σε αυτή την περίπτωση, μπορεί να είναι είτε αλληλεπίδραση αντισώματος-αντιγόνου ή αλληλεπίδραση δέκτη-ανταγωνιστή [52].

Όταν το χημικό στοιχείο αναγνώρισης είναι οι λιπιδικές μεμβράνες, τότε γίνεται μια απομίμηση των λειτουργιών των φυσικών κυτταρικών μεμβρανών. Ο τύπος της λιπιδικής μεμβράνης, που συνήθως χρησιμοποιείται, είναι οι **σταθεροποιημένες**

λιπιδικές μεμβράνες (BLMs). Οι μεμβράνες αυτές αποτελούνται από δύο αντικριστά στρώματα ακριβώς όπως και οι φυσικές μεμβράνες.



Σχήμα 2.8: Τυπική απεικόνιση μιας σταθεροποιημένης λιπιδικής μεμβράνης. [Τρισδιάστατη απεικόνιση που περιλαμβάνει τη λιπιδική διπλοστιβάδα και τις πρωτεΐνες (fluid mosaic)]

Όταν το χημικό στοιχείο αναγνώρισης είναι ένα απταμερές (aptamer) οι βιοαισθητήρες ονομάζονται **απτοαισθητήρες (aptasensors)**. Τα απταμερή είναι μόρια ολιγονουκλεοτιδίων ή πεπτιδίων που έχουν τροποποιηθεί με τέτοιο τρόπο ώστε να δεσμεύουν ένα συγκεκριμένο στόχο.

Η εμφάνιση της νανοτεχνολογίας έστρεψε την έρευνα σε δομές με διάφορα νανοδομήσιμα υλικά, που πλεονεκτούν ως προς την αποδοτικότητα, την εκλεκτικότητα και την ευαισθησία. Αυτού του είδους οι βιοαισθητήρες ονομάζονται **νανοαισθητήρες (nanosensors)**. Τα νανοδομήσιμα υλικά μπορεί να είναι διαφόρων ειδών όπως οι **νανοσωλήνες (nanotubes)**, οι **νανοράβδοι (nanorods)** και τα **νανοσύρματα (nanowires)** που είναι μήτρες ακινητοποίησης των διαφόρων στοιχείων χημικής αναγνώρισης όπως αναλύθηκαν προηγουμένως. Το υλικό μιας μήτρας έχει τον πιο κρίσιμο ρόλο σε ότι αφορά τον καθορισμό της σταθερότητας, της ευαισθησίας και της διάρκειας ζωής των βιοαισθητήρων [53]. Στα νανοδομήσιμα υλικά έχουν παρατηρηθεί καλύτερες αποδόσεις στα στατικά χαρακτηριστικά των βιοαισθητήρων.

Κεφ 3: Τυπικές εφαρμογές Βιοαισθητήρων γραφενίου και χρυσού

3.1.Εισαγωγή

Οι βιοαισθητήρες καθίστανται δυναμικά και εφαρμόσιμα εργαλεία σε ποικίλα πεδία της επιστήμης και της τεχνολογίας, όπως στους περιβαλλοντικούς, στους Ιατρικούς και τους βιομηχανικούς ελέγχους με δυνατότητες ανίχνευσης και διάγνωσης. Η έρευνα βέβαια και η ανάπτυξη των βιοαισθητήρων συνήθως καθοδηγείται από τις ανάγκες της αγοράς, που αποτελεί και το βασικό κίνητρο για την ανάπτυξή τους και εντέλει την εφαρμογή τους σε διάφορα πεδία. Συνοπτικά, οι εφαρμογές των βιοαισθητήρων θα μπορούσαν να κατηγοριοποιηθούν στους παρακάτω τομείς:

1. Περιβαλλοντικοί έλεγχοι

Οι βιοαισθητήρες βρίσκουν μεγάλη εφαρμογή σε περιβαλλοντικούς ελέγχους, καθώς δύνανται να ανιχνεύσουν επικίνδυνες για το περιβάλλον ουσίες, όπως απόβλητα ή ρυπαντικές ουσίες. Η ευκολία στην μεταφορά και την χρήση τους, οι ταχείς και οι συνεχείς έλεγχοι, οι επί τόπου αναλύσεις και το χαμηλό κόστος, αποτελούν το κλειδί στην επιτυχή εφαρμογή τους σε τέτοιους ελέγχους. Οι βιοαισθητήρες συνήθως σε αυτή την περίπτωση μπορούν να μειώσουν τον αριθμό των δειγμάτων που απαιτούν οι ακριβές εργαστηριακές αναλύσεις, αποκλείοντας από την διαδικασία, τα δείγματα που δεν περιέχουν την προς ανάλυση ουσία με έναν απλό προκαταρκτικό έλεγχο. Αντανακλώντας το εύρος των μολύνσεων οι βιοαισθητήρες που έχουν αναπτυχθεί για τη χρήση σε περιβαλλοντικές αναλύσεις καλύπτουν μεγάλο αριθμό ενώσεων από διάφορες χημικές κατηγορίες, αλλά και μικροοργανισμούς. Έτσι έχουν κατασκευαστεί βιοαισθητήρες για ανίχνευση παρασιτοκτόνων, χλωροφαινολών, βαρέων μετάλλων, βακτηρίων, τοξινών κλπ.[54].

2. Ιατρικοί έλεγχοι

Οι βιοαισθητήρες, χάρη στην υψηλή εξειδίκευση που τους χαρακτηρίζει λόγω του βιολογικού τμήματος που εμπεριέχουν, βρίσκουν αρκετές εφαρμογές στο πεδίο των κλινικών διαγνωστικών μελετών. Στην διαγνωστική χρησιμοποιούνται συνήθως ως ολοκληρωμένα συστήματα αναλύσεων, στην φαρμακευτική εφαρμόζονται για την ανίχνευση και τον έλεγχο της απόδοσης των φαρμάκων και στην ιατρική για *in vivo* διάγνωση.

Οι βιοαισθητήρες στον τομέα αυτό χαρακτηρίζονται από ευρύ φάσμα εφαρμογών, ευκολία στην χρήση και φορητότητα παρέχοντας ελέγχους πραγματικού χρόνου για σχεδόν κάθε αναλυτέα ουσία, συμπεριλαμβανομένου των φαρμάκων, των τοξινών, των βακτηρίων και των ιών. Στη φαρμακολογία ειδικότερα οι βιοαισθητήρες χρησιμοποιούνται κυρίως για τον προσδιορισμό της καθαρότητας των φαρμάκων αφού παρέχουν τη δυνατότητα για ποσοτικό προσδιορισμό ουσιών ανεπιθύμητων ουσιών που βρίσκονται στα φάρμακα [55].

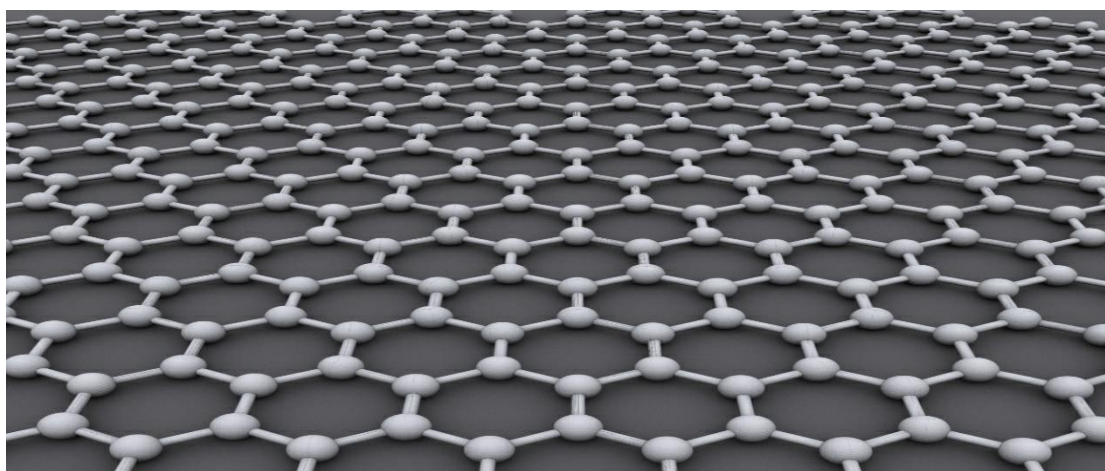
3. Βιομηχανικοί έλεγχοι

Οι βιοαισθητήρες χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο σε βιομηχανίες παραγωγής για να ελέγξουν την παραγωγή σακχάρων, αμινοξέων, αντιβιοτικών, ειδικευμένων χημικών ουσιών, συντηρητικών, αντιμικροβιακών ουσιών και μερικώς γενετικά τροποποιημένων πρωτεϊνών. Βιοαισθητήρες επίσης ελέγχουν τις διαδικασίες παραγωγής, την ποιότητα των προϊόντων και χρησιμοποιούνται για την διεξαγωγή μετρήσεων των αποβλήτων των βιομηχανιών. Άλλη εφαρμογή τους είναι οι ποιοτικοί έλεγχοι των τροφίμων, που αποσκοπεί στον καθορισμό της ποιότητας και την πιστοποίηση της συμμόρφωσης με την νομοθεσία.

Η δυνατότητα συνεχούς παροχής δεδομένων από έναν συγκεκριμένο αναλύτη είναι συχνά ανεκτίμητη για τον έλεγχο της διαδικασίας παρασκευής τροφίμων. Έτσι η σημαντική πλευρά των εφαρμογών τους βρίσκεται στον προσδιορισμό των σακχάρων (π.χ. γλυκόζη, φρουκτόζη), της αιθανόλης, των γλυκαντικών, των αντιμικροβιακών παραγόντων, των συντηρητικών, των βιταμινών, των τοξινών κλπ.[56].

Τα ανωτέρω είναι οι γενικές εφαρμογές. Εξειδικεύοντας όμως ειδικά τις εφαρμογές που θα μελετηθούν στο πειραματικό μέρος, οι χρήσεις που εμφανίζουν ενδιαφέρον είναι αυτές που αφορούν περιβάλλον (νερό) και τη βιομηχανία τροφίμων (γάλα) σε επιφάνειες με μήτρες (matrix) είτε το γραφένιο/χαλκό ή το χρυσό. Έτσι παρακάτω αφού γίνει μια ανάλυση των ιδιοτήτων των υλικών της μήτρας, εμφανίζονται διάφορες εφαρμογές που προέρχονται από βιβλιογραφικά δεδομένα.

Ο Χαλκός (Cu) είναι ένα όλκιμο και ελατό μέταλλο με μικρή δραστικότητα. Δεν κάνει πολλές αντιδράσεις με άλλα στοιχεία και δεν εμφανίζει αναγωγικότητα, για αυτό επιλέχθηκε για την μήτρα σε συνδυασμό με το γραφένιο, που τόσο το ίδιο όσο και τα παράγωγά του (π.χ. οξείδιο, αιμοπετάλια, νανόφυλλα του γραφενίου, γραφίτης, φουλερένια κ.τ.λ.) στην ηλεκτροχημεία εμφανίζει σταθερή δομή (μονατομικό παχύ φύλλο ατόμων άνθρακα διατεταγμένο σε σχήμα κυψέλης -σχήμα 3.1). Η δομή αυτή κάνει το γραφένιο το λεπτότερο, ισχυρότερο και πιο άκαμπτο υλικό στην χημεία, καθώς και έναν άριστο αγωγό της θερμότητας και της ηλεκτρικής ενέργειας [57].

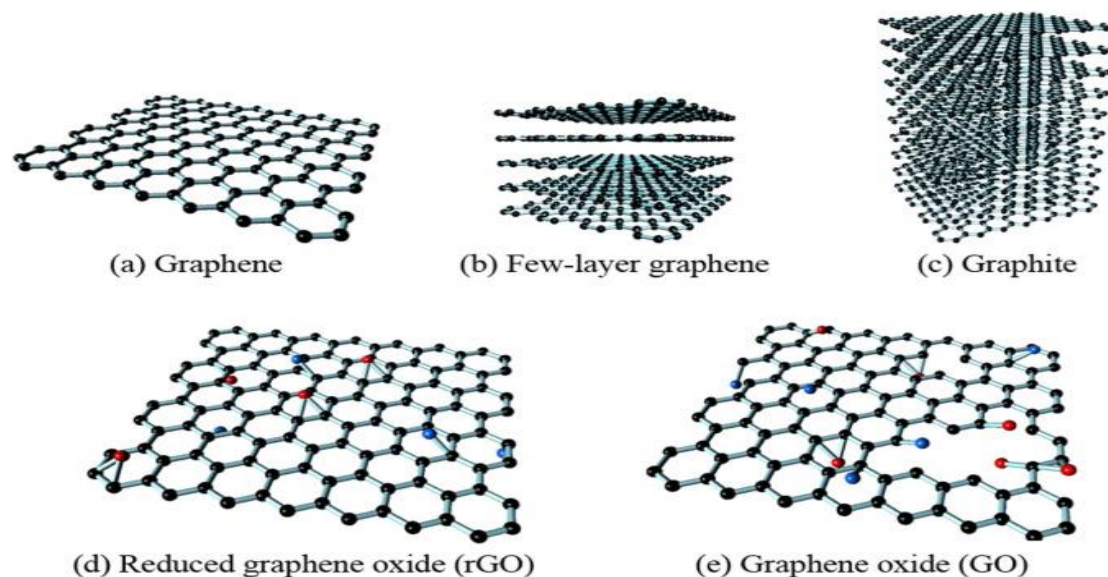


Σχήμα 3.1: Τυπική απεικόνιση του γραφενίου. [Κρυσταλλικό πλέγμα ατόμων άνθρακα σε κυψελωτή δισδιάστατη διάταξη]

Ο χρυσός(Au) είναι ένα μέταλλο με μεγάλη ελαστικότητα, ολκιμότητα, αντίσταση στην επίδραση των περισσοτέρων χημικών ουσιών, αλλά και μεγάλη ηλεκτρική αγωγιμότητα. Ως εκ τούτου γίνεται ελκυστικός στην ηλεκτροχημεία.

3.2.Εφαρμογές

Οι βιοαισθητήρες με γραφένιο ως μήτρα έχουν πολλές εφαρμογές, διότι το γραφένιο έχει πολλαπλές ενεργές θέσεις. Οι ιδιότητες του γραφενίου δίνουν την δυνατότητα ευρέσεως καλών λειτουργικών παραμέτρων (ευαισθησία-όριο ανίχνευσης κ.λ.π. [58-59]. Τα νανοϋλικά που βασίζονται στο γραφένιο μπορούν να ταξινομηθούν σε σχέση με τη μέθοδο παραγωγής τους, λόγω του ότι μπορούν να παραχθούν συνήθως είτε με την ανάπτυξη μέσω της **χημικής εναπόθεσης ατμών (Chemical Vapor Deposition, CVD)**. Μια άλλη μέθοδο είναι η θερμική απολέπιση του οξειδίου του γραφίτη που παράγεται το **θερμικώς ανηγμένο γραφένιο (Thermally Reduced Graphene, TRGO)**. Επίσης η απολέπιση μπορεί να γίνει με τη βοήθεια των ηχητικών κυμάτων με αποτέλεσμα το **οξείδιο του γραφενίου (Graphene Oxide, GO)**, που μπορεί να αναχθεί περαιτέρω χημικά ή ηλεκτροχημικά σε **χημικό ανηγμένο GO (Chemically Reduced GO, CRGO)** ή **ηλεκτροχημικά ανηγμένο GO (Electrochemically Reduced GO, ERGO ή rGO)** οξείδιο του γραφενίου (Σχήμα 3.2).



Σχήμα 3.2: Μερικές δομές νανοϋλικών γραφενίου. [Το GO έχει μια δομή που δεν είναι πλήρως επίπεδη επειδή το δίκτυο του άνθρακα έχει καταστραφεί σε μεγάλο βαθμό αλλά περιέχει μεγάλες ποσότητες ομάδων που περιέχουν οξυγόνο, που είναι επωφελείς για τη λειτουργία των βιομορίων στην βιοαναγνώριση ([60]).].

Το γραφένιο παρουσιάζει υψηλή ηλεκτροκαταλυτική δραστηριότητα για το H_2O_2 , καθώς και άμεση ηλεκτροχημική απόκριση για την οξειδάση της γλυκόζης και έτσι μπορεί να θεωρηθεί ως ένας καλός βιοαισθητήρας για την άμεση ανίχνευση της οξειδάσης της γλυκόζης [61-62]. Επίσης έχει κατασκευαστεί αμπερομετρικός βιοαισθητήρας ελεύθερου ενζύμου για το υπεροξείδιο του υδρογόνου χρησιμοποιώντας το ηλεκτροχημικά παραγόμενο νανοςύνθετο ανηγμένο οξείδιο του

γραφενίου και οξειδίου του ψευδαργύρου με την τεχνική της ηλεκτροεμβάπτισης [63]. Μια άλλη εφαρμογή βρίσκεται στο εκλεκτικό και ευαίσθητο βιοαισθητήρα της ντοπαμίνης, που χρησιμοποιεί νανόφυλλα γραφενίου και νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων σε **ιοντικό υγρό (Ionic Liquid, IL)** [64].

Επιπρόσθετα, έχει αναπτυχθεί ένας ποτενσιομετρικός βιοαισθητήρας για την ανίχνευση της χοληστερόλης βασισμένος σε νανόφυλλα γραφενίου [65] και έχει αναφερθεί ένας βιοαισθητήρας για την ανίχνευση του κυτοχρώματος c που χρησιμοποιήθηκε ηλεκτρόδιο χιτοζάνης (Chitosan, CS)/γραφενίου με άμεσο ρυθμό μεταφοράς ηλεκτρονίων μεταξύ του ηλεκτροδίου και του ηλεκτρολύτη [66]. Πέρα από αυτά όμως έχει ερευνηθεί και η ηλεκτροχημική οξείδωση του NADH με ουδέτερο διάλυμα [67].

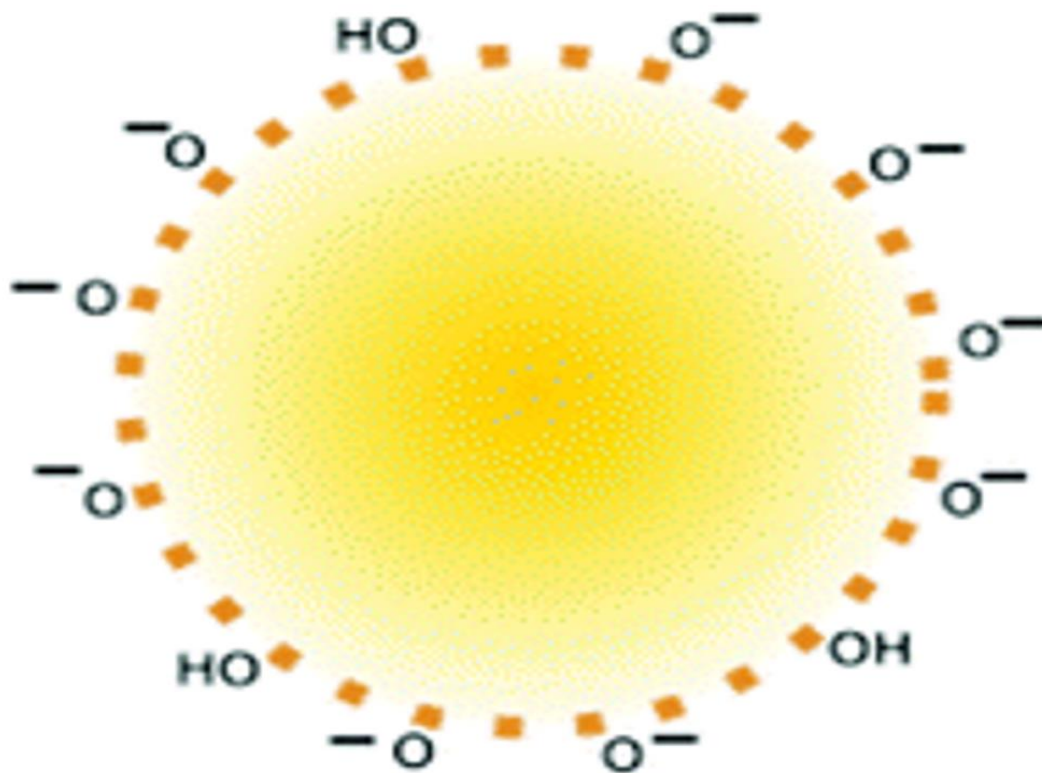
Στην κλινική διάγνωση σπουδαίο ρόλο έχει η καλή ευαισθησία και εκλεκτικότητα. Επίσης η απόκριση του βιοαισθητήρα πρέπει να είναι γρήγορη. Τέλος οι βιοαισθητήρες αυτοί πρέπει να έχουν χαμηλό κόστος. Σχετικά πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι ο συνδυασμός του γραφενίου με ssDNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό βιομορίων [68-70] και ειδικότερα τοξικών μορίων.

Οι σημαντικότερες εφαρμογές του χρυσού βρίσκονται στη χρήση των νανοσωματιδίων του χρυσού (Au-Nps), που δημιουργούν συμπαγή νανοσύμπλοκα (nanoclusters). Τα Au-Nps έχουν σημαντικές οπτικές και ηλεκτρικές ιδιότητες ενώ παρουσιάζουν φωτοσταθερότητα και χημική σταθερότητα. Επίσης παρουσιάζουν φθορίζουσες ιδιότητες άρα έχουν εφαρμογές και σε τεχνικές φθορισμού.

Τα Au-Nps έχουν χρησιμοποιηθεί μαζί με ολιγονουκλεοτίδια [71], αντισώματα [72] και πρωτεΐνες [73]. Η προσαρμοστικότητά τους έχει δώσει πολύτιμα υλικά σε διάφορες βιοιατρικές εφαρμογές. Λόγω του μεγάλου τους εμβαδού μπορούν να επιτρέψουν την εισαγωγή φαρμάκων και άλλων υλικών στην επιφάνειά τους προκειμένου να χρησιμοποιηθούν σε θεραπευτικούς σκοπούς [74].

Ο συντονισμός επιφανειακών πλασμονίων (SPR) και η ικανότητα εξουδετέρωσης του φθορισμού είναι οι βασικές φυσικές ιδιότητες των Au-Nps, ενώ τα σφαιρικά Au-Nps εμφανίζουν μια σειρά από χρώματα μεταξύ του καστανού, του πορτοκαλί, του κόκκινου και του πορφυρό σε υδατικά διαλύματα. Το μέγεθος του πυρήνα τους είναι από 1 έως 100 nm και η σχετικά μέγιστη απορρόφηση είναι από 500 έως 550 nm [75]. Αυτή η ζώνη απορρόφησης συνήθως απουσιάζει στα μικρά νανοσωματίδια.

Επιπρόσθετα, τα Au-Nps έχουν την ικανότητα ως δέκτες ηλεκτρονίων να αποσβένουν τις φθορίζουσες ιδιότητες τους όταν υποβάλλονται στη διαδικασία **της φωτοδιέγερσης μεταφοράς ηλεκτρονίων (PET)** [76]. Η PET απελευθερώνει τον χρυσό πυρήνα που μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην κατασκευή ενός βιοαισθητήρα. Διάφορες μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί από τους ερευνητές για να συνθέσουν Au-Nps. Συνήθως αυτό γίνεται είτε σε υδατικά ή σε οργανικά διαλύματα.



Σχήμα 3.3: Γενική απεικόνιση ενός νανοσωματιδίου του χρυσού (Au-Nps)

Στα παρακάτω υποκεφάλαια παρουσιάζονται ειδικότερες εφαρμογές των βιοαισθητήρων είτε με μήτρα γραφενίου ή με χρήση Au-Nps αλλά και με χρήση απλής χρυσής επιφάνειας.

3.2.1. Έλεγχος γλυκόζης

Για πρώτη φορά ο έλεγχος γλυκόζης με βιοαισθητήρες εφαρμόστηκε το 2009 με χρήση γραφενίου τροποποιημένου με πολυβινυλοπυρρολιδόνη που χρησιμοποιήθηκε σε υδατικά διαλύματα [77]. Η τεχνική κατασκευής περιελάμβανε την ακινητοποίηση της βιοσυμβατής οξειδάσης της γλυκόζης στο γραφένιο. Ο προτεινόμενος βιοαισθητήρας έδειξε καλή γραμμική απόκριση σε δυναμικό εύρος (2-14 mM) και καλή αναπαραγωγικότητα και σταθερότητα.

Το 2010 σχεδιάστηκε ένας βιοαισθητήρας γλυκόζης στηριζόμενος σε νανόφυλλα γραφενίου [78], που συνδέθηκαν ομοιοπολικά με την οξειδάση της γλυκόζης. Η ομοιοπολική δομή γραφένιο-οξειδάση της γλυκόζης λειτούργησε στην υαλώδη επιφάνεια του ηλεκτροδίου του άνθρακα. Το υαλώδες ηλεκτρόδιο άνθρακα τροποποιήθηκε με πορώδη πολυπυρρόλιο και το σύστημα είχε όριο ανίχνευσης (LOD=3 μM). *

Την ίδια χρονιά παρουσιάστηκε μια νέα μέθοδο για την κατασκευή ενός βιοαισθητήρα γλυκόζης διαμέσω μιας ηλεκτροκαταλυτικής αναγωγής του οξυγόνου

στο ηλεκτρόδιο της οξειδάσης της γλυκόζης με γραφένιο [79]. Σε αυτή την εργασία σε δυναμικό εύρος (0,1-10 mM) είχαμε ευαισθησία $110 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ με όριο ανίχνευσης (LOD=12 μM).

Το 2011 κατασκευάστηκε ένας σύνθετος βιοαισθητήρας αποτελούμενος από γραφένιο και θειούχο κάδμιο για ακινητοποίηση της οξειδάσης της γλυκόζης [80]. Ο ρυθμός μεταφοράς των ηλεκτρονίων για την οξείδωση της γλυκόζης ήταν $5,9 \text{ s}^{-1}$. Ο βιοαισθητήρας είχε ένα δυναμικό εύρος (2-16 mM) και όριο ανίχνευσης (LOD=0,7 mM), με αμελητέα απόκριση σε συνηθισμένες παρεμποδίζουσες ουσίες.

Το ίδιο έτος αναπτύχθηκε ένας βιοαισθητήρας γραφενίου με ακινητοποιημένα νανοσωματίδια παλλαδίου/χιτοζάνης για την ανίχνευση της γλυκόζης [81] σε δυναμικό εύρος (1 μM -1 mM) και όριο ανίχνευσης (LOD=0,2 μM) με ευαισθησία $31,2 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ για τη γλυκόζη και χαμηλή σταθερά κορεσμού (Michaelis-Menten) της τάξεως του 1,2 mM. Ταυτόχρονα ένας καινοτόμος βιοαισθητήρας με νανοςύνθετο ανηγμένο οξείδιο του γραφενίου (GO) με διμεταλλικά νανοσωματίδια χρυσού και παλλάδιου (1:1) και με απουσία του αναγωγικού παράγοντα κατασκευάστηκε [82] με μια καλή βιοσυμβατότητα, έναν βελτιωμένο ρυθμό μεταφοράς ηλεκτρονίων και μια μεγάλη ηλεκτροενεργή περιοχή επιφάνειας, καθώς και υψηλή ευαισθησία και σταθερότητα για την αναγωγή του οξυγόνου. Αυτός ο βιοαισθητήρας είχε όριο ανίχνευσης (LOD=6,9 μM) και ευαισθησία $266,6 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$.

Το 2012 αναπτύχθηκε ένας βιοαισθητήρας γλυκόζης χρησιμοποιώντας γραφένιο [83] με συνδυασμό του θετικά φορτισμένου ιοντικού υγρού και της οξειδάσης της γλυκόζης να παρέχει το κατάλληλο μικροπεριβάλλον έτσι ώστε η οξειδάση της γλυκόζης να διατηρεί τη βιοδραστικότητα της για μακροχρόνια περίοδο. Ο προτεινόμενος βιοαισθητήρας είχε ευρύ δυναμικό εύρος και ευαισθησία $5,59 \mu\text{A}/$ δεκάδα συγκεντρώσεων.

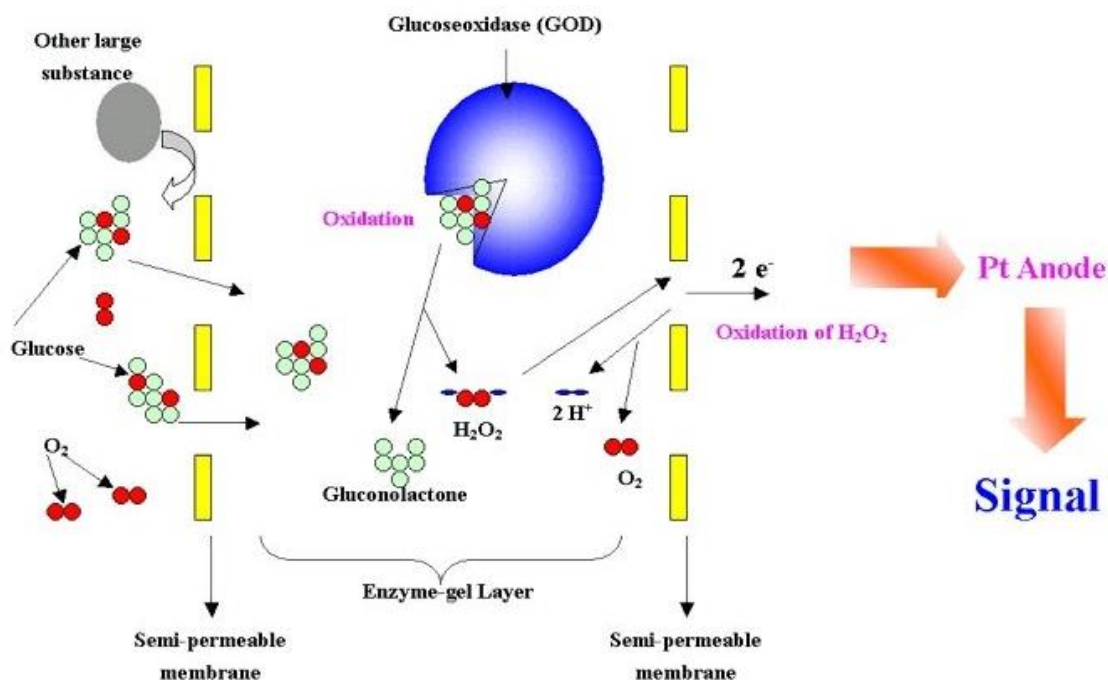
Το 2014 ο Xue και οι συνεργάτες του κατασκεύασαν ένα τριμερές νανοςύνθετο από διεσπαρμένα Au-Nps σε επιφάνεια του RGO με τη χρήση πολυπυρρόλης (Ppy) που παρουσίαζε σημαντικές ηλεκτροκαταλυτικές ιδιότητες και μεγάλο δυναμικό εύρος κατά την ανίχνευση της γλυκόζης [84].

Το 2015 κατασκευάστηκε ένας βιοαισθητήρας γλυκόζης με εναπόθεση Au-Nps με τροποποίηση από ένα ομοιογενές μίγμα πολυβινυλοπυρρολιδόνης-πολυανιλίνης σε υαλώδη ηλεκτρόδια χαλκού (GCE). Η οξειδάση της γλυκόζης (GOx) ακινητοποιήθηκε επί των παρασκευασθέντων νανοςύνθετων χρησιμοποιώντας Nafion ως στρώμα επικάλυψης [85].

Την ίδια χρονιά κατασκευάστηκε βιοαισθητήρας με σταθεροποιημένα βιοπολυμερή πηκτίνης και Au-Nps σε νανοσωλήνες άνθρακα με γραφένιο για την ανίχνευση της γλυκόζης. Το ένζυμο της οξειδάσης της γλυκόζης (GOx) σε αυτή την περίπτωση ακινητοποιήθηκε με επιτυχία σε φιλμ που περιείχαν Au-Nps και παρατηρήθηκε άμεση μεταφορά ηλεκτρονίων [86]. Ο Sabury και οι συνεργάτες του το ίδιο έτος πρότειναν έναν νέο βιοαισθητήρα για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της γλυκόζης με χρήση Au-Nps [87].

Η μελέτη του He του 2016 περιείχε μια εφαρμογή με ακινητοποίηση in situ (επί τόπου) των Au-Nps με σημαντική ενίσχυση στη μεταφορά ηλεκτρονίων του ενζύμου

της οξειδάσης της γλυκόζης (Gox) [88]. Την ίδια χρονιά δημιουργήθηκε ένας βιοαισθητήρας, όπου συντέθηκε νανοσωματίδιο αζώτου τροποποιημένο με (Au-NPs/NG), για την ανίχνευση της γλυκόζης και της ντοπαμίνης [89]. Σε εργασία του ίδιου έτους κατασκευάστηκε ένας βιοαισθητήρας για την ανίχνευση της γλυκόζης χρησιμοποιώντας πολυμερή της ανιλίνης και της αμίνης, όπου τροποποιήθηκε η επιφάνειά τους με μερκαπτοαιθανοθειονικό οξύ και με Au-Nps [90].



Σχήμα 3.4: Τυπική απεικόνιση βιοαισθητήρα για την ανίχνευση γλυκόζης

Το 2016 ξεκίνησαν οι έρευνες για την κατασκευή βιοαισθητήρων τρίτης γενιάς με σύνθετο πολυμερές από γραφένιο και Au-Nps, όπου γίνεται ακινητοποίηση της οξειδάσης της γλυκόζης από την ερευνητική ομάδα του Rafighi [91].

Το 2017 ο Gao και οι συνεργάτες του [92] χρησιμοποίησαν τα Au-NPs σε συνδυασμό με νανοσωματίδια αλουμινίου για να δημιουργήσουν μια πλασμονική πλατφόρμα χρωματομετρικής ανίχνευσης της γλυκόζης. Τα Au-NPs ενήργησαν βιομιμητικά ως προς το ένζυμο της οξειδάσης της γλυκόζης (GOD), προκειμένου να παραχθεί υπεροξείδιο του υδρογόνου, που τα νανοσωματίδια του αλουμινίου διαλύονταν σε αυτό με αποτέλεσμα αλλαγές στο χρώμα του διαλύματος. Μια νέα και αποδοτική μέθοδος βιοανθεκτικής επιφανειακής νανο-κατασκευής με χρήση νανοϊών εγκλωπωμένων με Au-Nps προτάθηκε από τον Sarountzi και τους συνεργάτες του [93] το ίδιο έτος. Σε αυτήν την εργασία περιγράφεται η απευθείας μεταφορά ηλεκτρονίων στην επιφάνεια των νανοϊών με καλή ευαισθησία, δυναμικό εύρος και εκλεκτικότητα.

Επίσης το ίδιο έτος προτάθηκε η κατασκευή ενός βιοαισθητήρα με Au-Nps εγκλωπωμένα σε νανόφυλλα μολυβδένιου χρησιμοποιώντας ένα απλό, φθινό και υψηλής τάξης δισδιάστατο βιοσύστημα, το οποίο ήταν εξαιρετικά ευαίσθητο, εκλεκτικό και σταθερό [94]. Ταυτόχρονα ερευνητές χρησιμοποίησαν τροποποιημένο βιοαισθητήρα γραφενίου με οξειδάση της γλυκόζης και χιτοζάνη [95] με την ποσότητα του ενζύμου στην επιφάνεια να είναι περίπου $1,12 \times 10^{-9} \text{ mol/ cm}^2$ και να έχει βρεθεί

σε δυναμικό εύρος (0,1- 10 mM) ένα χαμηλό όριο ανίχνευσης (LOD=12 μM) με ευαισθησία $110 \pm 3 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$.

Το γραφένιο και τα νανοσύνθετά του έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη και μη-ενζυματικών βιοαισθητήρων. Ο μη-ενζυματικός βιοαισθητήρας συνοδεύεται από αρκετά πλεονεκτήματα, όπως η μη χρήση ακριβών ενζύμων και αποφυγή της απώλειας της δραστηριότητάς τους. Αυτή είναι μια νέα προσέγγιση όπου το γραφένιο δρα ως ηλεκτροενεργό υλικό σε σύνθετες νανοδομές. Για παράδειγμα έχει κατασκευαστεί βιοαισθητήρας με Au-Nps υψηλής πυκνότητας με τη χρήση θειονίνης και οξειδίου του γραφενίου, μέσω της χημικής αναγωγής του H AuCl_4 με κιτρικό νάτριο [96]. Η θειονίνη ενισχύει την προσρόφηση των αρνητικά φορτισμένων AuCl_4 στην επιφάνεια του οξειδίου του γραφενίου, η οποία βοηθά στην εναπόθεση των Au-Nps. Το υαλώδες ηλεκτρόδιο άνθρακα που λειτουργεί με αυτό τον τρόπο έχει δείξει σημαντική ηλεκτροκαταλυτική τάση για το ένζυμο χωρίς την οξείδωση της γλυκόζης με δυναμικό εύρος (0,2-13,4 mM) και χαμηλό όριο ανίχνευσης (LOD=0,05 μM).

Ένας μη-ενζυματικός βιοαισθητήρας γλυκόζης χρησιμοποιήθηκε με εναπόθεση μεταλλικών νανοσωματιδίων χαλκού σε νανόφυλλα γραφενίου [97]. Σε αυτόν παρατηρήθηκε μία ενισχυμένη ηλεκτροκαταλυτική απόκριση στη γλυκόζη σε σχέση με τον βιοαισθητήρα που είχε ένα απλό φύλλο γραφενίου. Αυτός ο βιοαισθητήρας είχε όριο ανίχνευσης (LOD=0,5 μM) με ευαισθησία 500 mV.

3.2.2. Έλεγχος υπεροξειδίου του υδρογόνου

Το 2010 κατασκευάστηκε ένας βιοαισθητήρας με σύνθετη δομή MnO_2 /οξειδίου του γραφενίου για την ανίχνευση άνευ ενζύμου του υπεροξειδίου του υδρογόνου [98]. Το υβριδικό αυτό υλικό έδειξε μια υψηλή ηλεκτροχημική δραστηριότητα για τον προσδιορισμό του H_2O_2 . Ο μη-ενζυματικός βιοαισθητήρας έδειξε εξαιρετική απόδοση με μικρό δυναμικό εύρος και υψηλή ευαισθησία με χαμηλό όριο ανίχνευσης και μεγάλη διάρκεια ζωής. Η απόδοση αυτού του βιοαισθητήρα οφείλεται στη μεγάλη επιφάνεια του οξειδίου του γραφενίου όπου μπορεί να εναποτεθούν νανοσωματίδια MnO_2 .

Το 2011 έγινε μια διαφορετική προσέγγιση με έναν βιοαισθητήρα που παρασκευάστηκε στρώμα προς στρώμα (layer-by-layer) μέσω συνδυασμένων αρνητικά φορτισμένων νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου και θετικά φορτισμένου πολυχλωριούχου διαλλυλοδιμεθυλαμμωνίου διαμέσω ηλεκτροστατικής έλξης [99]. Η χρήση του γραφενίου με ένα πολυμερές (πολυχλωριούχο διαλλυλοδιμεθυλαμμώνιο) ενίσχυσε σημαντικά την απόδοση του βιοαισθητήρα εξαιτίας της σχέσης του εμβადού με την επιφάνεια και της καλής ηλεκτρικής αγωγιμότητας. Λόγω αυτών των πλεονεκτημάτων υπήρξε μια σημαντική ηλεκτροκαταλυτική τάση για την ανίχνευση του H_2O_2 με μεγάλο δυναμικό εύρος (20 μM -6,25 mM) και χαμηλό όριο ανίχνευσης (LOD=2,5 μM).

Το 2012 κατασκευάστηκε ένας άνευ ενζύμου βιοαισθητήρας με χρήση σύνθετου φιλμ νανοσυσσωματωμάτων πολυνουκλεοτιδίου που εναποτέθηκε σε ένα φιλμ Ag/γραφενίου για την ανίχνευση του H_2O_2 [100]. Το φιλμ αυτό χρησιμοποιήθηκε λόγω των πολλών ελκυστικών ιδιοτήτων του, όπως η καλή αγωγιμότητα και η

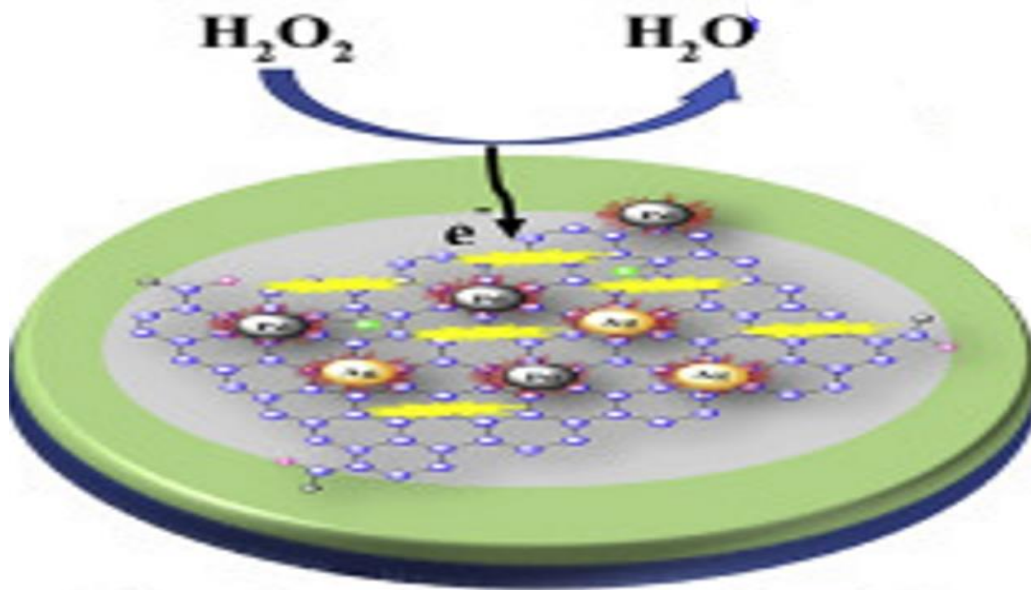
βιοσυμβατότητα κατά την αναγωγή του υδρογόνου στην ακινητοποίηση του ενζύμου επί της επιφάνειας του γραφενίου. Επίσης σε αυτό το φιλμ υπήρξαν ελάχιστες παρεμποδίσεις από άλλες ουσίες πέρα του H_2O_2 . Έτσι ο βιοαισθητήρας αυτός σε μικρό δυναμικό εύρος (15 mM-23 mM) είχε καλή εκλεκτικότητα και επαναληπτικότητα

Το 2013 αναφέρθηκε ένας βιοαισθητήρας H_2O_2 που έγινε χρήση νανოსύνθετου Nafion / απολεπισμένου οξειδίου του γραφενίου / CO_3O_4 σε ηλεκτρόδιο GC [101]. Ο βιοαισθητήρας αυτός έδειξε σταθερό οξειδοαναγωγικό σήμα όταν ελέγχθηκε σε αλκαλικά και ουδέτερα διαλύματα με ένα χαμηλό όριο ανίχνευσης ($LOD= 0,3 \mu mol l^{-1}$) και ευαισθησία $560 \mu A mmol^{-1} cm^{-2}$.

Το 2015 πρωτοεμφανίστηκαν οι βιοαισθητήρες με χρήση Au-Nps και διπεπτιδίου της διφαινυλαλανίνης (FF) προκειμένου να τροποποιηθεί κατάλληλα η επιφάνεια για να ακινητοποιηθεί σε HRP προκειμένου να κατασκευαστεί ένας αμπερομετρικός βιοαισθητήρας για την ανίχνευση του H_2O_2 [102].

Το 2016 μια μελέτη του Boujakhrouit και των συνεργατών του [103] έδωσε μια τέτοια τροποποίηση στα Au-Nps, που έγινε με 4-μερκαπτοπυριδίνη και 6-μέρκαπτο-1-εξανόλη, ώστε να κατασκευαστεί ένας νέος αμπερομετρικός βιοαισθητήρας με υβριδικά νανοςύνθετα μίγματα (Ag: 4,40-διπυριδίνης), που χρησιμοποιήθηκαν για να τροποποιήσουν τα ηλεκτρόδια του υαλώδους άνθρακα (GCE) ώστε να ανιχνεύουν το H_2O_2 σε πικομοριακές ποσότητες [103].

Το 2017 ο Zhang και οι συνεργάτες του αναφέραν έναν μη ενζυμικό βιοαισθητήρα με ηλεκτροεναπόθεση Au-Nps σε πορώδη ηλεκτρόδιο GaN για την ανίχνευση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2). Το πορώδες αυτό ηλεκτρόδιο επέδειξε μια καλή ηλεκτροκαταλυτική δραστηριότητα για τη μη ενζυμική ανίχνευση του H_2O_2 με αυξημένη ευαισθησία [104]. Ενός οπτικός χρωμομετρικός βιοαισθητήρας προτάθηκε από τον Rivero και τους συνεργάτες του [105] το ίδιο έτος, όπου για τον σχεδιασμό του χρησιμοποιήθηκαν τόσο νανοσωματίδια Χρυσού (Au-NPs) όσο και νανοσωματίδια αργύρου (Ag-NPs). Το αποτέλεσμα σε αυτή την περίπτωση έδειξε μεγάλη απόδοση, καλή ευαισθησία και εκλεκτικότητα στην ανίχνευση του H_2O_2 [105]. Την ίδια εποχή αναπτύχθηκε ένας εύρηστος βιοαισθητήρας με τη σύνθεση υβριδίων του SnS_2 / χρυσών νανοσωματιδίων ($SnS_2/Au-NPs$) για την ανίχνευση του H_2O_2 [106].



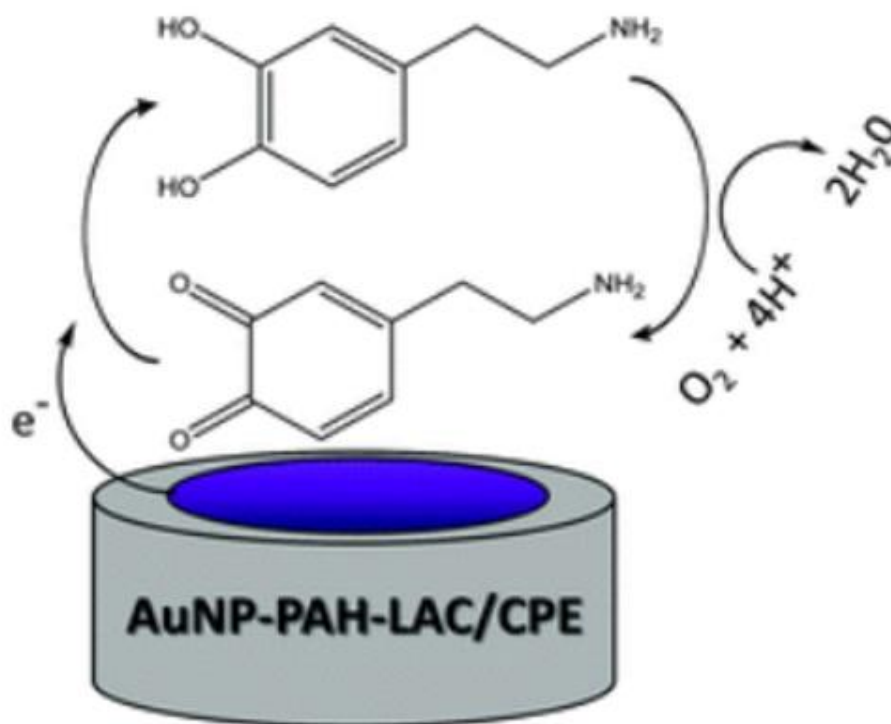
Σχήμα 3.5: Τυπική απεικόνιση βιοαισθητήρα για την ανίχνευση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2)

3.2.3. Έλεγχος ντοπαμίνης

Το 2010 αναπτύχθηκε ένας βιοαισθητήρας νανοσωματιδίων Pt/IL/ γραφενίου για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό του ασκορβικού οξέος και της ντοπαμίνης [107]. Οι δύο κορυφές οξείδωσης διέφεραν σημαντικά, άρα μπορούσε να γίνει διάκριση μεταξύ του ασκορβικού οξέος και της ντοπαμίνης. Ως εκ τούτου παρατηρήθηκαν τρεις κορυφές ευδιάκριτες σε ανθρώπινο δείγμα ούρων το οποίο περιείχε ασκορβικό οξύ και ντοπαμίνη. Αυτοί οι βιοαισθητήρες είχαν αξιόπιστο αυτόνομο χρόνο ζωής και καλή επαναληπτικότητα.

Το 2013 μια ερευνητική ομάδα ανέπτυξε έναν βιοαισθητήρα που έδειξε εξαιρετική δραστηριότητα για την οξείδωση της ντοπαμίνης [64]. Ο βιοαισθητήρας είχε καλό δυναμικό εύρος (0,03 mM-3,82 mM) και χαμηλό όριο ανίχνευσης (LOD=1,20 nM) ενώ εμφάνιζε μια εξαιρετική καταλυτική δράση, ευαισθησία, επαναληπτικότητα και εκλεκτικότητα .

Το 2015 παρουσιάστηκε ένας βιοαισθητήρας με χρήση Au-NPs [108] για την ανίχνευση της ντοπαμίνης με δυναμικό εύρος (0.49 -23.0 $\mu\text{mol/L}$) και όριο ανίχνευσης (LOD= 0.26 $\mu\text{mol/L}$). Ο βιοαισθητήρας που αναπτύχθηκε φαίνεται στο σχήμα 3.5.



Σχήμα 3.6: Τυπική απεικόνιση βιοαισθητήρα για την ανίχνευση της Ντοπαμίνης [αναπτύχθηκε στην αναφορά [108]]

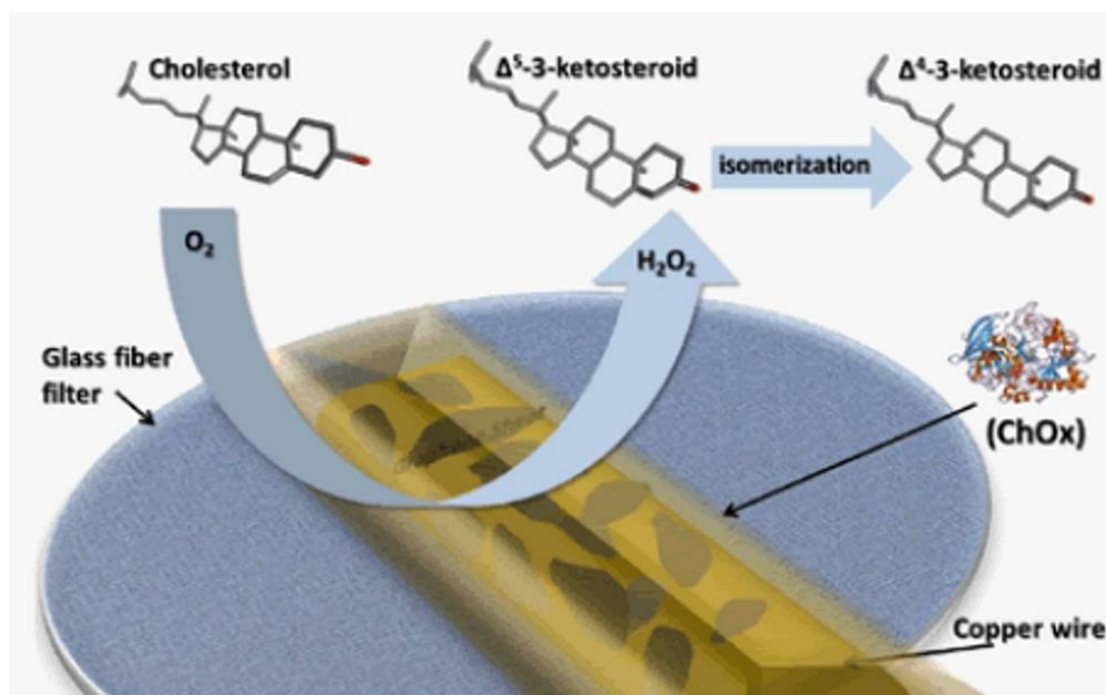
3.2.4. Έλεγχος χοληστερόλης

Η χοληστερόλη είναι κάτι που βρίσκεται τόσο στους ανθρώπινους οργανισμούς όσο και στο ζωικό βασίλειο. Είναι ένα από τα κυριότερα συστατικά πολλών βιολογικών, καθώς και του χολικού οξέος και των στεροειδών των ορμονών. Το αυξανόμενο επίπεδο της χοληστερόλης στο ανθρώπινο σώμα είναι υπεύθυνο για τις ασθένειες, τις καρδιακές παθήσεις, την εγκεφαλική θρόμβωση και την αθηροσκλήρωση, οπότε η ακριβής μέτρηση της χοληστερόλης είναι απαραίτητη για την ιατρική γνωμάτευση [109].

Έτσι το 2010 κατασκευάστηκε ένας ευαίσθητος αμπερομετρικός βιοαισθητήρας γραφενίου με χρήση υβριδικού υλικού βασισμένου στο σύνθετο των νανοσωματιδίων Pt [110], όπου έγινε ακινητοποίηση της οξειδάσης και της εστεράσης της χοληστερόλης με χαμηλό όριο ανίχνευσης (LOD=0,2 μM) και υψηλή ευαισθησία ($2,07 \pm 0,1 \mu\text{A} / \mu\text{M cm}^2$), που οφείλεται στη διαδραστική φύση του γραφενίου και των νανοσωματιδίων του Pt.

Η οξειδάση της χοληστερόλης που ακινητοποιήθηκε σε νανόφυλλα γραφενίου με φυσική μέθοδο προσρόφησης σε εργασία που έγινε το 2011 παρουσίασε καλή επαναληπτικότητα και ευαισθησία σε μεγάλο δυναμικό εύρος (1 μM -1mM) [65] με

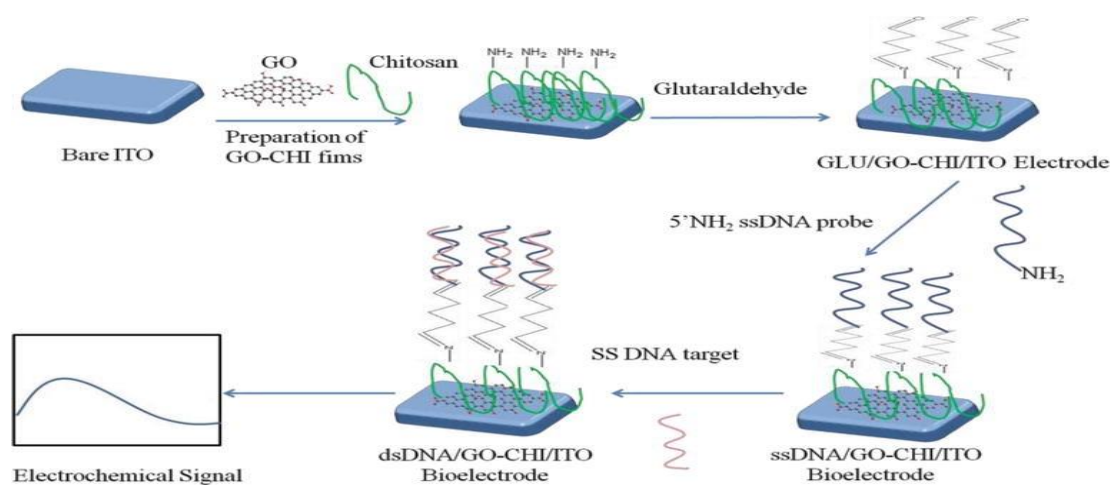
γρήγορο χρόνο απόκρισης 4 s και καλή επαναληπτικότητα. Ο βιοαισθητήρας αυτός απεικονίζεται στο σχήμα 3.7



Σχήμα 3.7: Τυπική απεικόνιση βιοαισθητήρα για την ανίχνευση της Χοληστερόλης [αναπτύχθηκε στην αναφορά [65]]

3.2.5. Έλεγχος κυτοχρώματος c

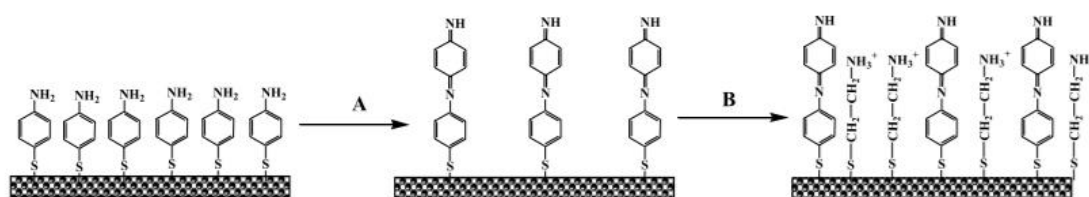
Το 2008 παρατηρήθηκε ότι για να υπάρξει ροή ηλεκτρονίων μεταξύ του κυτοχρώματος C και της επιφάνειας του γραφενίου χρειάζεται να γίνει η τροποποίηση σε φύλλα άνθρακα [111] με GO. Έτσι το 2010 έγινε εφικτή η κατασκευή ενός βιοαισθητήρα (Σχήμα 3.8) όπου κατασκευάστηκε πρώτα με εναπόθεση του μίγματος χιτοζάνης (Chitosan)/γραφενίου και στη συνέχεια του κυτοχρώματος C με σταθερά ροής ηλεκτρονίων 1,95 s⁻¹ [110]



Σχήμα 3.8: Τυπική απεικόνιση βιοαισθητήρα για την ανίχνευση του κυτοχρώματος C [αναπτύχθηκε στην αναφορά [110]]

3.2.6 Έλεγχος Νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτιδίου (NADH)

Το 2001 κατασκευάστηκε ο πρώτος βιοαισθητήρας γραφενίου με οξείδωση του NADH σε επιφάνεια ανθρακικού γραφενίου (GC) σε ουδέτερο διάλυμα με αργό ρυθμό μεταφοράς ηλεκτρονίων [67]. Το NADH θεωρείται ένα απαραίτητο συνένζυμο που εμπλέκεται σε μεγάλο αριθμό ενζυματικών αντιδράσεων με βάση την αφυδρογονάση (δηλαδή, πάνω από 300) [112]. Η ηλεκτροκαταλυτική οξείδωση του NADH έχει μελετηθεί ως μέρος ενός πειράματος κατά την κατασκευή αναλυτικών βιοσυσσκευών αφυδρογονάσης. Έτσι αναπτύχθηκε ένας βιοαισθητήρας NADH χρησιμοποιώντας ηλεκτροστατικό λειτουργικό γραφένιο με υδατοδιαλυτό ηλεκτροενεργό πράσινο του μεθυλενίου (Methylene Green, MG) [112].



Σχήμα 3.9: Τυπική απεικόνιση βιοαισθητήρα για την ανίχνευση του NADH [αναπτύχθηκε στην αναφορά [67]]

Η αμπερομετρική μέτρηση για αυτό το ηλεκτρόδιο έδειξε ότι σε ένα σχετικά μικρό δυναμικό εύρος (0,25-2mM) υπήρχε μια μέγιστη ευαισθησία της τάξεως του $37,43 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$.

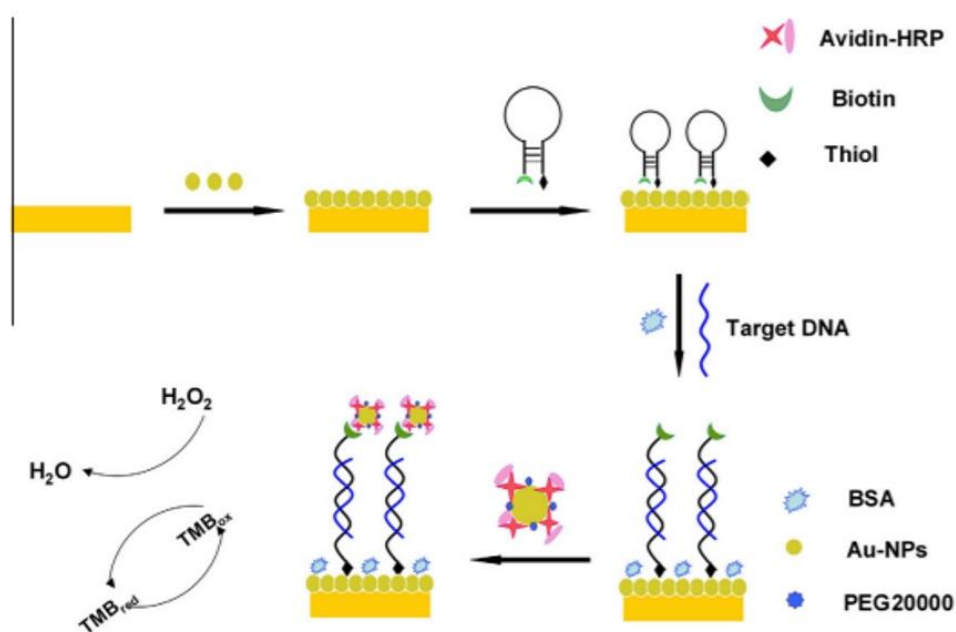
3.2.7 Έλεγχος DNA

Είναι εξαιρετικά πολύτιμο να έχουμε συσκευές οι οποίες είναι ευαίσθητες, εκλεκτικές, γρήγορες και φθηνές για την ανίχνευση βιομορίων και για την κλινική διάγνωση. Έτσι ο συνδυασμός του γραφενίου και του ssDNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό βιομορίων. Οι (G, A, Ενός, και C) βάσεις είναι ανιχνεύσιμες ηλεκτροχημικά και για την ανάπτυξη των βιοαισθητήρων DNA [68-70].

Μια μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε το 2011 ήταν η ενσωμάτωση νανοσωματιδίων του αργύρου σε φύλλα οξειδίου του γραφενίου (GO) που ενίσχυαν το σήμα για τον καθορισμό των βακτηρίων [113], την γρήγορη ανάλυση των πρωτεϊνών και του DNA. Για αυτό το λόγο μια άλλη ερευνητική ομάδα κατασκεύασε ένα βιοαισθητήρα γραφενίου με συνδυασμό με ανιχνεύσιμου ssDNA για τον εκλεκτικό και ευαίσθητο προσδιορισμό διαφόρων αναλυτών [114]. Επίσης μια άλλη ομάδα ανέφερε έναν βιοαισθητήρα DNA με εναπόθεση Prussian Blue (PB) σε μια πάστα άνθρακα [115]. Σε αυτή την περίπτωση παρατηρήθηκε ότι η σύζευξη του ηλεκτροδίου PB με το γραφένιο αύξανε το ρεύμα εξόδου, δηλαδή το σήμα. Επίσης αναφέρθηκε ένας εκλεκτικός, ευαίσθητος, απλός και ακριβής αγωγιμομετρικός ανοσοαισθητήρας που στηρίζεται σε γραφένιο για τον προσδιορισμό των θαλάσσιων παθογόνων Sulfate Reducing Bacteria (βακτήρια που ανάγουν το θείο) [116].

Το 2014 μια ερευνητική ομάδα έφτιαξε έναν απτοαισθητήρα τροποποιημένο με GO και RGO και DNA απταμερές προκειμένου να ανιχνεύσουν στους μικροοργανισμούς τον σταφυλόκοκκο [117] με πολύ υψηλή εκλεκτικότητα? Ταυτόχρονα εφευρέθηκε ένας βιοαισθητήρας για την ανίχνευση του γονιδίου K-ras, όπου χρησιμοποιήθηκε μια σύζευξη μεταξύ Au-Nps και HRP για την ενίσχυση του σήματος. Ο βιοαισθητήρας αυτός εφαρμόστηκε σε ένα μικρό μονόκλωνο ολιγονουκλεοτιδικό μοντέλο και σε ένα δίκλωνο γονιδιακό DNA και έπειτα από την διερεύνηση της ανάκτησής του σε δείγμα ορού υπήρχε η δυνατότητα ποιοτικής και ποσοτικής ανίχνευσης του γονιδίου K-ras στον καρκίνο του παγκρέατος [118].

Το 2015 η ερευνητική ομάδα του Sattaramady ανακάλυψε έναν νανοβιοαισθητήρα DNA βασισμένο σε Au-Nps/ολιγονουκλεοτίδια για την οπτική ανίχνευση της *Brucella* spp. Τα Au-Nps ενεργοποίησαν ένα ειδικό ολιγονουκλεοτιδικό ανιχνευτή από την περιοχή του γονιδίου IS711 [119]. Ταυτόχρονα αναφέρθηκε ένας βιοαισθητήρας DNA που τα Au-Nps τροποποιήθηκαν με τρανζίστορ γραφενίου (FET) για εξαιρετικά ευαίσθητη, επιλεκτική και χωρίς δείκτη (label-free) ανίχνευση του miRNA [120].



Σχήμα 3.10:Τυπική απεικόνιση βιοαισθητήρα για την ανίχνευση DNA [αναπτύχθηκε στην αναφορά [118]]

Ο wang και οι συνεργάτες του την ίδια χρονιά πρότειναν έναν βιοαισθητήρα DNA με αλυσιδωτή αντίδραση υβριδοποίησης (HCR), που προκλήθηκε από ένα στόχο για την ανίχνευση DNA υψηλής ηλεκτροχημικής χημικής φωταύγειας (ECL). Ο αισθητήρας αυτός κατασκευάστηκε ακινητοποιώντας έναν ανιχνευτή δέσμευσης (CP) σε χρυσό ηλεκτρόδιο μέσω ενός δεσμού Au-S [121].

Το 2016 σχεδιάστηκε ένας υπερευαίσθητος ηλεκτροχημικός βιοαισθητήρας DNA βασισμένος στη συναρμολόγηση πολύ αγώγιμων Au-Nps σε ελεύθερο χώρο του ανιχνευτή DNA. Ο βιοαισθητήρας αυτός επέδειξε ισχυρή ικανότητα εκλεκτικότητας,

αναγέννησης και υβριδοποίησης [122]. Αυτός είναι ένας εξίσου ευαίσθητος βιοαισθητήρας DNA που αναπτύχθηκε από τον Hajihosseini και τους συνεργάτες του το ίδιο έτος με χρήση του Au-Nps για την ανίχνευση του ελικοβακτηρίου της πυρρόλης χρησιμοποιώντας διαφορεική παλμική βολταμετρία (DPV). Σε αυτή τη περίπτωση ένα μονόκλωνο DNA ακινητοποιήθηκε σε GO/Au-Nps/GCE με καλή εκλεκτικότητα [123].

Το ίδιο έτος η ερευνητική ομάδα του McVey [124] πρότεινε μια πρωτοποριακή προσέγγιση για την συσσωμάτωση των πλασμονίων στα Au-Nps με ενδοουκλεάση για την ανίχνευση ενός βακτηριακού DNA χωρίς δείκτη (label-free). Σε αυτή την περίπτωση τα Au-Nps, που λειτουργούσαν σχημάτισαν ετεροδιπολικές δομές DNA-RNA μέσω ειδικού υβριδισμού [124]. Το ίδιο έτος επίσης κατασκευάστηκε επιτυχώς ένας βιοαισθητήρας DNA από τον Mohammed και τους συνεργάτες του [125] συνενώνοντας τα Au-Nps με θερμικά οξειδωμένο λεπτό φιλμ SiO₂.

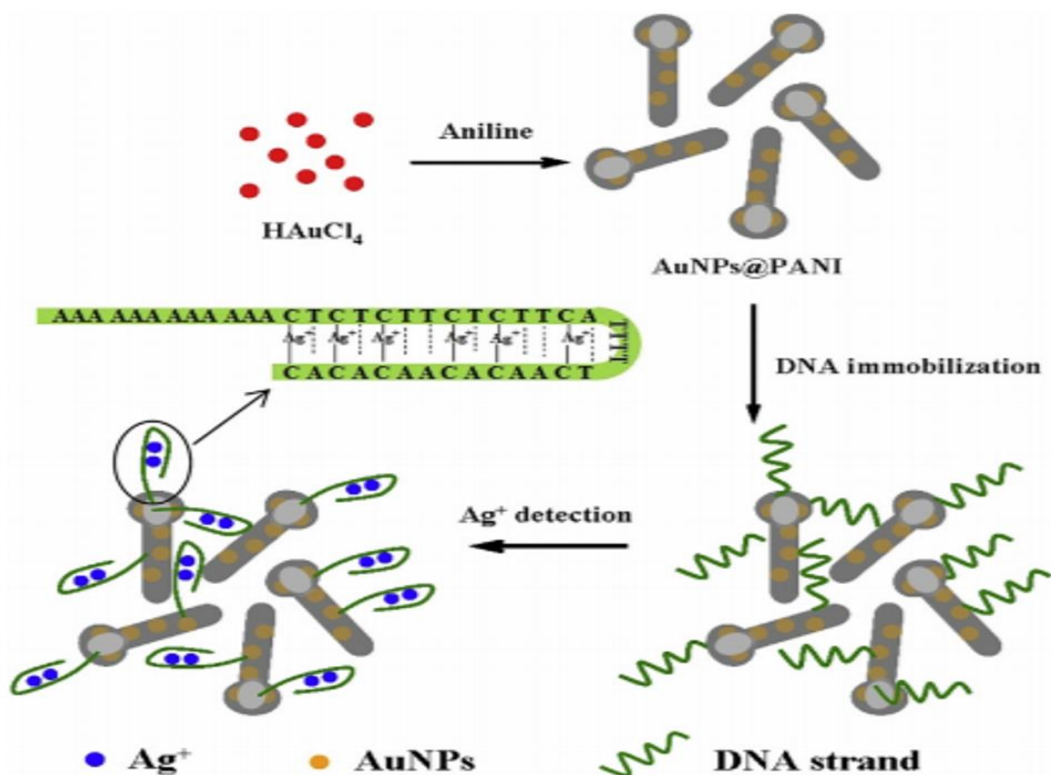
Μια άλλη μέθοδος προτάθηκε το ίδιο έτος από την ερευνητική ομάδα του Sattaramady, βασισμένη σε τροποποίηση Au-Nps με ειδικό ανιχνευτή μονής αλυσίδας DNA για την ανίχνευση Leishmania [126]. Επίσης προτάθηκε ένας χωρίς ένζυμα εξαιρετικά ευαίσθητος SPR βιοαισθητήρας για την ανίχνευση του miRNA από τον Wang και τους συνεργάτες του [127].

Ο Esmaeili και οι συνεργάτες του το 2017 [128] χρησιμοποίησαν τα Au-NPs σε συνδυασμό με την πολυπυρρόλη στην κατασκευή ενός βιοαισθητήρα για την ανίχνευση του DNA. Ο βιοαισθητήρας αυτός εφαρμόστηκε στην ταξινόμηση των ψαριών Arowana. Την ίδια χρονιά ένας υπερευαίσθητος ηλεκτροχημικός βιοαισθητήρας τύπου σάντουιτς αναπτύχθηκε για την ανίχνευση του microRNA (miRNA) με βάση τα υβρίδια του οξειδίου του μαγνησίου (MgO) και τα υβρίδια του οξειδίου του γραφένιου-Au-Nps που συνδέονται με το σύστημα της βιοανίχνευσης με μια καλή εκλεκτικότητα και ένα χαμηλό όριο ανίχνευσης [129].

3.2.8. Έλεγχος βαρέων μετάλλων

Ο Peng και οι συνεργάτες του ανακαλύψαν το 2014 έναν βιοαισθητήρα για ανίχνευση του Pb²⁺, που βασίζεται σε τυπικό εικοσαεδρικό ακινητοποιημένο Au-NPs και σε κύκλο (RCA) [130]. Το 2015 Ο yang και η ερευνητική του ομάδα πρότειναν έναν βιοαισθητήρα βασισμένο σε ηλεκτροχημικό DNA, που αποτελείται από πολυανιλίνη και Au-Nps για την ανίχνευση της συγκέντρωσης του Ag⁺ με καλή εκλεκτικότητα και επαναληψιμότητα [131].

Το 2015 επίσης παρουσιάστηκε ένας βιοαισθητήρας για την ανίχνευση του Ag⁺, που βασίστηκε σε υβριδισμένο DNA χρησιμοποιώντας πράσινο αιθύλιο (EG) εγκολλημένο στην επιφάνεια ενός ηλεκτροδίου άνθρακα (CPE) με ακινητοποιημένα Au-Nps. Αυτός ο βιοαισθητήρας παρουσίασε καλή εκλεκτικότητα μεταξύ των ιόντων Ag⁺ για την ανίχνευση παρουσία αρκετών μεταλλικών ιόντων όπως του Pb²⁺, Cu²⁺, Ca²⁺, Zn²⁺, Fe²⁺ και του Hg²⁺ [132]



Σχήμα 3.11: Τυπική απεικόνιση βιοαισθητήρα για την ανίχνευση βαρέων μετάλλων [αναπτύχθηκε στην αναφορά [131]]

Ο Taghdisi και οι συνεργάτες του το 2015 ανέπτυξαν έναν εκλεκτικό, ευαίσθητο και χρωμομετρικό βιοαισθητήρα για την ανίχνευση του Pb^{+2} , που βασίζεται σε πολυαιθυλανιμίνη με εγκλωπωμένα Au-Nps [133]. Αυτός ο βιοαισθητήρας είχε υψηλή εκλεκτικότητα και χαμηλό όριο ανίχνευσης (LOD) [133]. Το ίδιο έτος προτείνεται αυτός ο ευαίσθητος, εκλεκτικός και φθορομετρικός βιοαισθητήρας για την ανίχνευση του Hg^{2+} σε υδατικό διάλυμα χρησιμοποιώντας θειόλη, DNA και Au-Nps όπου λειτουργούν με μεταφορά ενέργειας φθορισμού (FRET) μεταξύ του δότη (fluorescein, FAM) και του δέκτη (Au-Nps) [134].

Το 2016 αναπτύχθηκε ένας βιοαισθητήρας με διασπορά Au-Nps σε νανοϊνες άνθρακα (Au-NPs/CNFs) με εξαιρετική δραστηριότητα και ευαισθησία για την ανίχνευση ιόντων βαρέων μετάλλων μέσω μιας ηλεκτροσυσσωμάτωσης και μιας θερμικής αναγωγής *in situ* [135]. Την ίδια χρονιά ο Wang και οι συνεργάτες του [136] αναφέρουν έναν ευαίσθητο, εκλεκτικό και αναγεννήσιμο βιοαισθητήρα για τον προσδιορισμό ιόντων υδραργύρου (Hg^{2+}), που βασίζονται σε Θυμίνη (T) που ακινητοποιήθηκε σε Au-NPs/RGO νανοςύνθετα. Ο προτεινόμενος βιοαισθητήρας βρέθηκε ότι είναι ιδιαίτερα ευαίσθητος στον Hg^{2+} [136].

Κεφ 4: Βιβλιογραφική ανασκόπηση στον έλεγχο των τοξινών στο γάλα και στο νερό με βιοαισθητήρες χρυσού και γραφενίου

4.1.Εισαγωγή

Ο όρος τοξίνη αναφέρεται σε κάθε ουσία που είναι δηλητηριώδης για έναν οργανισμό. Ο όρος συνήθως χρησιμοποιείται με στενότερη έννοια για να δηλώσει πρώτον το δηλητήριο που απαντά σε ορισμένους ζωντανούς οργανισμούς (βιοτοξίνη), δεύτερον μια διαλυτή τοξική ουσία που σχηματίζεται από τα βακτήρια και τρίτον από μια ειδική τοξίνη, που είναι όρος της φυτοπαθολογίας και αναφέρεται σε μια τοξική ουσία η οποία εκκρίνεται από ένα παράσιτο που δρα αποκλειστικά σε όλους τους ξενιστές που βρίσκονται στα φυτά.

Οι **βακτηριακές τοξίνες** προέρχονται από τον μεταβολισμό των βακτηρίων τα οποία είτε ζουν σε έναν προσβεβλημένο οργανισμό ή στα τρόφιμα (π.χ. η αλλαντοτοξίνη (botulinum toxin)). Οι **μυκοτοξίνες** είναι οι τοξικές ουσίες που παράγονται από τους μύκητες. Οι τοξικοί μικρομύκητες προκαλούν μούχλα, αιμορραγίες, νευρολογικές διαταραχές και μπορεί να γίνουν θανατηφόρες.

Πρώτος ο Παστέρ το 1880 παρατήρησε την τοξικότητα, δηλαδή την ιδιότητα μιας ουσίας να προκαλεί τοξικά φαινόμενα, ορισμένων προϊόντων διήθησης από μικροβιακές καλλιέργειες, μερικά χρόνια αργότερα, το 1887, οι Ρου και Γιέρσιν (Roux-Yersin) μελέτησαν τις τοξικές και εμβολιαστικές ιδιότητες του διηθήματος μιας καλλιέργειας βακίλων.

Οι τοξίνες διακρίνονται σε **ενδοτοξίνες**, που είναι συστατικά του βακτηριακού κυττάρου, οι οποίες απελευθερώνονται κατά τη λύση και τον θάνατο των βακτηρίων και σε **εξωτοξίνες** -δηλητήρια, που εκκρίνονται από τα βακτήρια είτε *in vivo* ή *in vitro*.

Οι **ενδοτοξίνες** είναι διαλυτές στο νερό και θερμοσταθερές, δηλαδή δεν καταστρέφονται στους 100°C και δεν καταστρέφονται από την φορμόλη και γενικά ταυτοποιούνται από κάποιο αντιγόνο. Οι **εξωτοξίνες** είναι πολύ πιο τοξικές και προέρχονται από τον βακτηριακό μεταβολισμό και η παραγωγή τους εξαρτάται από την σύσταση του περιβάλλοντός και σε αντίθεση με τις ενδοτοξίνες είναι θερμοασταθείς, δηλαδή καταστρέφονται σε θερμοκρασία 60-80°C. Επίσης αντίθετα με τις ενδοτοξίνες, που προκαλούν αντιδράσεις όποια και αν είναι τα βακτήρια (ενδοτοξινικό σοκ), οι εξωτοξίνες είναι ειδικές και η ένεση τους σε ένα ζώο προκαλεί τα συμπτώματα ενός νόσου (π.χ. τέτανος, αλλαντίαση, διφθερίτιδα).

Οι εξωτοξίνες δηλαδή είναι εμβόλιμες, άρα μπορούν να εμβολιαστούν προοδευτικά σε ένα ζώο και του προσδίδουν μια ειδική ανοσία. Επίσης μπορούν να

αναγεννηθούν από τη φορμόλη με προσεκτική προσθήκη που τους τροποποιεί σε **ανατοξίνες**. Οι εξωτοξίνες είναι συνήθως πρωτεϊνικής φύσης.

Στην εργασία αυτή μελετήθηκε η επίδραση της **βακτηριακής τοξίνης της Χολέρας** σε υφάλμυρο νερό λίμνης και της **μυκοτοξίνης της Αφλατοξίνης M1(AFM1)** στο γάλα. Έτσι παρακάτω γίνεται μια βιβλιογραφική ανασκόπηση μελετών του παρελθόντος σχετικά με αυτές τις τοξίνες.

4.2.Η τοξίνη της Χολέρας

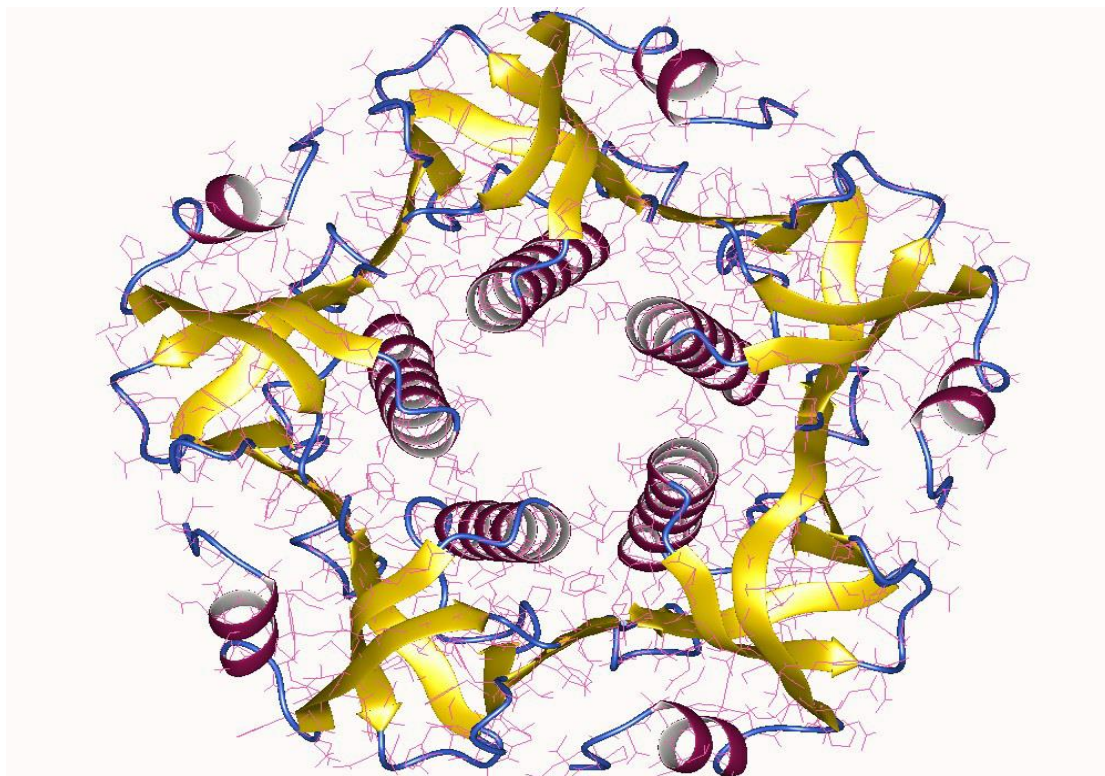
Η χολέρα (γνωστή και ως Ασιατική χολέρα ή Επιδημική χολέρα) είναι ένα νόσημα που προκαλείται από το βακτήριο του Δονάκιου της χολέρας (*Vibrio cholerae*) το οποίο παράγει την τοξίνη της Χολέρας (Cholera toxin) και χαρακτηρίζεται από έντονη διάρροια, η οποία μπορεί να προκαλέσει σοβαρή αφυδάτωση. Οφείλεται συνήθως στην κατανάλωση νερού, γάλακτος, ή τροφών που έχουν μολυνθεί εξαιτίας των ανθυγιεινών τρόπων λειτουργίας των συστημάτων ύδρευσης και αποχέτευσης.

Σύμφωνα με τα στοιχεία του Παγκόσμιου Παρατηρητηρίου για την Υγεία (WHO), τα κρούσματα της χολέρας ανέρχονται σε 4,3 εκατομμύρια περιπτώσεις νοσηρότητας και 142.000 θανάτους ετησίως παγκοσμίως, με υψηλά ποσοστά ενός στην Αφρική και την Ινδία. Η τοξίνη αυτή ανακαλύφθηκε από τον Ινδό μικροβιολόγο Sambhu Nath De το 1959 [28]

Η τοξίνη της χολέρας είναι ένα ολιγομερές σύμπλοκο αποτελούμενο από έξι πρωτεϊνικές υπομονάδες: ένα αντίγραφο της υπομονάδας A (μέρος A, ενζυμικό) και πέντε αντίγραφα της B υπομονάδας (μέρος B, δέσμευση υποδοχέα), που χαρακτηρίζεται ως AB₅. Η υπομονάδα B συνδέεται με την πρωτεΐνη O ενώ η υπομονάδα A ενεργοποιεί την πρωτεΐνη O η οποία ενεργοποιεί την αδενυλική κυκλάση. Η τρισδιάστατη δομή της τοξίνης προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας κρυσταλλογραφία ακτινών X από τον Zhang και τους συνεργάτες του το 1995 [137] (Σχήμα 4.1).

Οι πέντε υπομονάδες B ζυγίζουν 11 kDa και σχηματίζουν έναν πενταμελή δακτύλιο. Η υπομονάδα A η οποία είναι 28 kDa, έχει δύο σημαντικά τμήματα. Το τμήμα A1 (CTA1) είναι ένα ωφέλιμο φορτίο του σφαιρικού ενζύμου του ADP, που ριβοζυλιώνει τις πρωτεΐνες G, ενώ το τμήμα A2 (CTA2) σχηματίζει μια εκτεταμένη άλφα έλικα η οποία κάθεται στενά στον κεντρικό πόρο του δακτυλίου B της υπομονάδας [138].

Αυτή η δομή έχει παρόμοιο σχήμα, μηχανισμό και αλληλουχία με την ασταθής στη θερμότητα εντεροτοξίνη που εκκρίνεται από μερικά στελέχη του βακτηρίου *Escherichia coli* και έτσι τα τελευταία χρόνια έχει αυξηθεί το ενδιαφέρον για την ανάπτυξη ταχέων και ευαίσθητων μεθόδων για την ανίχνευσή αυτής της τοξίνης λόγω της πρωτοφανούς θανατηφόρας δράσης της που μαστίζει πολλές περιοχές του πλανήτη [139].

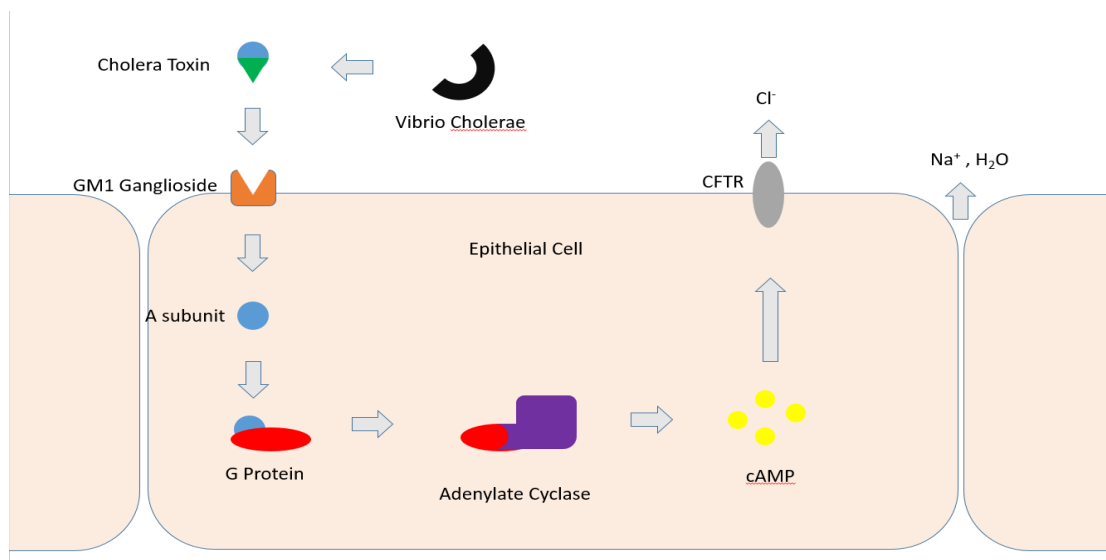


Σχήμα 4.1: Τυπική απεικόνιση της τρισδιάστατης δομής της τοξίνης της Χολέρας με τις πέντε πρωτεϊνικές υπομονάδες

4.3. Έλεγχος της τοξίνης της Χολέρας στο νερό

Η τοξίνη της χολέρας δρα με συγκεκριμένο μηχανισμό [140] που ο δακτύλιος B της υπομονάδας της τοξίνης δεσμεύεται με τις GM1 γαγγλιοσίδες στην επιφάνεια των κυττάρων στόχων. Η υπομονάδα B μπορεί επίσης να δεσμεύεται σε κύτταρα που δεν έχουν GM1. Η τοξίνη τότε πιθανότατα συνδέεται με πολλούς τύπους γλυκανών, όπως την Lewis Y και Lewis X, που συνδέονται με πρωτεΐνες αντί με λιπίδια [141-143].

Μόλις συνδεθεί, ολόκληρο το σύμπλοκο της τοξίνης ενδοκυττοποιείται από το κύτταρο και η CTA1 απελευθερώνεται με τη μείωση μιας δισουλφιδικής γέφυρας. Το ενδόσωμα μετακινείται στο σωμάτιο Golgi, όπου η πρωτεΐνη A1 αναγνωρίζεται από το ενδοπλασματικό δίκτυο, την ισομεράση του δισουλφιδίου της πρωτεΐνης και εκεί ξεδιπλώνεται η CTA1, όπου μεταφέρεται στη μεμβράνη, όπου ενεργοποιείται η απελευθέρωση της πρωτεΐνης A1 με οξείδωση του συμπλόκου μιας πρωτεϊνικής δισουλφιδικής ισομεράσης [144]



Σχήμα 4.2: Τυπική απεικόνιση του μηχανισμού της παθογόνου δράσης της τοξίνης της Χολέρας.

Λόγω του μηχανισμού δράσης της τοξίνης της Χολέρας (CT) με το GM1 αναπτύχθηκαν διάφορα συστήματα ανίχνευσης της τοξίνης της Χολέρας. Η πρώτη εργασία δημοσιεύτηκε το 1989 με σκοπό την ανάλυση του μηχανισμού της ηλεκτροχημικής αντίδρασης της CT με τη λιπιδική μεμβράνη όπου βρέθηκε υψηλά διηλεκτρική και ιοντικά διαπερατή στις διαταραχές των μονοστιβάδων [16].

Ο πρώτος βιοαισθητήρας για την ανίχνευση της τοξίνης της χολέρας αναπτύχθηκε από τον Fischer και τους συνεργάτες του [17] το 2000. Στην εργασία αυτή περιγράφονται τρεις βιοαισθητήρες που είχαν βάση λιπιδικές μεμβράνες για την ανίχνευση της τοξίνης της Χολέρας με πολύ απλό τρόπο κατασκευής, καλό χρόνο απόκρισης αλλά όχι καλή αναγεννησιμότητα και όρια ανίχνευσης, άρα όχι τόσο σταθερό σύστημα. Το ίδιο έτος επίσης αναφέρθηκε μια απευθείας ομογενής ανίχνευση της CT με τη μέθοδο μεταφοράς ενέργειας του φθορισμού (FRET) [18] με καλό όριο ανίχνευσης (LOD=0.01 nM) αλλά μεγάλο χρόνο απόκρισης (30 min).

Μια ερευνητική ομάδα [19] το 2001 συνδύασε ένα εξειδικευμένο αντίσωμα με ανιχνευτή λιποσώματος που είχε ενσωματωμένο το GM1 επισημασμένο με αντιδραστήρια ενζύμων για την ανίχνευση της τοξίνης της Χολέρας. Το σύστημα αυτό ήταν αρκετά περίπλοκο με καλό όμως όριο ανίχνευσης (LOD=0,0001nM) αλλά με μεγάλο χρόνο απόκρισης (10 min). Από το 2002 και μετά έγινε μια προσπάθεια να βελτιωθεί η σταθερότητα [20-22] των συστημάτων αλλά όχι σε εφαρμογές ανίχνευσης της τοξίνης της Χολέρας.

Το 2006 αναπτύχθηκε ένας οπτικός βιοαισθητήρας χρυσού με λιπιδικό φιλμ που είχε ενσωματωμένο το GM1 χρησιμοποιώντας SPR [23] με πολύ μικρό όριο ανίχνευσης (LOD=0,00001 nM) αλλά με μεγάλο σχετικά χρόνο απόκρισης (15 min).

Επιπρόσθετα το 2006 αναπτύχθηκε μια πολύπλοκη τεχνική με ηλεκτροενεργά δείγματα [24] και το 2007 μια εξίσου πολύπλοκη τεχνική με επισημασμένα με

αντιδραστήρια φθορισμού [25], που είχαν καλά όρια ανίχνευσης και χρόνους απόκρισης αλλά μεγάλο χρόνο κατασκευής και όχι καλή αναγεννησιμότητα .

Το 2007 επίσης μια ερευνητική ομάδα κατασκεύασε έναν βιοαισθητήρα χρυσού/λακτόζης με ακινητοποιημένο λιπιδικό φιλμ που είχε ενσωματωμένο το GM1 χρησιμοποιώντας UV φασματοσκοπία [26] με πολύ μεγάλο όριο ανίχνευσης (LOD=54 nM) και βελτιωμένη απόκριση (10 min).

Το 2010 κατασκευάστηκε ένας πιεζοηλεκτρικός βιοαισθητήρας με ακινητοποιημένη λιπιδική μεμβράνη τροποποιημένη με επιφανειακά συγκολλημένα λιποσώματα εγκλωπωμένα με GM1 [27]. Οι ερευνητές σε αυτή την περίπτωση χρησιμοποίησαν έναν περίπλοκο τρόπο κατασκευής με χρόνος απόκρισης μεγάλο (8 min) και όριο ανίχνευσης υπερβολικό (LOD=294nM). Τα αποτελέσματα των παλαιότερων εργασιών καταγράφονται στον πίνακα 4.1.

Πίνακας 4.1: Όρια ανίχνευσης (LOD) και χρόνοι απόκρισης από επιλεγμένες βιβλιογραφικές πηγές σε βιοαισθητήρες για προσδιορισμό της CT σε nM

Τρόπος κατασκευής	Μέθ. Ανίχ.	Χ.Απόκρ (min)	LOD (nM)	Αναφ.
Οπτικός βιοαισθητήρας με λιπιδική μεμβράνη και επισημασμένα GM1	FRET	30	0.01	[18]
Ανοσοαισθητήρας με εξειδικευμένο αντίσωμα (HRP) και λιπιδική μεμβράνη με GM1	EIS	10	0.0001	[19]
Οπτικός βιοαισθητήρας χρυσού με λιπιδική μεμβράνη και GM1	SPR	15	0.00001	[23]
Βιοαισθητήρας χρυσού/λακτόζης με λιπιδική μεμβράνη και GM1	UV	10	54	[26]
Πιεζοηλεκτρικός βιοαισθητήρας χρυσού με λιποσώματα τροποποιημένα με GM1	QCM	8	294	[27]

4.4.Η Αφλατοξίνη M1

Οι αφλατοξίνες (aflatoxins) γενικά είναι ισχυρότατα τοξικές και καρκινογόνες μυκοτοξίνες, που παράγονται από τους μύκητες (*Aspergillus flavus* και *Aspergillus parasiticus*), που αναπτύσσονται κυρίως σε ξηρά φρούτα, ξηρούς καρπούς (ιδιαίτερα στα αράπικα φιστίκια και αμύγδαλα), μπαχαρικά, σιτηρά, σε τυριά (όταν υπάρξουν κατάλληλες συνθήκες) και στα γαλακτομικά προϊόντα.

Για αυτό τον λόγο οι μυκοτοξίνες αυτές είναι μείζονος σημασίας για την γαλακτοκομική βιομηχανία και ιδιαίτερα η Αφλατοξίνη M1 (AFM1), που είναι η μόνη που εμφανίζεται σε αυτά. Η AFM1 ανήκει στην κατηγορία των δευτερογενών

μεταβολιτών που παράγονται από οργανισμούς του μυκητιακού βασιλείου [29]. Οι μυκοτοξίνες γενικά μπορούν να προκαλέσουν ασθένειες ή ακόμα και θανάτους [145].

Οι περισσότεροι μύκητες είναι αερόβιοι και βρίσκονται σχεδόν παντού. Καταναλώνουν οργανική ύλη σε κατάλληλη υγρασία και θερμοκρασία και αν οι συνθήκες είναι κατάλληλες πολλαπλασιάζονται σε αποικίες και έτσι μεγαλώνει και η διάρκεια ζωής και η συγκέντρωσή τους [146].

Οι κύριες ομάδες μυκοτοξινών είναι η αφλατοξίνη, η ωχρατοξίνη, η κιτρίνινη, η πατουλίνη και το φουζάριο. Η αφλατοξίνη M1 (AFM1) είναι ο φυσικός μεταβολίτης της αφλατοξίνης B1 (AFB1). Η παρουσία τους στη ζωοτροφή και η επακόλουθη έκθεση γαλακτοπαραγωγών ζώων οδηγούν στη μόλυνση του γάλακτος από τον υδροξυλιωμένο μεταβολίτη του, AFM1 [147-148].

Σύμφωνα με τις επίσημες αρχές τόσο της ΕΕ όσο και των ΗΠΑ, το νωπό γάλα πρέπει να ελέγχεται τακτικά για μόλυνση από την AFM1 και αν οι συγκεντρώσεις της AFM1 είναι πάνω από 47 ng/l (κανονισμοί της ΕΕ) ή 472 ng/l (κανονισμοί των ΗΠΑ), αυτό το γάλα πρέπει να αποσυρθεί από την αγορά. Το όριο αυτό μειώνεται βέβαια περισσότερο όταν πρόκειται για βρεφικό γάλα 25 ng/l [149].

Τουλάχιστον 14 διαφορετικά είδη αφλατοξινών παράγονται στη φύση [150]. Η αφλατοξίνη B1 θεωρείται η πλέον τοξική. Η αφλατοξίνη M1 υπάρχει στον ζωμό του *Aspergillus parasiticus*, αλλά και η αφλατοξίνη M2 παράγεται όταν ένα μολυσμένο ήπαρ μεταβολίζει την αφλατοξίνη B1 ή B2.

Ο έλεγχος της αφλατοξίνης στο γάλα τα τελευταία χρόνια γίνεται με κλασσικές μεθόδους ανάλυσης σε εργαστήρια που είτε διαθέτουν οι ίδιες οι γαλακτοβιομηχανίες ή κάποιοι εξωτερικοί συνεργάτες, όπως τα πανεπιστήμια ή τα ερευνητικά κέντρα. Η κύρια μέθοδος ελέγχου της AFM1 μέχρι σήμερα είναι η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) [151], η οποία αντικατέστησε επωφελώς την τεχνική χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC) [152] ενώ τα τελευταία χρόνια γίνονται έλεγχοι και με την ενζυματική ανοσοποιητική δοκιμασία (ELISA) [152].

Οι κλασσικές μέθοδοι όμως χρειάζονται εξειδικευμένο προσωπικό και είναι ακριβές και χρονοβόρες ως προς τον έλεγχο των δειγμάτων γάλακτος. Οι δυσκολίες που εμφανίζονται βέβαια μπορούν να επιλυθούν με την τεχνολογία των βιοαισθητήρων. Σε αντίθεση για παράδειγμα με την ELISA οι βιοαισθητήρες επιτρέπουν την ανίχνευση της αναλυόμενης ουσίας χωρίς δείκτες (label-free), δηλαδή με ανίχνευση φυσικών παραμέτρων και όχι με χρήση μοριακού σήματος, όπως γίνεται στην ELISA.

4.5. Έλεγχος της Αφλατοξίνης M1 στο γάλα

Οι περισσότεροι βιοαισθητήρες χρυσού που έχουν χρησιμοποιηθεί μέχρι σήμερα για την ανίχνευση της AFM1 έχουν δύο τύπους υποδοχέων, δηλαδή τα

αντισώματα (antibodies) και τα απταμερή (aptamers) χρυσού για την ανίχνευση της AFM1 στο γάλα ή σε πρότυπα δείγματα.

Οι ανοσοαισθητήρες (immunosensors) βασίζονται στην ακινητοποίηση εξειδικευμένων μονόκλωνων αντισωμάτων σε διάφορες επιφάνειες. Τα κύρια προβλήματα τους συνίστανται στο αυξημένο κόστος των αντισωμάτων και σε ηθικά ζητήματα. Στην πραγματικότητα οι ανοσοσφαιρίνες παράγονται από βλαβερά πειράματα για την υγεία των ζώων. Ο πρώτος ηλεκτροχημικός **ανοσοαισθητήρας** για την ανίχνευση AFM1 αναφέρθηκε από τον Micheli και τους συνεργάτες του [1]. Σε αυτή την εργασία ο σχεδιασμός του αισθητήρα έγινε με βάση τη μέθοδο ELISA αλλά τα ειδικά αντισώματα της AFM1 ακινητοποιήθηκαν απευθείας σε τυπωμένα ηλεκτρόδια (SPCE). Το δευτερεύον αντίσωμα συζευγμένο με υπεροξειδάση (HRP) χρησιμοποιήθηκε για την χρονοαμπερομετρική ανίχνευση της AFM1 με σχετικά καλό όριο ανίχνευσης (LOD=25ng/l) με μελέτη που έγινε σε καλό δυναμικό εύρος 30-160 ng/l. Αυτό το εύρος είναι συγκρίσιμο με αυτό της ELISA και το κύριο πλεονέκτημά του είναι ότι εμφάνισε μικρότερο χρόνο ανίχνευσης.

Στη συνέχεια ο Vig με τους συνεργάτες του περιέγραψαν έναν αντισταθμιστικό ανοσοαισθητήρα με βάση τα επισημασμένα σε χρυσό αντισώματα. Ο ανοσοαισθητήρας αυτός επέτρεψε την ανίχνευση της AFM1 σε ακόμη μικρότερες συγκεντρώσεις με δυναμικό εύρος 15-1000ng/l και όριο ανίχνευσης (LOD=15ng/l) [2]. Επιπρόσθετα μια άλλη ερευνητική ομάδα εργαζόμενη σε μια ανταγωνιστική ανοσοδοκιμασία κατάφερε να ακινητοποιήσει τα αντισώματα σε συστοιχία χρυσών μικροηλεκτροδίων (Au-Nps) με ανίχνευση της AFM1 με την βοήθεια της HRP σε ευρύ δυναμικό εύρος 10-100 ng/l και σχετικά καλό όριο ανίχνευσης (LOD=8ng/l) [3]. Σχετικά πρόσφατα αναπτύχθηκε μια έμμεση ανταγωνιστική ανοσοδοκιμασία με συστοιχία τυπωμένων ηλεκτροδίων σε ένα πρότυπο μικροπλάκας 96 φρεατίων για την ανοσοδοκιμασία-κατεψυγμένου και λυοφιλοποιημένου γάλακτος [14]. Ο Paniel και οι συνεργάτες του ανιχνεύσαν την AFM1 με έναν ανοσοαισθητήρα που βασίζεται σε μια ανταγωνιστική ανοσοδοκιμασία, χρησιμοποιώντας υπεροξειδάση (HRP) ως δείκτη [5]. Τα δείγματα που περιείχαν AFM1 επώαστηκαν με μια σταθερή ποσότητα αντισώματος συνδεδεμένου με HRP (συζυγές) έως ότου το σύστημα φτάσει σε ισορροπία και χρησιμοποιώντας χρονοαμπερομετρία εργαστήκαν σε δυναμικό εύρος 10-150 ng/l με όριο ανίχνευσης (LOD=10ng/l). Ο Bacher και οι συνεργάτες του έφτιαξαν έναν αντισταθμιστικό ανοσοαισθητήρα χωρίς δείκτες (label-free) που τα ηλεκτρόδια του αργύρου (Ag), επιτρέπουν την ανίχνευση της AFM1 σε ένα καλό δυναμικό εύρος 6,25-100 ng/L, με όριο ανίχνευσης 1 ng/L [6]. Τα τελευταία χρόνια έχει περιγραφεί ένας ανοσοαισθητήρας με μονόκλωνα αντισώματα για μια πολύ ευαίσθητη ανίχνευση της AFM1 σε παστεριωμένο και κονιοποιημένο γάλα [7]. Η ομάδα αυτή δούλεψε με την μέθοδο ELISA σε όριο ανίχνευσης (LOD=7ng/l) και δυναμικό εύρος 7-36 ng/l. Την ίδια περίπου εποχή δοκιμάστηκε ένας ηλεκτροχημικός ανοσοαισθητήρας με αντισώματα δέσμησης, που ακινητοποιήθηκαν στο ηλεκτρόδιο με τυπωμένο πλέγμα χρυσού και σηματοδοτημένα αντισώματα που είχαν συζευχθεί με αλκαλική φωσφατάση σε δείγματα γάλακτος [8]. Ως εκ τούτου αναπτύχθηκε και μια συσκευή

ανίχνευσης που αποτελείται από τέσσερις ανιχνευτές μικροκυκλώματος πυριτιούχου οξυνιτριδίου (SiON), που ανιχνεύει την AFM1 με φωτοανιχνευτές πυριτίου [9].

Μια εναλλακτική μέθοδος που προτάθηκε ήταν αυτή ενός DNA αισθητήρα βασισμένου σε λιπιδικές μεμβράνες (BLMs) [156], όπου η ανίχνευση έγινε με ποτενσιομετρία και η Αφλατοξίνη επηρέασε τον υβριδισμό του DNA πάνω στη στοιβάδα των BLMs. Σε αυτή την εργασία το δυναμικό εύρος ήταν (0,5-6572 ng/l) και το όριο ανίχνευσης (LOD=157 ng/l).

Πίνακας 4.2: Όρια ανίχνευσης (LOD) και δυναμικό εύρος από επιλεγμένες βιβλιογραφικές πηγές σε ανοσοαισθητήρες [1-9] και DNA αισθητήρα [153] για τον προσδιορισμό της AFM1 σε ng/l

Τεχνική κατασκευής	Μέθ. Ανίχ.	Δ. εύρος (ng/L)	LOD (ng/L)	Αναφ.
Βιοαισθητήρας ακινητοποιημένος με ειδικά αντισώματα σε εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο	ELISA	30-160	25	[1]
Βιοαισθητήρας ακινητοποιημένος με επισημασμένα αντισώματα σε εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο	ELISA	15-1000	15	[2]
Βιοαισθητήρας με συστοιχία αντισωμάτων ακινητοποιημένα με σύνδεση σε C ₆ H ₄ (NCO) ₂	ELISA	1-100	8	[3]
Βιοαισθητήρας ακινητοποιημένος με πρότυπο 96-μικροπλακιδίων σε εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο	ELISA	5-250	1	[4]
Βιοαισθητήρας με χρήση HRP	Χρονοαμπερομετρία	10-500	10	[5]
Αντισταθμιστικός βιοαισθητήρας χωρίς- δείκτη	ELISA	1-100	1	[6]
Βιοαισθητήρας ακινητοποιημένος με αλβουμίνη και αντίσωμα AFM1	ELISA	-	200	[7]
Βιοαισθητήρας ακινητοποιημένος με καλυμμένα αντισώματα σε εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο	DPV	-	37	[8]
Βιοαισθητήρας ακινητοποιημένος με θραύσματα δέσμησης αντιγόνου (Fab ') σε μικροδακτυλίους συντονισμού SiO ₂	MRR	-	1641	[9]
Βιοαισθητήρας με λιπιδικές μεμβράνες (BLMs)	ποτενσιομετρία	0,5-6572	157	[153]

Τα απταμερή είναι μια εναλλακτική λύση έναντι των πιο ακριβών και λιγότερο σταθερών αντισωμάτων. Τα απταμερή που χρησιμοποιούνται είναι είτε μονόκλιωνα DNA ή RNA που σε διάφορα διαλύματα αναδιπλώνονται σε 3d δομές με εξειδικευμένη θέση δέσμευσης στον αναλύτη. Έχουν χαμηλό κόστος, υψηλή αποτελεσματικότητα, ευελιξία, ευκολία τροποποίησης, υψηλή σταθερότητα και συμβατότητα με την παραγωγή μεγάλης κλίμακας [154]. Επίσης παράγονται in vitro με τη μέθοδο SELEX (Systematic Evolution of Ligand with Exponential enrichment) χρησιμοποιώντας διαχωρισμό χρωματογραφίας συγγενών με τυχαία συντιθέμενες αλληλουχίες [155-156]. Η εξειδίκευση των απταμερών στην αναλυόμενη ουσία είναι συγκρίσιμη με εκείνη των αντισωμάτων αλλά είναι ευκολότερη η ακινητοποίησή τους σε επιφάνειες και η χημική τροποποίησή τους.

Η ανίχνευση της AFM1 με απτοαισθητήρες αναφέρεται για πρώτη φορά από τον Nguyen [10] το 2013 με δυναμικό εύρος (6-60 ng/l) και πολύ χαμηλό όριο ανίχνευσης (LOD=1.98 ng/l). Στα πλεονεκτήματα της εργασίας εντάσσεται η εύκολη κατασκευή τους και η ανίχνευση της AFM1 με την μέθοδο της Διαφορικής Παλμικής Βολταμετρίας (DPV). Το μειονέκτημα της παραπάνω εργασίας είναι το μικρό δυναμικό εύρος. Μια ερευνητική ομάδα [11] το 2016 εφάρμοσε μια εξίσου απλή μέθοδο κατασκευής απτοαισθητήρα χρησιμοποιώντας εκτυπωμένα ηλεκτρόδια με πτύχωση επί των οποίων ακινητοποιήθηκαν τροποποιημένα αμινοαπταμερή με ομοιοπολική σύνδεση. Το όριο ανίχνευσης της AFM1 ήταν ικανοποιητικό (LOD=1,15 ng/L) και ο απτοαισθητήρας ήταν σταθερός. Σημαντικό όμως σε αυτή τη περίπτωση είναι το γεγονός πως έγινε δοκιμή σε πραγματικά δείγματα γάλακτος με ανακτήσεις μεταξύ 99-111%. Σχετικά δηλαδή καλές ανακτήσεις, αφού λίγες τιμές ξεπερνούσαν το 100%. Στην εργασία [12] του 2017 αναφέρεται παρόμοιο LOD με την εργασία [11], με τον απτοαισθητήρα αυτό να βασίζεται στην ακινητοποίηση βιοτινωμένων απταμερών σε στρώμα streptavidin. Για την ανίχνευση με βολταμετρία τετραγωνικού κύματος (SWV) χρησιμοποιήθηκαν 5mM $K_3[Fe(CN)_6]$. Ο απτοαισθητήρας αυτός είχε ένα εκπληκτικά μεγάλο δυναμικό εύρος ($1-10^5$ ng/L) και δυνατότητα αναγέννησής του με 10% SDS (Sodium Dodecyl Sulfate). Σε δημοσίευση του Jalalian [13] το 2018 επιτεύχθηκε πολύ καλό όριο ανίχνευσης της AFM1 (LOD=0,9 ng/L). Ο μηχανισμός ανίχνευσης σε αυτή την περίπτωση βασίζεται σε μεταβολές διαμόρφωσης των απταμερών παρουσία της AFM1 με επακόλουθο υβριδισμό των απταμερών με προστιθέμενες συμπληρωματικές ίνες DNA ακινητοποιημένες σε νανοσωματίδια χρυσού. Αυτός ο απτοαισθητήρας δοκιμάστηκε και σε πραγματικά δείγματα γάλακτος με πολύ ικανοποιητικές ανακτήσεις 91,3-96,5%. Το μειονέκτημα αυτής της εργασίας είναι ότι η κατασκευή του απτοαισθητήρα είναι πολύ περίπλοκη διαδικασία. Ένας οπτικός απτοαισθητήρας παρουσιάζεται στην εργασία [14] που χαρακτηρίζεται από ένα όριο ανίχνευσης της AFM1 (LOD=10 ng/L). Για την ανίχνευση της αφλατοξίνης χρησιμοποιήθηκε η ελλειψομετρία εσωτερικής ανάκλασης (TIRE) (Total Internal Reflection Ellipsometry) σε συνδυασμό με το φαινόμενο του επιφανειακού συντονισμού πλασμονίου (LSPR) (Localized Surface Plasmon Resonance). Η βάση της εργασίας αυτής είναι μια διέγερση που προκύπτει από την κβάντωση των ταλαντώσεων του πλάσματος, ακριβώς όπως τα φωτόνια. Παρόλο που ο απτοαισθητήρας αυτός είναι εύκολα κατασκευάσιμος το βασικό μειονέκτημα του είναι η περίπλοκη και πλέον

εξελιγμένη μέθοδος που χρησιμοποιεί για την ανίχνευση της AFM1. Η πλέον πρόσφατη μελέτη για την ανίχνευση της AFM1 με απτοαισθητήρες, είναι εκείνη του Smolko [15] το 2018, με όριο ανίχνευσης. Αυτός ο απτοαισθητήρας είχε ένα εξαιρετικά καλό όριο ανίχνευσης (LOD=0.5 ng/l) και κατασκευάστηκε χωρίς δείκτες (Label-free) και έγινε εφαρμογή του με επιτυχία σε δείγματα γάλακτος. Το μειονέκτημα όμως ήταν η πιο σύνθετη κατασκευή του απτοαισθητήρα.

Πίνακας 4.3: Όρια ανίχνευσης (LOD) και δυναμικό εύρος από επιλεγμένες βιβλιογραφικές πηγές σε απτοαισθητήρες για τον προσδιορισμό της AFM1 σε ng/l

Τεχνική κατασκευής	Μέθ. Ανίχ.	Δ. εύρος (ng/l)	LOD (ng/l)	Αναφ.
Βιοαισθητήρας με ηλεκτροχημική διεπαφή Fe ₃ O ₄ /PANi	DPV	6-60	1.98	[10]
Βιοαισθητήρας ακινητοποιημένος με τροποποιημένα απταμερή σε εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο	CV, EIS	2-150	1,15	[11]
Βιοαισθητήρας σε στρώμα streptavidin και τροποποιημένο απταμερές ακινητοποιημένο σε εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο	CV, SWV	1-10 ⁵	1	[12]
Βιοαισθητήρας ακινητοποιημένος σε Au-NPs με το κυανό του μεθυλίου ως ανιχνευτή οξειδοαναγωγής	DPV	2-600	0.9	[13]
Οπτικός βιοαισθητήρας χωρίς δείκτη ακινητοποιημένος σε νανοδομητικές μεμβράνες	TIRE με LSRP	10-10 ⁵	10	[14]
Βιοαισθητήρας με μεμβράνη τροποποιημένη με ηλεκτροπολυμερισμό σε Neutral red	EIS	5-120	0,5	[15]

Β.Πειραματικό Μέρος

Κεφ 5: Ανάπτυξη πρότυπου βιοαισθητήρα γραφενίου/Χαλκού με ακινητοποίηση λιπιδικής μεμβράνης τροποποιημένης με GM1 για τον προσδιορισμό της τοξίνης της Χολέρας στο νερό

Κεφ 6: Ανάπτυξη πρότυπου απτοαισθητήρα χρυσού με ακινητοποίηση δενδριμερούς για τον προσδιορισμό της Αφλατοξίνης M1 στο γάλα

Κεφ 7: Ανάπτυξη πρότυπου απτοαισθητήρα χρυσού με ακινητοποίηση Neutraavidin/Fe-COOH για τον προσδιορισμό της Αφλατοξίνης M1 στο γάλα

Κεφ 8: Ανάπτυξη πρότυπου απτοαισθητήρα χρυσού με απευθείας ακινητοποίηση του με μερκαπτοεξανόλη για τον προσδιορισμό της Αφλατοξίνης M1 στο γάλα

Κεφ 5: Ανάπτυξη πρότυπου βιοαισθητήρα γραφενίου/Χαλκού με ακινητοποίηση λιπιδικής μεμβράνης τροποποιημένης με GM1 για τον προσδιορισμό της τοξίνης της Χολέρας στο νερό

5.1. Εισαγωγή

Η παρούσα εργασία περιγράφει έναν βιοαισθητήρα με μήτρα (matrix) γραφενίου/Χαλκού και ακινητοποιημένη λιπιδική μεμβράνη, όπου εγκολλώνονται οι υποδοχείς (receptors) GM1 για τον προσδιορισμό της τοξίνης της Χολέρας στο νερό με ποτενσιομετρία. Ο βιοαισθητήρας αυτός δοκιμάστηκε ως προς την αναγεννησιμότητα και ελέγχθηκε τόσο σε πρότυπα όσο και σε αληθινά δείγματα νερού από τη λίμνη Κουμουνδούρου, που βρίσκεται στην Αττική στα όρια των δήμων Χαϊδαρίου και Ασπροπύργου. Πρόκειται ουσιαστικά για λιμνοθάλασσα, καθώς βρίσκεται στο επίπεδο της θάλασσας, πολύ κοντά στις ΒΑ ακτές του κόλπου της Ελευσίνας. Το νερό της λίμνης αυτής είναι υφάλμυρο καθώς εισχωρεί σε αυτή και θαλασσίνο νερό.

Τα πειράματα αυτά έγιναν στο πανεπιστήμιο Αθηνών το έτος 2015-16 και τα αποτελέσματα δημοσιεύτηκαν στο περιοδικό *Electroanalysis* της Willey (περισσότερες λεπτομέρειες στα παραρτήματα).

5.2. Χημικά αντιδραστήρια

Προκειμένου να γίνουν αυτά τα πειράματα χρησιμοποιήθηκε η Διπαλμιτοϋλφωσφατιδυλοχολίνη (Dipalmitoylphosphatidylcholine, DPPC, $C_{40}H_{80}NO_8P$, Sigma St. Louis, MO, USA) ως πολυμερές, το Μεθακρυλικό οξύ ($C_4H_6O_2$, $M_r=86$, Aldrich, Steinmheim, Germany) και η Διμεθακρυλική αιθυλενογλυκόλη ($M_r=208$, Aldrich, Steinmheim, Germany) ως μονομερή για να κατασκευαστεί με την διαδικασία που θα περιγραφεί παρακάτω η λιπιδική μεμβράνη. Επίσης ως εκκινητής του πολυμερισμού χρησιμοποιήθηκε το 2,2'-αζωδισοβουτύρονιτρίλιο (AIBN, $C_8H_{12}N_4$, $M_r=164,21$ Merck, Darmstadt, Germany).

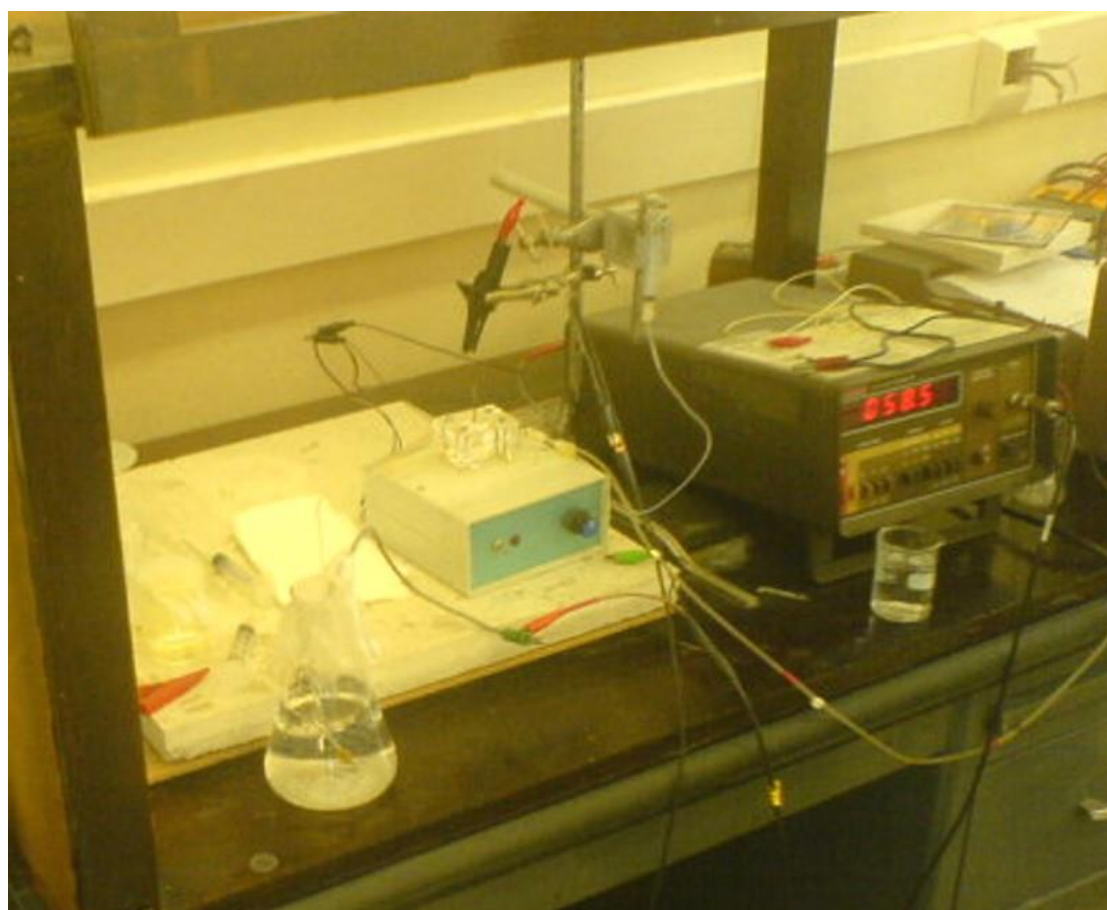
Η Τοξίνη της Χολέρας (CT) αγοράστηκε από την Calbiochem (La Jolla, CA) και το GM1 ελήφθη από την FIDIA Research Laboratory (Abano Terme, Italy). Απόθεμα του διαλύματος της τοξίνης της Χολέρας ήταν μέσα σε Μεθανόλη συγκεντρώσεως $1.0\mu M$. Αραιά υδατικά διαλύματα της τοξίνης προετοιμαζόντουσαν καθημερινά πριν από έναρξη των πειραμάτων ενώ το ρυθμιστικό διάλυμα PBS (Phosphate Buffer Saline) προετοιμαζόταν με μίξη σε κατάλληλο όγκο με $0.5 M KH_2PO_4$ και $0.5M Na_2HPO_4$. Όλα τα πειράματα γινόντουσαν σε μέση θερμοκρασία δωματίου ($25\pm 1^\circ C$).

Προκειμένου όμως να φτιαχτεί το φύλλο γραφενίου χρησιμοποιήθηκαν μικρόφιλτρα υάλου (0,7 και 1,0 μm , Whatmam Scientific Ltd., Kent, UK) και απιονισμένο νερό (με ειδική αντίσταση τουλάχιστον 18 $\text{M}\Omega\text{ cm}$) το οποίο προερχόταν από την συσκευή φιλτραρίσματος Milli-Q (Millipore, El Paso, Texas, USA).

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η Τοξίνη της Χολέρας είναι δυνητικά επικίνδυνη και για αυτό ο χειρισμός της γινόταν με μεγάλη προσοχή. Ατομικά ενδύματα προστασίας φοριόντουσαν σε όλα τα πειράματα και οι επιφάνειες, τα γυαλικά και άλλα δοχεία που χρησιμοποιούσαμε υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με χλωρίνη πριν από κάθε τυπικό πλύσιμο με σαπούνι και απιονισμένο νερό. Τα αναλώσιμα μετά τη χρήση τους τοποθετήθηκαν σε σακούλες βιολογικού κινδύνου και αποτεφρώθηκαν, ενώ τα απόβλητα που ήταν σε μορφή διαλύματος υποβλήθηκαν σε πλύσιμο με χλωρίνη πριν από την ρίψη τους στις σακούλες αυτές.

5.3.Οργανολογία

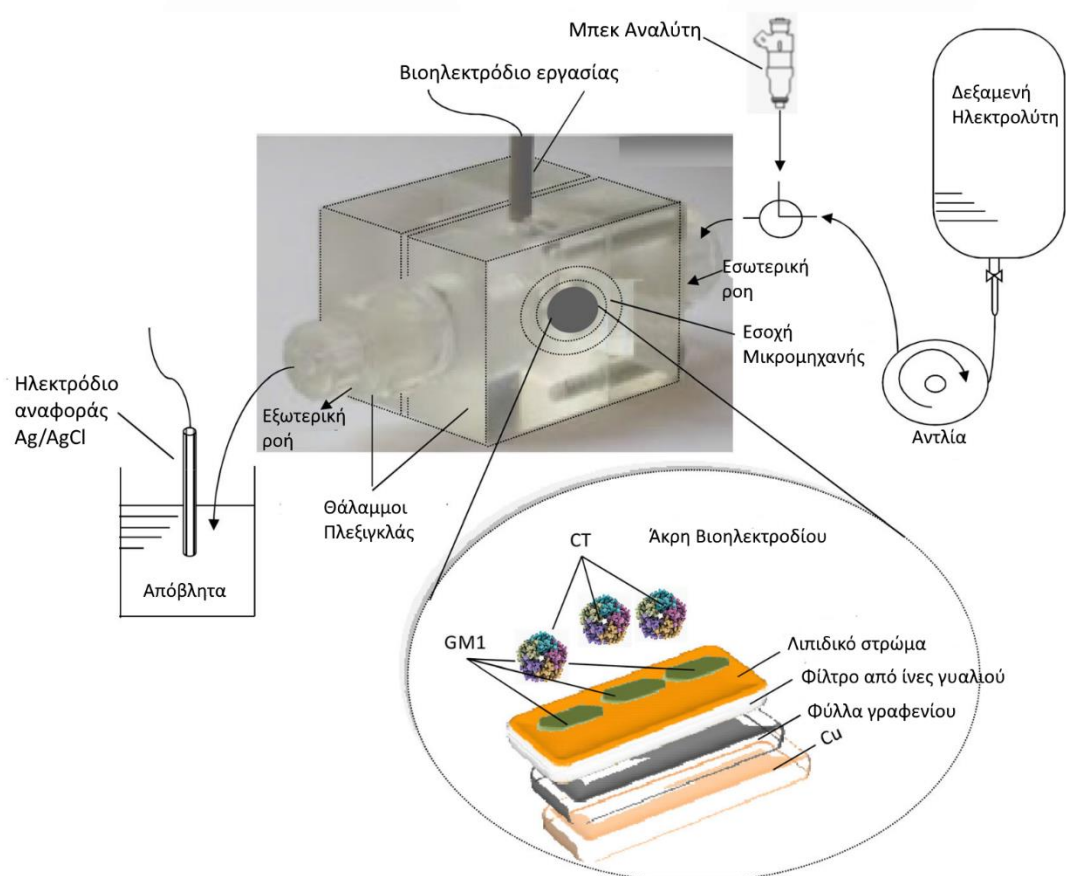
Όλα τα ηλεκτροχημικά πειράματα έγιναν με χρήση ενός ηλεκτρόμετρου Keithley μοντέλο 614 (Keithley Model 614, USA) (Εικόνα 5.1).



Εικόνα 5.1: Το ηλεκτρόμετρο Keithley που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματά εν ώρα λειτουργίας.

Για τις μετρήσεις του χρόνου απόκρισης, συνδέθηκε στην έξοδο του ηλεκτρόμετρου ένας καταγραφέας Knauer (KNAUER GmbH, Berlin, Germany), ένα

ηλεκτρόδιο αναφοράς Ag / AgCl, ένας αναδευτήρας δίνης (Vortex Genie), ένας αναδευτήρας υπερήχων (Bek Nilas, Ultrasonic), φίλτρα υαλονημάτων (GF/FTM, Whatman Scientific Ltd, Kent, UK), ποτήρια ζέσεως, πιπέτα Pasteur, σιφόνια, κωνικές και ογκομετρικές φιάλες. Η διάταξη αυτή απεικονίζεται στο σχήμα 5.1.



Σχήμα 5.1: Τυπική απεικόνιση της πειραματικής διάταξης και της επιφάνειας του βιοηλεκτροδίου εργασίας

5.4. Κατασκευή βιοαισθητήρα

Η κατασκευή του βιοαισθητήρα περιλαμβάνει δύο στάδια. Πρώτον κατασκευάζονται τα φύλλα γραφενίου και έπειτα γίνεται η ακινητοποίηση της λιπιδικής μεμβράνης πάνω στα φύλλα γραφενίου με παράλληλη εγκόλπωση των GM1 υποδοχέων.

5.4.1. Κατασκευή των φύλλων γραφενίου και εναπόθεση στα φύλλα χαλκού

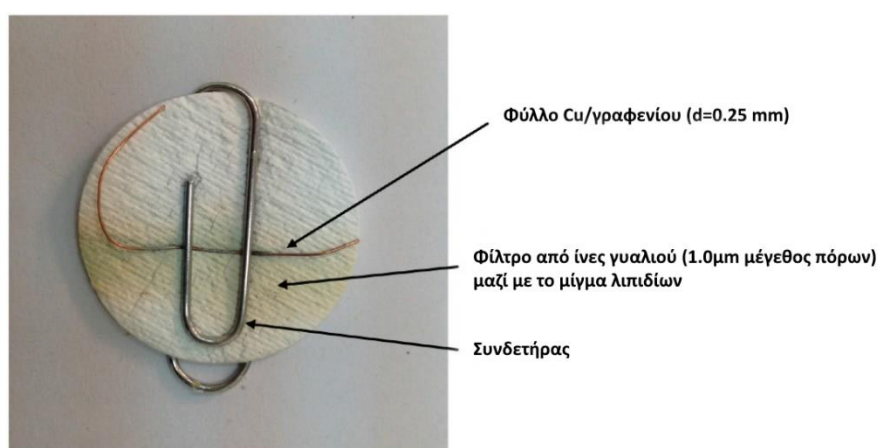
Τα φύλλα γραφενίου προετοιμάστηκαν με τη διαδικασία που έχει περιγραφεί σε προηγούμενη δημοσίευση [157]. Ομογενές γραφένιο συγκεντρώσεως ($C=0.4 \text{ mg/ml}$) προέκυψε με τη βοήθεια της Ν-μεθυλο-2-πυρρολιδόνης (NMP) με ήπια κατεργασία σε υπερήχους (χρησιμοποιώντας το μοντέλο Bandelin SONOREX Digital 10P sonicator, Sigma-Aldrich, Taufkirchen Germany) για 180 ώρες. Έπειτα έγινε

φυγοκέντρωση στα 700 rpm για 2 ώρες [157]. Ο χρόνος της φυγοκέντρωσης ήταν πολύ μεγάλος προκειμένου να μειωθεί το μέγεθος των θραυσμάτων γραφενίου που θα προκύψουν [158-159]. Αυτό είναι μια κρίσιμη παράμετρος, διότι το μέγεθος των θραυσμάτων του γραφενίου είναι ένα σοβαρό ποιοτικό στοιχείο, αφού επηρεάζει τον αριθμό και τη θέση τους, που μπορούν να επηρεάσουν τις ηλεκτρονικές ιδιότητές του. Έτσι το εξωτερικό περίβλημα των θραυσμάτων του γραφενίου είναι σχετικά ατελές [160].

Το αιώρημα του γραφενίου εκχύνεται μέσα σε ένα χάλκινο σύρμα ($d=0.25\text{ mm}$) τοποθετημένο σε ένα φίλτρο από ίνες γυαλιού. Η εξάτμιση του οργανικού διαλύτη πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας έναν θερμαντήρα.

5.4.2. Κατασκευή των λιπιδικών μεμβρανών (BLMs) και ακινητοποίησή τους επάνω στην επιφάνεια των φύλλων γραφενίου/χαλκού

Η διαδικασία κατασκευής των λιπιδικών μεμβρανών έχει περιγραφεί σε προηγούμενες εργασίες [161-162]. Για να κατασκευαστούν οι λιπιδικές μεμβράνες πρέπει να γίνει πολυμερισμός είτε με υπ ακτινοβολία ή θερμικά. Πριν τον πολυμερισμό ετοιμάζεται ένα μίγμα όπου έχει γίνει ανάμιξη 5 mg λιπιδίου σε σκόνη, αποτελούμενο από 65% (κ.β.) (3,2 mg) DPPC και 35% (κ.β.) (1.8 mg) DPPA, 0,07 ml μεθακρυλικό οξύ, με 0,8 ml διμεθακρυλική αιθυλενογλυκόλη, 8 mg 2-2'-αζωδισοβουτύρονιτρίλιο (AIBN) και 1,0 ml ακετονιτρίλιο. Στο μίγμα αυτό γίνεται ξήρανση με άζωτο για 1 λεπτό και μετά υποβάλλεται σε ήπια κατεργασία με υπερήχους (χρησιμοποιώντας το μοντέλο Bandelin SONOREX Digital 10P sonicator, Sigma-Aldrich, Taufkirchen Germany) για 30 λεπτά. Για την κατασκευή σταθερών λιπιδικών μεμβρανών 0,15 ml του μίγματος αυτού απλώθηκαν στο μικρόφιλτρο υάλου που περιγράφτηκε προηγουμένως (Εικόνα 5.2). Το μικρόφιλτρο με το μίγμα στη συνέχεια ακτινοβολήθηκε με λάμπα δευτερίου υπ για 4 ώρες για να γίνει ο πολυμερισμός της λιπιδικής μεμβράνης.



Εικόνα 5.2: Το μικρόφιλτρο μαζί με το μίγμα των λιπιδίων

Κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού εγκολλώνονται οι υποδοχείς GM1 στο λιπιδικό στρώμα σε ποσότητα 10 μl . Μετά τον πολυμερισμό γίνεται η ακινητοποίηση

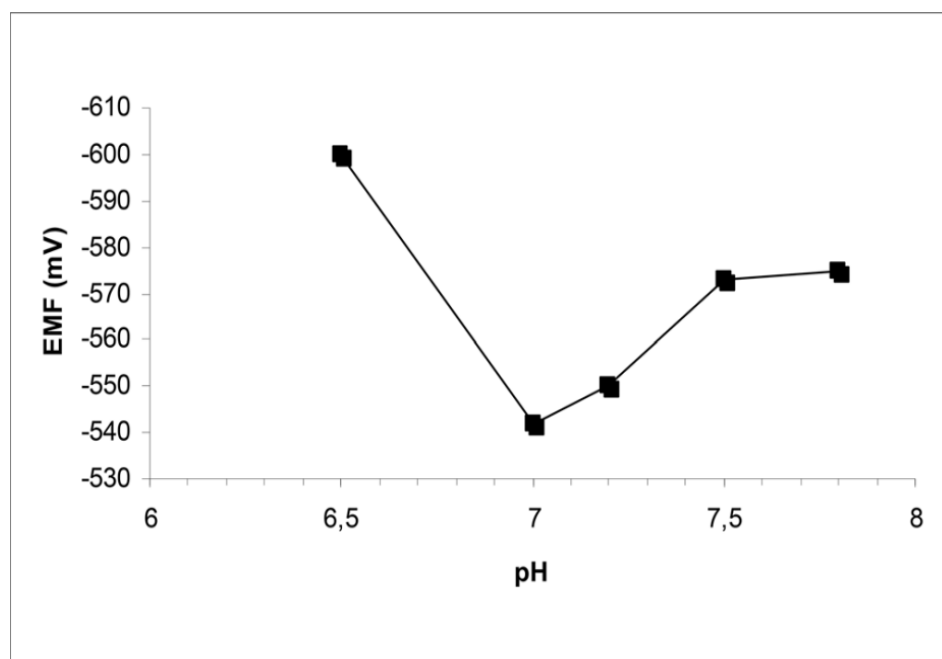
των τροποποιημένων λιπιδικών μεμβρανών επάνω στο στρώμα Χαλκού/γραφενίου. Τα βιοηλεκτρόδια (Σχήμα 5.1) μπορούν να χρησιμοποιηθούν μια φορά ή να αναγεννηθούν αλλά όταν δεν χρησιμοποιούνται πρέπει να φυλάσσονται σε ψυγεία με θερμοκρασία 4°C και με αυτό τον τρόπο μπορούν να παραμείνουν σταθερά για τρεις μήνες

5.5.Λειτουργικός έλεγχος του βιοαισθητήρα

Ο λειτουργικός έλεγχος του βιοαισθητήρα γίνεται με προκαταρκτικούς ελέγχους ως προς την επίδραση του pH στον βιοαισθητήρα, την αναγεννησιμότητα και την επίδραση των παρεμποδιστών που βρίσκονται σε νερά λίμνης στον βιοαισθητήρα, τον έλεγχο σε πρότυπα δείγματα με ρυθμιστικό διάλυμα και σε πραγματικά δείγματα νερού της τοξίνης της Χολέρας.

5.5.1.Προκαταρκτικοί έλεγχοι σε πρότυπα δείγματα

Ο πρώτος και σημαντικός έλεγχος ήταν η μελέτη της επίδρασης του pH στον βιοαισθητήρα σε συγκέντρωση της τοξίνης της Χολέρας ($C=100 \text{ nM}$). Σύμφωνα με την βιβλιογραφία [19,24,167] οι βέλτιστες τιμές pH για την σύνδεση μεταξύ της τοξίνης χολέρας και του υποδοχέα GM1 είναι μεταξύ 7-8.5. Ο έλεγχος λοιπόν έγινε σε αυτή την περιοχή και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Σχήμα 5.2. Η μεγαλύτερη τιμή της ηλεκτρεγερτικής δύναμης (EMF ή HEΔ) εμφανίζεται στο $\text{pH}=7.0$. Μειώνεται κατά πολύ σε χαμηλότερες τιμές pH, όπου ο δεσμός της χολέρας της τοξίνης και του GM1 παρεμποδίζεται [167] και λιγότερο σε μεγαλύτερο pH. Η αδύναμη απάντηση σε χαμηλό pH πιθανόν να οφείλεται σε συσσωμάτωση της τοξίνης της Χολέρας στην επιφάνεια της λιπιδικής μεμβράνης [168]. Έτσι για όλα τα πειράματα που ακολουθούν επιλέγεται ένα ουδέτερο περιβάλλον ($\text{pH}=7$)

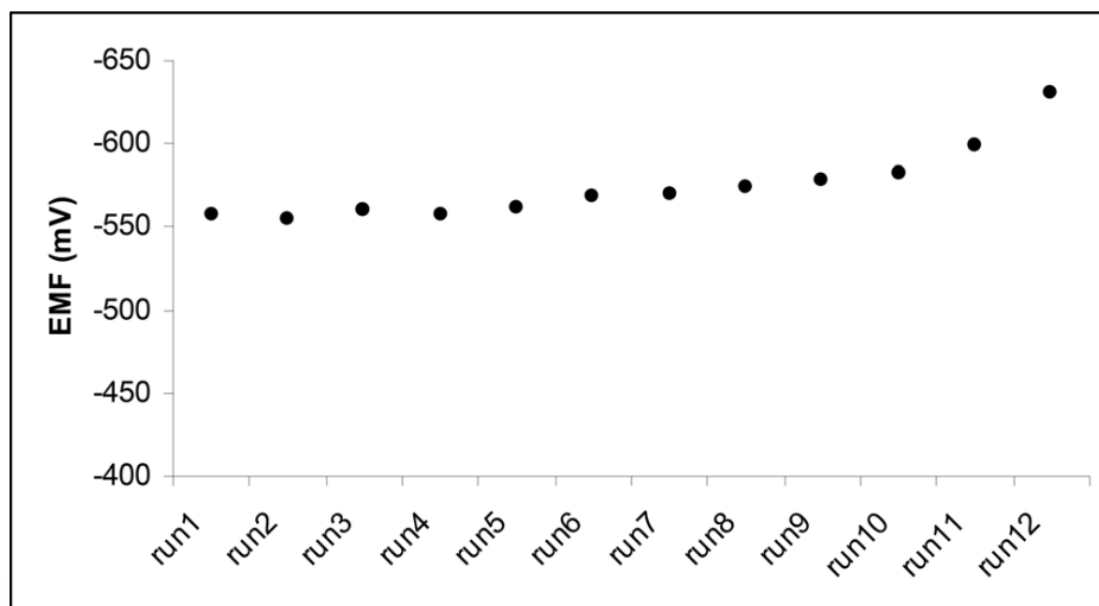


Σχήμα 5.2: Η απόκριση του βιοαισθητήρα σε συγκέντρωση ($C=100\text{nM}$) της τοξίνης της χολέρας σε $\text{pH}= 6.5-7.8$.

Στη συνέχεια έγινε έλεγχος ως προς την αναγεννησιμότητα σε μια κατάσταση διακοπτόμενης ροής διαλύματος της τοξίνης χολέρας σε υδατικά κλάσματα δειγμάτων (10 μL ή 20 μL), που εισρέουν μαζί με έναν ηλεκτρολύτη ($\text{pH}=7.0$). Η ροή κάθε 5 λεπτά σταματάει και καταγράφεται η απόκριση του ηλεκτρόμετρου και έπειτα ξεκινάει η διαδικασία της αναγέννησης του αισθητήρα που γίνεται συνήθως με ήπια οξέα ή απορρυπαντικά ή διάφορους χροοτροπικούς παράγοντες [163-164]. Στη μελέτη της αναγεννησιμότητας πρέπει το διάλυμα που θα χρησιμοποιηθεί να μην διαταράζει την δομή της μεμβράνης και να ευνοεί τον σχηματισμό ιόντων. Έτσι η διαδικασία της αναγέννησης θέλει ιδιαίτερη προσοχή. Για παράδειγμα πολλοί χροοτροπικοί παράγοντες επηρεάζουν τα βιολογικά σύμπλοκα με πολύ υψηλή πιθανότητα μη αναστρέψιμης μετουσίωσης των πρωτεϊνούχων ομάδων [165]. Επίσης τα απορρυπαντικά μπορεί να προκαλέσουν την διαλυτοποίηση της μεμβράνης μέσω μιας διαδικασίας πολλών σταδίων με αποτέλεσμα την άρση της ακινητοποίησης της λιπιδικής μεμβράνης λόγω διαμεμβρανικών κινήσεων των λιπιδίων και της διάσπασης της διαπερατότητας της μεμβράνης [166]. Τα οξέα πρέπει επίσης να αραιωθούν με τέτοιο τρόπο, που να επιτρέπεται ο διαχωρισμός.

Η αναγέννηση του βιοαισθητήρα επιτυγχάνεται με ένα σύστημα συνεχούς ροής στο οποίο η διαχωρισμένη τοξίνη απομακρύνεται συνεχώς και επιτυγχάνεται η μη επανασύνδεσή της με τον υποδοχέα και έπειτα γίνεται επαναισροή της τοξίνης με ρυθμό ροής (2.0 ml/min) ανά 5min. Ο συγκεκριμένος ρυθμός ροής επιλέχθηκε διότι εάν η ροή ήταν μεγαλύτερη (π.χ. 2.5 ml/min) η ισχύς του υποδοχέα θα μειωνόταν σταδιακά και ιδίως μετά τον τρίτο κύκλο αναγεννησιμότητας και αν η ταχύτητα ροής ήταν κάτω από τα 2 ml/min απαιτούνταν περισσότερος χρόνος για να ολοκληρωθεί η αναγέννηση (π.χ. 12 λεπτά με ρυθμό ροής 1.0 ml/min). Ο Χρόνος των 5 λεπτών συμφωνεί με τις τιμές που καταγράφονται στη βιβλιογραφία [19, 24,167].

Στο σχήμα 5.3 φαίνεται η απόκριση του αισθητήρα μετά από κάθε προσπάθεια αναγέννησης. Αυτό που παρατηρείται είναι ότι μετά την δέκατη προσπάθεια αναγέννησης αλλάζει δραματικά ηλεκτρεγερτική δύναμη (EMF) και αυτό μάλλον γίνεται λόγω της αποκόλλησης πλέον του υποδοχέα από την λιπιδική μεμβράνη. Ουσιαστικά δηλαδή αρχίζει να χάνεται σταδιακά η δραστηριότητά του βιοαισθητήρα. Αυτό το αποτέλεσμα καθορίζει και τον μέγιστο αριθμό των πειραμάτων που κάνουμε με κάθε βιοαισθητήρα που κατασκευάσαμε. Ο μέγιστος αριθμός είναι το δέκα, διότι όπως φαίνεται και στο διάγραμμα του σχήματος 5.3 τα αποτελέσματα από κει και πέρα χάνουν την αξιοπιστία τους λόγω της μείωσης της δραστηριότητας του βιοαισθητήρα.



Σχήμα 5.3: Η απόκριση του αισθητήρα μετά από κάθε προσπάθεια αναγέννησης με επαναεισροή της τοξίνης της Χολέρας.

Στη συνέχεια έγινε έλεγχος της επίδρασης των διαφόρων παρεμποδιστών που μπορούν να βρεθούν στα νερά μιας λίμνης. Ο έλεγχος έγινε ξεχωριστά με τον έκαστο παρεμποδιστή μέσα σε ρυθμιστικό διάλυμα (PBS). Επτά από τους πιο βασικούς παρεμποδιστές που εξετάστηκαν (στις παρενθέσεις είναι τα δυναμικά εύρη που χρησιμοποιήθηκαν) είναι οι εξής:

- Το Mg^{2+} (8–40 mg/L)
- Το Ca^{2+} (30–155 mg/L)
- Το HCO_3^{-} (100–800 mg/L),
- Το SO_4^{2-} (50–200 mg/L),
- Το Cl^{-} (100–300 mg/L),
- Το NO_3^{-} (200–800 mg/L),
- Το NH_4^{+} (10–70 mg/L).

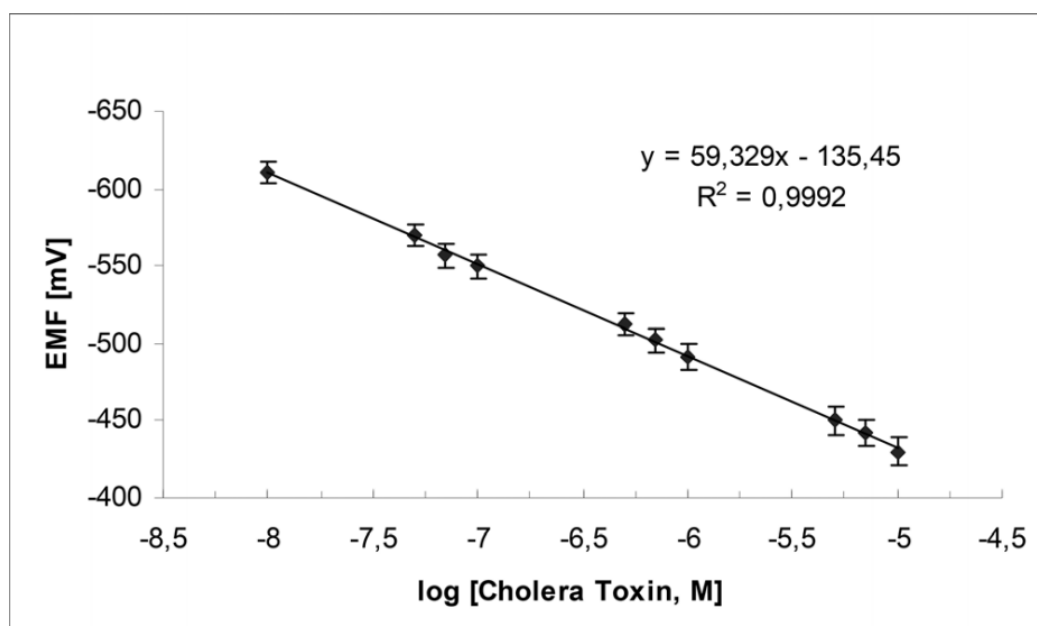
Σε αυτή τη μελέτη δε παρατηρήθηκε κάποια σημαντική μεταβολή, αφού στις περισσότερες περιπτώσεις το σχετικό σφάλμα δεν υπέρβαινε το 5%.

5.5.2. Έλεγχος σε πρότυπα δείγματα

Στη συνέχεια έγινε έλεγχος του βιοαισθητήρα παρουσία της τοξίνης της Χολέρας σε ρυθμιστικό διάλυμα. Στον έλεγχο αυτό παρουσιάστηκε μια εξαιρετική καμπύλη ευαισθησίας με τιμή ίση περίπου με 60 mV ανά δέκατο συγκέντρωσης, επιβεβαιώνοντας την δυναμική ενίσχυση της τιμής κοντά στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα καθώς και την αύξηση της συγκέντρωσης του αναλύτη. Η υψηλή ευαισθησία επιτυγχάνθηκε με την υψηλή αναλογία της επιφάνειας ως προς τον όγκο των νανόφυλλων γραφενίου. Η μεταβλητότητα μιας μέτρησης καθώς και το σχετικό τυπικό σφάλμα (5.95 % όριο εμπιστοσύνης), βρέθηκε να είναι ± 3.8 –4.4 %, (n=40, στον

ίδιο αισθητήρα, αναλύτη και την ίδια μέρα) και 4.6–5.2 % (n=30, σε διαφορετικές μέρες με άλλον αισθητήρα και αναλύτη).

Τα νανόφυλλα του γραφενίου επιτρέψαν την σμίκρυνση του βιοαισθητήρα. Η ηλεκτροχημική αντίδραση του βιοαισθητήρα σε αυτά τα πειράματα προσδιορίστηκε ως η διαφορά δυναμικού μεταξύ του ηλεκτροδίου εργασίας και του ηλεκτροδίου αναφοράς. Σε μια εξαιρετικά σταθερή παραγωγή ευρέθη μια καλή γραμμική καμπύλη ευαισθησίας σε μεγάλο δυναμικό εύρος (10 nM-10 μM) σε pH=7.0. Ο συντελεστής προσδιορισμού, r^2 , βρέθηκε ίσος με 0.9992 (n=3) (Σχήμα 5.4). Τα όρια ανίχνευσης (LOD) ορίστηκαν με βάση τις χαμηλές συγκεντρώσεις που μπορούν να επιτευχθούν κατά τη μέτρηση (S/N=3) και το αποτέλεσμα ήταν (LOD=1 nM).



Σχήμα 5.4: Καμπύλη βαθμονόμησης για την ανίχνευση της τοξίνης της Χολέρας. [Οι ράβδοι σφάλματος υποδηλώνουν την τυπική απόκλιση (n=3)].

5.5.3. Έλεγχος σε πραγματικά δείγματα

Για το σκοπό αυτό ελήφθησαν δείγματα από τη λίμνη Κουμουνδούρου, που βρίσκεται στο δυτικό κομμάτι της Αττικής με πολύ γνωστές φυσικοχημικές και βιολογικές ιδιότητες [169]. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους 4 °C. Πριν τις μετρήσεις έγινε διήθηση δύο φορές διαμέσω φίλτρων Whatman, που έχουν βαθμό διήθησης (GF/A=1.6 μm).

Για τους πειραματικούς σκοπούς τα δείγματα φιλτραρίστηκαν και διαιρέθηκαν σε δέκα κλάσματα, όπου κάθε κλάσμα εμποτίστηκε με διάλυμα τοξίνης στο απαιτούμενο επίπεδο μόλυνσης και αναμιχθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα (PBS) σε pH=7.0. Τα δείγματα προετοιμάστηκαν με μια κατάλληλη μήτρα που χρησιμοποιείται ευρέως σε δοκιμές βιοαισθητήρων για περιβαλλοντικά δείγματα, αφού προηγουμένως έγινε μικροβιολογική και χημική μελέτη ότι απουσιάζουν βακτηριακές τοξίνες.

Πέντε δείγματα χρησιμοποιήθηκαν για έλεγχο χαμηλού επιπέδου με τοξίνη χολέρας συγκεντρώσεως (C= 50nM), και τα άλλα πέντε για έλεγχο υψηλού επιπέδου με τοξίνη χολέρας συγκεντρώσεως (C=7 μM). Αμιγές νερό δίχως τοξίνη εξετάστηκε με τον ίδιο τρόπο με τα εμβολιασμένα δείγματα για να υπάρχει δείγμα αναφοράς για την δυνατότητα σύγκρισης των αποτελεσμάτων.

Όλα τα δείγματα μετρήθηκαν άμεσα μετά την προετοιμασία τους και τα αποτελέσματα από τα εμβολιασμένα δείγματα νερού φαίνονται στον πίνακα 5.1. Η ανάκτηση κυμαινόταν μεταξύ 92-106 % για τις χαμηλές συγκεντρώσεις και 96-103 % για τις υψηλές συγκεντρώσεις.

Πίνακας 5.1: Η ανάκτηση του βιοαισθητήρα για την ανίχνευση της Χολέρας της τοξίνης σε πραγματικά δείγματα νερού

Συγκέντρωση της τοξίνης της Χολέρας	Δείγμα	Ανάκτηση%
Χαμηλή (50 nM)	1	92.14
	2	105.7
	3	92.85
	4	104.1
	5	96.33
Υψηλή (7 μM)	6	102.8
	7	98.84
	8	96.63
	9	101.1
	10	97.26

Η ανάκτηση υπολογίστηκε από τον τύπο (Παρατηρούμενη τιμή/ τιμή αναφοράς) x 100

5.6. Συζήτηση αποτελεσμάτων

Ο βιοαισθητήρας που παρουσιάστηκε παρουσιάζει σχετικά μεγάλη διάρκεια ζωής, αφού μπορεί να αναγεννηθεί 10 φορές χωρίς να χάσει την δραστηριότητά του.

Προκαταρκτικές έρευνες σε σχέση με την αντίδραση του βιοαισθητήρα της τοξίνης της Χολέρας απουσία υποδοχέα δεν είχαν καλή απόδοση. Έτσι αποδεικνύεται ο σημαντικός ρόλος του υποδοχέα στην ανίχνευση της τοξίνης αυτής.

Επίσης οι υψηλές συγκεντρώσεις του GM1 επιβραδύνουν την σύνδεση με την τοξίνη της Χολέρας [170]. Για αυτό σε προκαταρκτικές μελέτες που έγιναν το μέγιστο σήμα προήλθε με αναλογία λιπιδίου:GM1 (20:1), δηλαδή 5 % w/w GM1 σε συγκέντρωση λιπιδίου, μεγαλύτερες συγκεντρώσεις προκαλούσαν μια ελαφρά αστάθεια της λιπιδικής μεμβράνης.

Η εισαγωγή μερικώς φορτισμένων σωματιδίων της πρωτεΐνης μέσα στην λιπιδική μεμβράνη και οι αλλαγές στην δομή των λιπιδικών στρωμάτων προκαλεί ηλεκτροστατικές αλλαγές στις μεμβράνες, δηλαδή στην χωρητικότητα. Η τοξίνη της χολέρας δεσμεύεται στις μεμβράνες λιπιδίων με την υπομονάδα A προσανατολισμένη μακριά από την επιφάνεια της μεμβράνης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα μεταβολές του δυναμικού της μεμβράνης. Η τοξίνη της Χολέρας έχει ένα ισοηλεκτρικό σημείο $pI=6.6$. Οι χρωματογραφικές ιδιότητες δείχνουν ότι η κατιοντική επιφάνεια εκτίθεται σε $pH=7.0$, όπου προφανώς έγκειται στην υπομονάδα B [171]. Αυτή η παραδοχή έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματά μας, ότι το βέλτιστο $pH= 7.0$.

5.7.Συμπεράσματα

Σε αυτή την εργασία κατασκευάστηκε ένας βιοαισθητήρας ροής (flow-injection), όπου δοκιμάζεται πρώτη φορά για την ανίχνευση της τοξίνης της χολέρας δίνοντας πολύ καλά αποτελέσματα, δηλαδή:

- Μια πολύ απλή τεχνική κατασκευής
- Μια πολύ απλή μέθοδο ανίχνευσης (ποτενσιομετρία)
- Ένα καλό όριο ανίχνευσης ($LOD=1 \text{ nM}$)
- Ένας καλός χρόνος απόκρισης (5 min)
- Μια καλή αναγεννησιμότητα (10 φορές)
- Ανεκτές ανακτήσεις (92-106 %), σύμφωνα με τις κατευθυντήριες γραμμές του ICH2005 (80-115 %)

Ο βιοαισθητήρας λοιπόν είναι ικανός για χρήση σε επαναλαμβανόμενες μετρήσεις μετά την αναγέννησή του σε υδατικά διαλύματα και μπορεί να χρησιμεύσει ως ένα κατάλληλο μοντέλο για την ανάπτυξη συστημάτων ανίχνευσης και για άλλα σχήματα τοξίνης-υποδοχέα [171-173].

Κεφ 6: Ανάπτυξη πρότυπου απτοαισθητήρα χρυσού με ακινητοποίηση δενδριμερούς για τον προσδιορισμό της Αφλατοξίνης M1 στο γάλα

6.1.Εισαγωγή

Η παρούσα εργασία περιγράφει έναν απτοαισθητήρα με μήτρα (matrix) χρυσού και ένα ακινητοποιημένο δενδριμερές (PAMAM) με βιοσυμβατά απταμερή ως υποδοχείς για τον προσδιορισμό της Αφλατοξίνης (AFM1) με διηλεκτρική φασματοσκοπία (EIS). Ο απτοαισθητήρας αυτός ελέγχθηκε σε πρότυπα δείγματα με ρυθμιστικό διάλυμα και σε αληθινά δείγματα γάλακτος από την αγορά της Μπρατισλάβα.

Τα πειράματα αυτά έγιναν στο πανεπιστήμιο Comenius της Μπρατισλάβα τα έτη 2016-18 στο εργαστήριο του καθηγητή Tibor Hianik και τα αποτελέσματα δημοσιεύτηκαν στο περιοδικό Sensor της MDPI ενώ μέρος αυτών παρουσιάστηκε σε poster συνεδρίου του πανεπιστημίου της Μπρατισλάβα (περισσότερες λεπτομέρειες στα παραρτήματα).

6.2.Οργανολογία

Σε αυτή την εργασία χρησιμοποιήθηκε ο γαλβανοστάτης-ποτενσιοστάτης AUTOLAB PGSTAT12 με λογισμικό nova (Metrohm Autolab b.v., Herisau, Switzerland) (εικόνα 6.1).



Εικόνα 6.1: Το μηχάνημα AUTOLAB PGSTAT12 που χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα πριν τη χρήση (αριστερά) και κατά τη διάρκεια της χρήσης (δεξιά)

Η ανίχνευση της AFM1 έγινε χωρίς δείκτες (Label-free), δηλαδή με ανίχνευση φυσικών παραμέτρων και όχι χρήση μοριακού σήματος, σε ηλεκτρόδια εργασίας χρυσού (Au), αναφοράς Ag/AgCl και μετρήσεως πλατίνας (Pt). Ο γαλβανοστάτης ρυθμίστηκε έτσι ώστε η βαθμονόμηση να γίνει με βάση τις σχετικές μεταβολές της αντίστασης μεταφοράς φορτίου R_{ct} στο κύκλωμα Randles (Εσωτερικό του σχήματος 6.5).

Το εύρος συχνότητας (frequency range) που χρησιμοποιήθηκε ήταν (0.1Hz-100 kHz) με εφαρμογή 5 mV πλάτους τάσης (voltage amplitude) και δυναμικό DC 0.22 V. Τα πειράματα αυτά έγιναν σε υγρό εργασίας όπου περιείχε PBS και 5mM (1:1) $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/4}$. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με το πρόγραμμα originlab.

6.3.Χημικά αντιδραστήρια

Σε αυτή τη μέθοδο ακινητοποίησης χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή του απτοαισθητήρα διαλύματα διχλωρίδιου της κυσταμίνης (Cys) 96%, γλουταρδεΐδη σε νερό 25% (GA), δενδριμερές poly(amido-amine) (PAMAM, G4) 4^{ης} γενιάς σε μεθανόλη (10 wt.%) και υδροβορικό νάτριο NaBH_4 . Το δενδριμερές (dendrimer) είναι ένα πολυμερές με συμμετρικά διακλαδισμένα μόρια γύρω από τον πυρήνα του που συχνά υιοθετούν μια σφαιρική τρισδιάστατη μορφολογία [174]. Ο υποδοχέας ήταν ένα 21-μερές DNA απταμερές, που είχε την εξής διάταξη: 5'- ACT GCT AGA GAT TTT CCA CAT-3' (APT1) που περιγράφεται στην αναφορά [10] και το 5 άκρο της έχει μια αμιδική ομάδα ή θειική ομάδα (-SH).

Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε η Αφλατοξίνη M1 (AFM1) (M.w. 328.27 Da), προϊόν της μυκοτοξίνης *Aspergillus flavus*, ενώ για τις διαλυτοποιήσεις των διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε ένα ρυθμιστικό διάλυμα PBS (137 mM NaCl, 27 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1.8 mM KH_2PO_4 , pH=7.4). Οι μετρήσεις έγιναν σε ένα διάλυμα $[\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$].

Πριν την έναρξη της κατασκευής του απτοαισθητήρα καθαρίστηκε τόσο χημικά όσο και ηλεκτροχημικά με συγκεκριμένη διαδικασία που έχει περιγραφεί σε εργασία του παρελθόντος [175-176] το χρυσό ηλεκτρόδιο. Η χρυσή επιφάνεια γυαλίστηκε χρησιμοποιώντας ένα κιτ γυαλίσματος αποτελούμενο από σκόνη αλουμίνιας 1.0 και 0.3 μm (CH Instruments). Έπειτα καθαρίστηκε με υπερήχους για 15 λεπτά σε αιθανόλη ακολουθούμενο από ηλεκτροχημικό καθαρισμό 20 κύκλων σε κυκλική βολταμετρία (CV) με διάλυμα 1 M H_2SO_4 σε δυναμικό εύρος 0.2-1.5 V με ηλεκτρόδιο αναφοράς Ag/AgCl και ρυθμό σάρωσης (scan rate) 100 mV/s. Ακολούθως τα ηλεκτρόδια εκπλύθηκαν πάλι σε αιθανόλη, απιονισμένο νερό και ξηράθηκαν υπό άζωτο και αμέσως ξεκίνησε η ακινητοποίηση. Τα ηλεκτρόδια που χρησιμοποιήθηκαν είχαν διάμετρο 2 mm (CH Instruments, Austin, TX, USA).

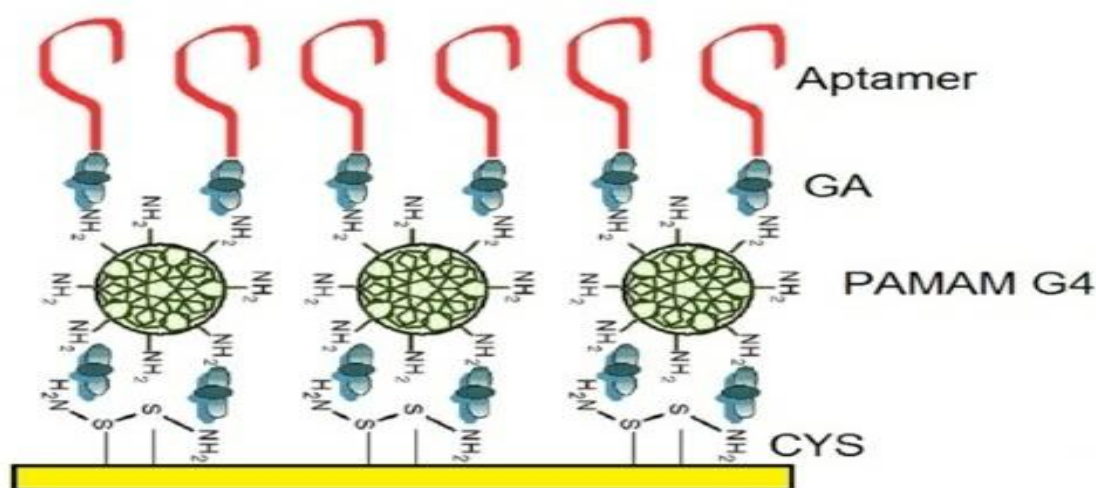
6.4.Κατασκευή του απτοαισθητήρα

Η συγκεκριμένη μέθοδος ακινητοποίησης υιοθετήθηκε από πρόσφατη δημοσίευση [176]. Τα δενδριμερή ακινητοποιήθηκαν πάνω σε στρώμα κυσταμίνης, όπου είχε απορροφηθεί χημικά πάνω στο ηλεκτρόδιο του Χρυσού. Για να γίνει αυτό,

ένα καθαρό ηλεκτρόδιο χρυσού βυθίστηκε σε 0.1 M υγρό διάλυμα διχλωριδίου της κυσταμίνης για 2 ώρες. Στη συνέχεια καθαρίστηκε προσεκτικά σε απιονισμένο νερό και το ηλεκτρόδιο βυθίστηκε σε 5% γλουταρδεΐδη (GA) για 1 ώρα και πλύθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα (PBS).

Έχοντας φτιάξει το πρώτο στρώμα, το ηλεκτρόδιο βυθίστηκε σε 70 μM (PAMAM,G4) διαλυμένο σε PBS για 5 ώρες. Προκειμένου να μπλοκαριστούν οι ανενεργές ομάδες του GA και να εμποδιστούν οι μη εξειδικευμένες αλληλεπιδράσεις, 5 mM NaBH_4 επίδρασαν στην επιφάνεια του στρώματος για 30 λεπτά.

Έπειτα το ηλεκτρόδιο καθαρίστηκε με PBS και επαναβυθίστηκε σε 5% GA για 1 ώρα και επανακαθαρίστηκε με PBS επικαλυπτόμενο άμεσα με 1 μM απταμερές (APT1) για 16 ώρες. Στη συνέχεια επαναμπλοκαρίστηκαν οι ανεπιθύμητες ομάδες με 5 mM NaBH_4 και αφού το ηλεκτρόδιο καθαρίστηκε με PBS, ο αισθητήρας πλέον ήταν έτοιμος για την ηλεκτροχημική ανίχνευση της AFM1.



Σχήμα 6.1: Τυπική απεικόνιση του απτοαισθητήρα που χρησιμοποιήθηκε

Η ανίχνευση της AFM1 έγινε με χρήση της διηλεκτρικής φασματοσκοπίας (EIS) παρουσία 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/4}$ και βασίστηκε στον προσδιορισμό της αντίστασης μεταφοράς φορτίου R_{ct} που άλλαξε παρουσία της αναλυόμενης ουσίας. Αυτή είναι μια γνωστή προσέγγιση που παρουσιάστηκε σε σχετική εργασία στο παρελθόν [177].

6.5. Λειτουργικός έλεγχος του απτοαισθητήρα

Ο έλεγχος του απτοαισθητήρα γίνεται σε πρότυπα δείγματα με ρυθμιστικό διάλυμα και σε πραγματικά δείγματα γάλακτος. Η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε ήταν η διηλεκτρική φασματοσκοπία (EIS), διότι η AFM1 δεν έχει οξειδοαναγωγική δράση στην ανίχνευση της με το APT1, αλλά παρουσία του $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/4}$ σε δυναμικό περίπου 0.22 V έναντι του Ag/AgCl ως ηλεκτροδίου αναφοράς γίνεται η μέγιστη μεταφορά φορτίου μεταξύ του ζευγαριού οξειδοαναγωγής και της επιφάνειας του ηλεκτροδίου.

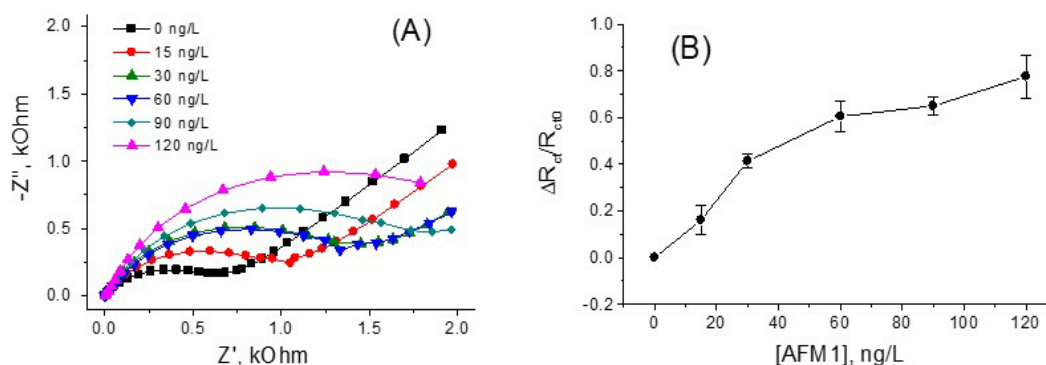
Οι αλλαγές στην επιφάνεια μετά την δέσμευση της AFM1 μπορεί να επηρεάσουν την μεταφορά φορτίου. Παρόλα αυτά ανιχνεύοντας τις αλλαγές στην μεταφορά της αντίστασης, R_{ct} , ανιχνεύεται η αλληλεπίδραση της AFM1 με την επιφάνεια του απτοαισθητήρα.

6.5.1. Έλεγχος σε πρότυπα δείγματα

Τα αποτελέσματα του ελέγχου σε πρότυπα δείγματα παρουσιάζονται στο σχήμα 6.4 A, όπου είναι οι αποκρίσεις στην EIS σε κάθε συγκέντρωση AFM1 και άνευ τοξίνης (0 ng/L). Σε αυτά τα διαγράμματα διακρίνεται από τα εμπεριεχόμενα ημικύκλια ότι όσο η συγκέντρωση της AFM1 αυξάνεται τόσο το πλάτος του ημικυκλίου αυξάνεται μαζί με την αντίσταση μεταφοράς φορτίου (R_{ct}) στο κύκλωμα Randles (εσωτερικό του σχήματος 6.3). Η διάμετρος του ημικυκλίου είναι ανάλογη με την αντίσταση μεταφοράς φορτίου. Η αύξηση αυτή μπορεί να οφείλεται στην δημιουργία φραγμού που εμποδίζει μερικώς τη διάχυση του ζεύγους οξειδοαναγωγής από το διάλυμα στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου.

Με τη χρήση του λογισμικού NOVA (Metrohm Autolab b.v.) και του originlab κατασκευάστηκε η καμπύλη βαθμονόμησης στο σχήμα 6.2 B του $\Delta R_{ct}/R_{ct0}$ έναντι της AFM1, που είναι πρακτικά μια ευθεία γραμμή στο δυναμικό εύρος (15-120 ng/l) που έγινε η ανίχνευση. Από την αναλογία της SD/κλίση της καμπύλης (SD =τυπική απόκλιση) εξήχθη το όριο ανίχνευσης ($LOD=8.5$ ng/L).

Τα αποτελέσματα στο 6.4 B εμφανίζουν τον μέσο όρο \pm τυπική απόκλιση από 3 ανεξάρτητα πειράματα. Το ένα εκ των πειραμάτων εμφανίζεται στο Σχήμα 6.4 A. Τα πειράματα έγιναν σε PBS που περιείχε 5 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ σε αναλογία (1:1) σαν οξειδοαναγωγικό παράγοντα.

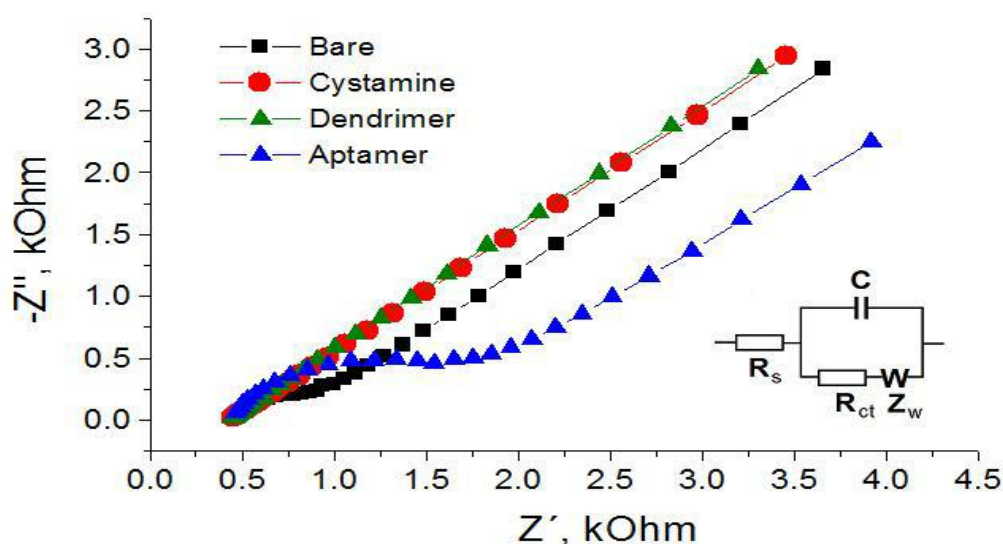


Σχήμα 6.2: A) Ποτενσιομετρικό διάγραμμα ελέγχου του AFM1 του απτοαισθητήρα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις B) Καμπύλη βαθμονόμησης των σχετικών μεταβολών της R_{ct} ($\Delta R_{ct}/R_{ct0}=(R_{ct}-R_{ct0})/R_{ct0}$) έναντι της συγκεντρώσεως, που προέκυψε από το διάγραμμα A.

Εντωμεταξύ με τη μέθοδο EIS έγινε ανάλυση σε όλα τα επίπεδα προσθήκης του απτοαισθητήρα ως προς την διαφοροποίηση της αντίστασης μεταφοράς φορτίου(R_{ct}).

Το διάγραμμα αυτή της αναλύσεως εμφανίζεται στο σχήμα 6.5, όπου διακρίνονται οι ημικυκλικές διαφορές σε κάθε στάδιο προσθήκης, όπου έγινε στρώμα προς στρώμα (layer by layer).

Στο εσωτερικό του διαγράμματος που ακολουθεί (Σχήμα 6.5) εμφανίζεται το κύκλωμα Randles όπου σε αυτό έγινε η ανάλυση των ιδιοτήτων των στρώσεων. R_s και R_{ct} , που είναι οι αντιστάσεις του ηλεκτρολύτη και η μεταφορά φορτίου αντίστοιχα. Το Z_w είναι η σύνθετη αντίσταση Warburg, που προκύπτει από τη διάχυση του ανιχνευτή οξειδοαναγωγής και C είναι η χωρητικότητα της επιφάνειας/διάλυμα ηλεκτροδίου. Τα πειράματα αυτά έγιναν εξίσου παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος που περιείχε 5 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ και PBS σε αναλογία (1:1) σαν οξειδοαναγωγικό παράγοντα.



Σχήμα 6.3: Ποτενσιομετρικά διαγράμματα που αντιστοιχούν στα στάδια της παρασκευής του απτοαισθητήρα α) στην επιφάνεια του σκέτου χρυσού (bare) β) στο στρώμα της κυσταμίνης (cystamine) γ) το δενδριμερές (dendrimer) δ) στην ακινητοποίηση του απταμερούς (aptamer).

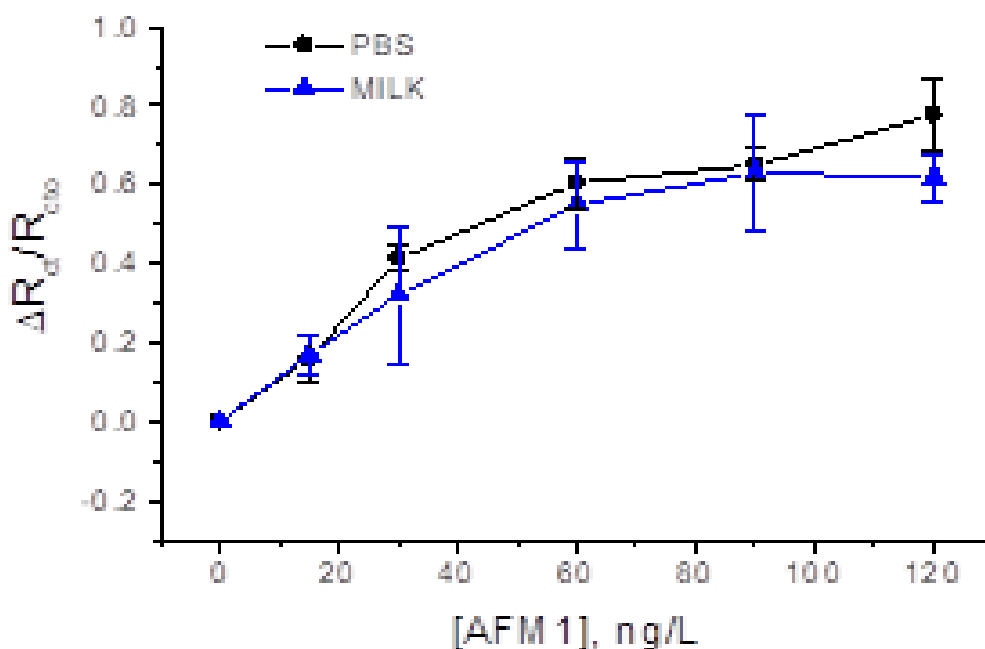
6.5.2 Έλεγχος σε δείγματα γάλακτος

Τα δείγματα γάλακτος προετοιμάστηκαν σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται σε πρόσφατη δημοσίευση [15]. Το δείγμα αγελαδινού γάλακτος που είχε παστεριωθεί με την μέθοδο UHT είχε 3.5% λιπαρά και αγοράστηκε από την τοπική αγορά της Μπρατισλάβα. Στο γάλα πρώτα εναποτέθηκαν συγκεκριμένες ποσότητες AFM1 σε δυναμικό εύρος (15-120 ng/L) και έπειτα θερμοστατήθηκαν σε 40°C. Έπειτα το μολυσμένο γάλα αραιώθηκε με μεθανόλη σε αναλογία 3 :1 v/v και φυγοκεντρήθηκε σε ταχύτητα 5000 rpm για 5 λεπτά.

Το υπερκείμενο υγρό αραιώθηκε σε αναλογία 1: 10 v/v με PBS. Ο απτοαισθητήρας καταβυθίστηκε στα δείγματα γάλακτος για 60 λεπτά και καταγράφηκε το σήμα. Η ανάκτηση του αισθητήρα υπολογίστηκε με την εξίσωση $[(\Delta R_{ct}/R_{cto}) \text{ PBS}/(\Delta R_{ct}/R_{cto}) \text{ milk}] \times 100\%$, όπου $(\Delta R_{ct}/R_{cto}) \text{ PBS}$ είναι οι αλλαγές στην αντίσταση μεταφοράς φορτίου σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις της AFM1 στο ανάλογο ρυθμιστικό διάλυμα και το $(\Delta R_{ct}/R_{cto}) \text{ milk}$ οι ανάλογες διαφορές σε δείγματα γάλακτος.

Σε αυτά τα πειράματα έγινε ενβύθιση του απτοαισθητήρα σε γάλα χωρίς AFM1 για 1 ώρα. Έπειτα έγινε έκπλυση με PBS και μέτρηση σε EIS με 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ ως οξειδοαναγωγικό παράγοντα διαλυμένο σε PBS με αναλογία (1:1) και προσδιορίστηκε το R_{ct} και έπειτα έγινε η ίδια διαδικασία και στα δείγματα του γάλακτος που περιείχαν συγκεκριμένες ποσότητες AFM1 σε δυναμικό εύρος (15-120 ng/L).

Στο σχήμα 6.4 συγκρίνονται οι αλλαγές στην αντίσταση μεταφοράς φορτίου έναντι της συγκεντρώσεως της AFM1 σε ρυθμιστικό διάλυμα και γάλα. Από αυτό το διάγραμμα μπορούμε να δούμε μόνο σχετικά μικρές αποκλίσεις μεταξύ των καμπυλών που αποδεικνύουν την καλή ανάκτηση του αισθητήρα. R_{cto} , R_{ct} είναι οι αντιστάσεις μεταφοράς φορτίων χωρίς και με συγκεκριμένη συγκέντρωση AFM1, αντίστοιχα στο PBS και στο μολυσμένο γάλα (milk). Τα αποτελέσματα παρουσιάζουν τον μέσο όρο \pm τυπική απόκλιση από 3 ξεχωριστά πειράματα.



Σχήμα 6.4: Καμπύλες βαθμονόμησης των σχετικών αλλαγών της R_{ct} ($\Delta R_{ct}/R_{cto}=(R_{ct}-R_{cto})/R_{cto}$) σε γάλα (milk) και ρυθμιστικό διάλυμα (PBS) έναντι της συγκεντρώσεως της AFM1

Από τις καμπύλες υπολογίστηκε η ποσοστιαία ανάκτηση από τη διαφορά μεταξύ του $(\Delta R_{ct}/R_{cto}=(R_{ct}-R_{cto})/R_{cto})_{PBS}$ και του $(\Delta R_{ct}/R_{cto}=(R_{ct}-R_{cto})/R_{ct})_{milk}$ (πίνακα 6.1). Οι ποσοστιαίες ανακτήσεις του απτοαισθητήρα αυτού υπολογίστηκαν μεταξύ του 78.04 και του 106.25 %.

Πίνακας 6.1: Σύγκριση των κορυφών στις καμπύλες βαθμονόμησης του σχήματος 6.4

Συγκέντρωση AFM1, ng/L	PBS $\Delta R_{ct}/R_{cto}$	Γάλα $\Delta R_{ct}/R_{cto}$	Ανάκτηση %
15	0.16	0.17	106.25 %
30	0.41	0.32	78.04 %
60	0.61	0.55	90.16 %
90	0.65	0.63	97.00 %
120	0.78	0.62	79.5%

Η ποσοστιαία ανάκτηση υπολογίστηκε από τον τύπο: $[(\Delta R_{ct}/R_{cto})_{milk}/(\Delta R_{ct}/R_{cto})_{PBS}] \times 100\%$.

6.6.Συζήτηση αποτελεσμάτων

Ο συγκεκριμένος απτοαισθητήρας είναι **χωρίς δείκτες (label free)**, επειδή δεν χρειάζεται κάποιον δείκτη προκειμένου να προσδιοριστεί ο αναλύτης. Αυτό είναι ένα πλεονέκτημα σε ότι αφορά πρακτικά την εφαρμογή του, αφού παρέχει ανάλυση μεγάλων δειγμάτων γάλακτος με χαμηλό κόστος.

Κατά την ανάλυση **στρώματος προς στρώμα (layer by layer)** στο σχήμα 6.3 η ευθεία γραμμή της χημειοαπορρόφησης της κυσταμίνης στην χρυσή επιφάνεια δείχνει την υψηλή αγωγιμότητα αυτής της δομής, όπου οφείλεται στην γρήγορη διάχυση των δεικτών της οξειδοαναγωγής. Όταν έγινε προσθήκη του PAMAM, το θετικό φορτίο διευκόλυνε τη διάχυση του οξειδοαναγωγικού ανιχνευτή κοντά στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου και έτσι η ακινητοποίηση του απταμερούς είναι αποτέλεσμα της αύξησης της ημικυκλικής διαμέτρου άρα και της αντίστασης μεταφοράς φορτίου. Αυτό το αποτέλεσμα δείχνει ότι το DNA απταμερές είναι φορτισμένο αρνητικά και έτσι το οξειδοαναγωγικό ζευγάρι απορρίπτεται από την επιφάνεια του ηλεκτροδίου που αυξάνει τις τιμές του Rct. Αυτή η προσέγγιση συμφωνεί με παρελθοντική εργασία [176].

Στα πραγματικά δείγματα **η ανάκτηση**, δηλαδή η ποσοστιαία διαφορά σήματος μεταξύ πραγματικών και πρότυπων δειγμάτων, δείχνει την μερική επίδραση άλλων ουσιών που βρίσκονται σε πραγματικά δείγματα με τον απτοαισθητήρα, με λίγες τιμές να ξεπερνούν το 100% (πίνακας 6.1) κάτι που είναι ικανοποιητικό πως προς αυτή την ανάλυση. Το 100 % είναι η αναμενόμενη θετική απόδοση από μια τυπική κατανομή των αναλυτικών αποτελεσμάτων από αναλυτές που εμφανίζουν τιμές κοντά στο 100 %, που είναι ισοδύναμα αποτελέσματα με την αρνητική τιμή του μέσου όρου. Η επίδραση λοιπόν των πρωτεϊνών του γάλακτος στην επιφάνεια του απτοαισθητήρα εμποδίζει μερικώς αλλά σε ανεκτό επίπεδο την διάχυση του οξειδοαναγωγικού ανιχνευτή στην επιφάνεια ανίχνευσης.

Επίσης πρέπει να τονιστεί ότι έγιναν προκαταρκτικά πειράματα τόσο σε AFB1 όσο και σε Ωχρατοξίνη με τον συγκεκριμένο απτοαισθητήρα και τα αποτελέσματα ήταν αρνητικά ως προς την ανίχνευση τους. Αυτό αποδεικνύει ότι ο απτοαισθητήρας αυτός έχει καλή **εκλεκτικότητα**, αφού δεν μπορεί να ανιχνεύσει άλλες μυκοτοξίνες.

Ο απτοαισθητήρας αυτός επίσης έχει **αναγεννησιμότητα** (τουλάχιστον 3 φορές), χωρίς να υπάρξει σημαντική απώλεια της δραστηριότητάς του, όπως δείχνει και παλαιότερη μελέτη [176]. Αυτό συμβαίνει διότι η αλληλεπίδραση του αναλύτη με το απταμερές βασίζεται σε ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις ή αλληλεπιδράσεις Van der Waals και έτσι η αναγέννηση του απτοαισθητήρα είναι δυνατή με εμβάπτιση του αισθητήρα σε διάλυμα υψηλής ιοντικής ισχύος, για παράδειγμα 2M NaCl ή δωδεκυλοθειικό νάτριο (SDS) (αναφορά 12) ή 0,2 M διαλύματος γλυκίνης.

Το όριο ανίχνευση που ευρέθη (8,5 ng/l) είναι μέσα στα όρια που έχει ορίσει τόσο η ΕΕ (LOD=47,2 ng/l) όσο και οι ΗΠΑ (LOD=472,0 ng/l).

6.7.Συμπεράσματα

Σε αυτή την εργασία κατασκευάστηκε ένας απτοαισθητήρας που είχε χρησιμοποιηθεί ξανά στο παρελθόν για ανίχνευση της AFB1 με άλλο απταμερές ως υποδοχέα [176]. Για πρώτη φορά δοκιμάζεται για την ανίχνευση της AFM1 δίνοντας πολύ καλά αποτελέσματα. Το μειονέκτημα αυτού του απτοαισθητήρα είναι ο μεγάλος χρόνος κατασκευής (περίπου 26 ώρες) αλλά έχει μια πληθώρα άλλων πλεονεκτημάτων που είναι τα εξής:

- Η καλή αναγεννησιμότητα (3 φορές χωρίς να χάσει την δραστηριότητά του)
- Η καλή εκλεκτικότητα (μπορεί να δράσει μόνο για την AFM1)
- Ανεκτό και χαμηλό όριο ανίχνευσης (8.5 ng/l)
- Η καλή ποσοστιαία ανάκτηση σε πραγματικά δείγματα

Κεφ 7: Ανάπτυξη πρότυπου απτοαισθητήρα χρυσού με ακινητοποίηση Neutravidin/Fe-COOH για τον προσδιορισμό της Αφλατοξίνης M1 στο γάλα

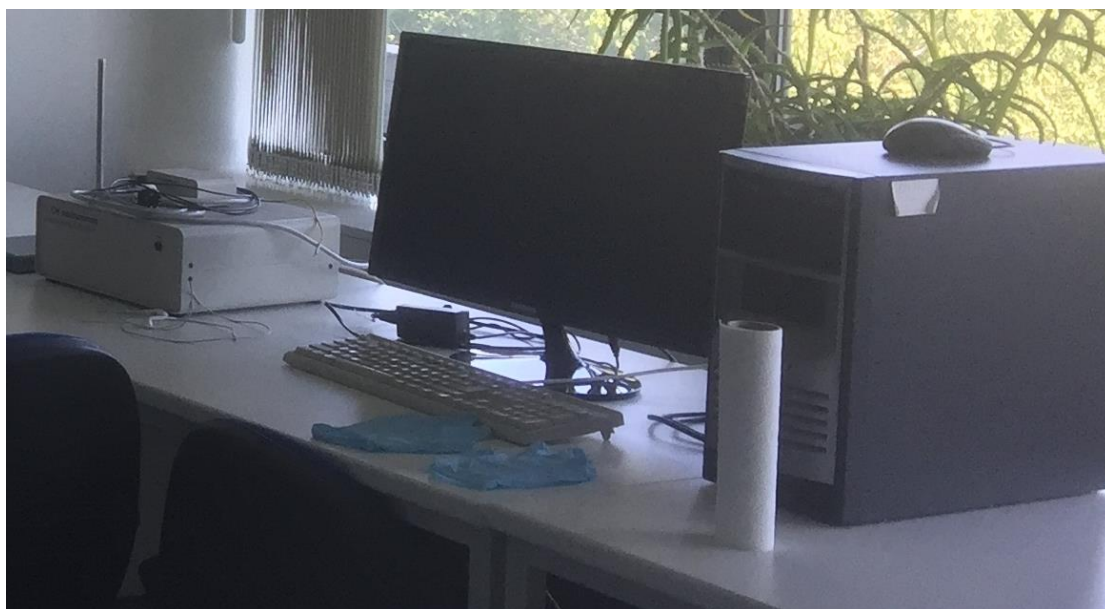
7.1.Εισαγωγή

Η παρούσα εργασία περιγράφει έναν απτοαισθητήρα με μήτρα (matrix) χρυσού και ένα ακινητοποιημένο στρώμα Neutravidin/Fe-COOH με βιοσυμβατά απταμερή ως υποδοχείς για τον προσδιορισμό της Αφλατοξίνης (AFM1) με Διαφορική Παλμική Βολταμετρία (DPV). Ο απτοαισθητήρας αυτός ελέγχθηκε σε πρότυπα δείγματα με ρυθμιστικό διάλυμα.

Τα πειράματα αυτά έγιναν στο πανεπιστήμιο Comenius της Μπρατισλάβα τα έτη 2016-18 στο εργαστήριο του καθηγητή Tibor Hianik και μέρος των αποτελεσμάτων δημοσιεύτηκαν στο περιοδικό Sensor της MDPI (περισσότερες λεπτομέρειες στα παραρτήματα).

7.2. Οργανολογία

Σε αυτή την εργασία χρησιμοποιήθηκε ο ποτενσιοστάτης CHI 440 (CH Instruments, USA).



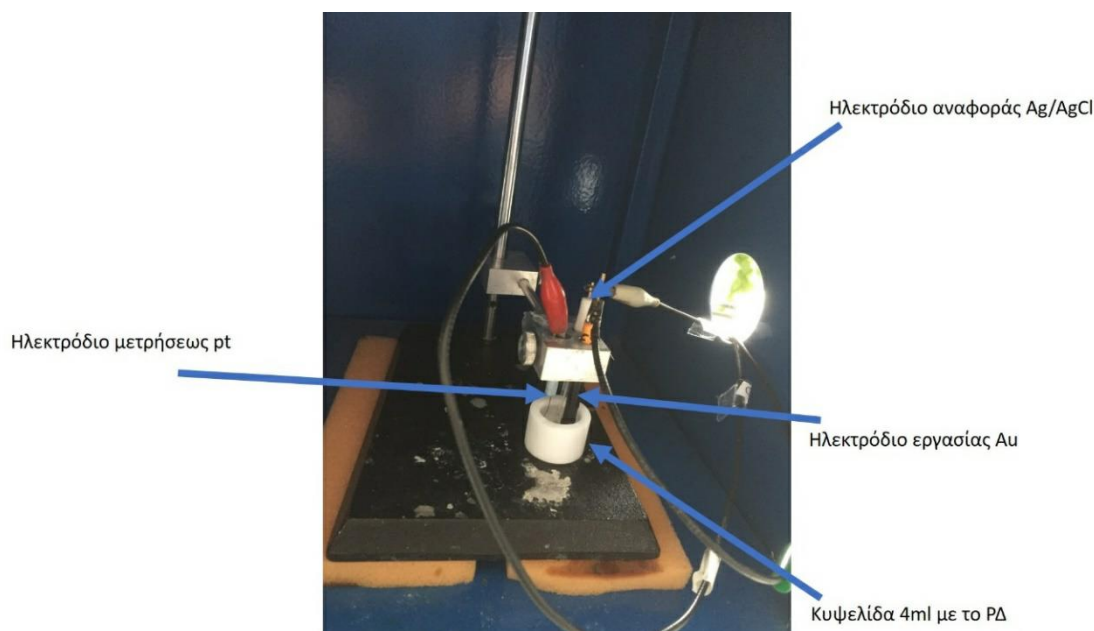
Εικόνα 7.1: Το μηχάνημα CHI 440 που χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα

Η ανίχνευση με αυτόν τον απτοαισθητήρα έγινε με δείκτες, σε ηλεκτρόδια εργασίας χρυσού (Au), αναφοράς Ag/AgCl και μετρήσεως πλατίνας (Pt). Η συγκεκριμένη ανίχνευση έγινε προκειμένου να συγκριθεί με την ανίχνευση χωρίς δείκτη (Label-free), που έγινε στο κεφάλαιο 6. Ο ποτενσιοστάτης ρυθμίστηκε έτσι

ώστε η βαθμονόμηση να γίνει με βάση τις σχετικές μεταβολές της κορυφής του ρεύματος I στο βολταμογράφημα του εκάστου απταμερούς που χρησιμοποιήθηκε.

Οι ηλεκτρικοί παράμετροι των απτοαισθητήρων προσδιορίστηκαν με χρήση 4 mL Teflon κυψελίδα με διαμόρφωση τριών ηλεκτροδίων. Το ηλεκτρόδιο εργασίας περιείχε χρυσή επιφάνεια διαμέτρου 2 mm, το ηλεκτρόδιο αναφοράς ήταν το Ag/AgCl και το βοηθητικό ηλεκτρόδιο είναι ένα συρματάκι από πλατίνα (Pt). Όλα τα ηλεκτρόδια προέρχονται από την CH Instruments. Το δυναμικό εύρος (potential range) που χρησιμοποιήθηκε ήταν (-0,2- 0,7 V) με χρόνο προετοιμασίας (quiet time) 2s.

Τα πειράματα αυτά έγιναν σε υγρό εργασίας όπου περιείχε διάλυμα PBS για το APT2a και HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) 10mM pH 7.4 για το APT2b. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με το πρόγραμμα originlab.



Εικόνα 7.2: Το σύστημα τριών ηλεκτροδίων εν ώρα εργασίας.

7.3.Χημικά αντιδραστήρια

Σε αυτή τη μέθοδο ακινητοποίησης χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή του απτοαισθητήρα διαλύματα Neutravidin (NA) από την Biotech (Bratislava, Slovakia) και [Fe-COOH]. Για την ενεργοποίηση του [Fe-COOH] χρειάστηκαν το 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) και το N-hydroxysuccinimide (NHS). Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν δύο απταμερή ως υποδοχείς. Πρώτο χρησιμοποιήθηκε το 15-μερές απταμερές που στο 5 άκρο έχει μια αμιδική ομάδα ή θειική ομάδα(-SH) και τροποποιήθηκε με βιοτίνη. Το απταμερές αυτό έχει την εξής μορφή: 5'-TTT TTT TTT TTT TTT ACT GCT AGA GAT TTT CCA CAT-3' (APT2a). Εναλλακτικά χρησιμοποιήθηκε το 50-μερές DNA απταμερές που τροποποιήθηκε στο 5' άκρο του με βιοτίνη και έχει την μορφή: 5'- GTT GGG CAC GTG TTG TCT CTC TGT GTC TCG

TGC CCT TCG CTA GGC CCA CA -3' (APT2b), που χαρακτηρίζεται από μεγάλη εκλεκτικότητα στην AFM1 και έχει σταθερά διάστασης ($K_d = 10 \text{ nM}$) [9,178]

Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε η Αφλατοξίνη M1 (AFM1) (M.w. 328.27 Da), προϊόν της μυκοτοξίνης *Aspergillus flavus* ενώ για της διαλυτοποιήσεις των διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα PBS (137 mM NaCl, 27 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1.8 mM KH_2PO_4 , pH=7.4). Οι μετρήσεις έγιναν σε διάλυμα PBS για το APT2a και HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) 10mM pH 7.4 για το APT 2b.

Η μέθοδος καθαρισμού των ηλεκτροδίων είναι η ίδια με αυτή που περιγράφηκε στην ενότητα 6.3.

7.4.Κατασκευή του απτοαισθητήρα

Αυτοί οι απτοαισθητήρες κατασκευάστηκαν με χρήση απταμερών DNA (APT2a ή APT2b) τροποποιημένα στο 5' άκρο της με βιοτίνη ακινητοποιημένη σε στρώμα neutravidin χημειοαπορροφημένα σε επιφάνεια χρυσών ηλεκτροδίων. Η αλληλεπίδραση του απτοαισθητήρα με την AFM1 στηρίζεται στην ισχυρή χημική συγγένεια μεταξύ της βιοτίνης και της neutravidin. Προκειμένου της να ανιχνευτεί η AFM1 ηλεκτροχημικά το στρώμα της neutravidin πρέπει να τροποποιηθεί από (Fe-COOH), που έχει καλό οξειδοαναγωγικό σήμα. Στο σχήμα 7.1 παρουσιάζεται ο τρόπος που δημιουργήθηκε το στρώμα αυτού του βιοαισθητήρα.

Ο Απτοαισθητήρας προετοιμάστηκε με τα ακόλουθα βήματα. Πρώτα τα καθαρά ηλεκτρόδια βυθίζονται στη neutravidin, που έχει αραιωθεί με απιονισμένο νερό, συγκεντρώσεως 125 $\mu\text{g/ml}$ για 15 λεπτά. Αυτή είναι μια κοινότητα διαδικασία σταθεροποίησης του στρώματος της neutravidin σε στρώμα χρυσού [179]. Έπειτα το ηλεκτρόδιο εκπλύνεται με απιονισμένο νερό και το ηλεκτρόδιο με το στρώμα neutravidin βυθίζεται σε διάλυμα που περιέχει ενεργοποιημένο διάλυμα Fe-COOH για 2 ώρες. Η ενεργοποίηση έγινε σύμφωνα με την διαδικασία που περιγράφεται στη αναφορά [180]. Η διαδικασία έχει ως εξής: 20 nM Fe-COOH προστίθενται σε μείγμα 1 mM EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide) και 5 mM NHS (N-Hydroxysuccinimide) για 15 λεπτά. Αυτό που έχει σημασία σε αυτή τη διαδικασία είναι η ενεργοποίηση να γίνεται λίγο πριν την ενβύθιση, που έχει ως σκοπό να ακινητοποιήσει το στρώμα της neutravidin.



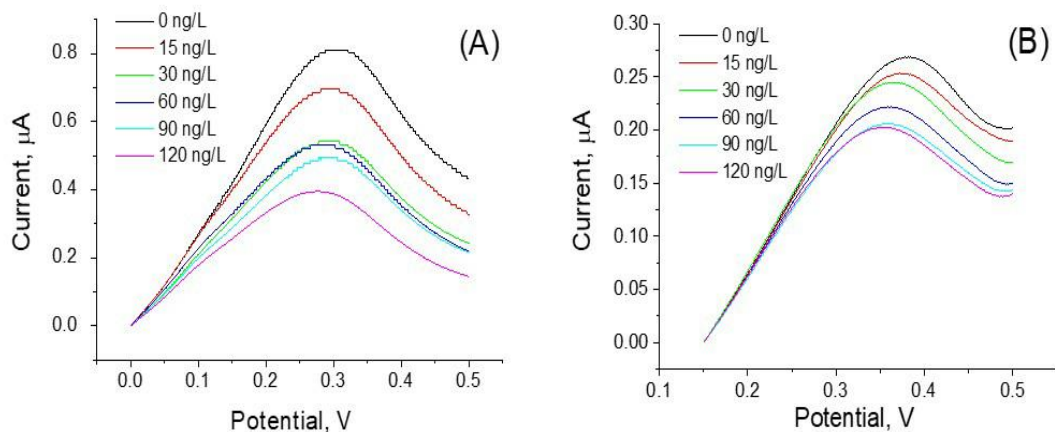
Σχήμα 7.1: Τυπική απεικόνιση του απτοαισθητήρα που χρησιμοποιήθηκε

Η προσθήκη του ενεργοποιημένου Fe-COOH έχει ως αποτέλεσμα την ομοιοπολική σύνδεση της ανθρακικής ομάδας με το μόριο του neutravidin. Στη συνέχεια το ηλεκτρόδιο εκπλύνεται με απιονισμένο νερό και PBS και βυθίζεται μέσα σε διάλυμα 1 μM απταμερών (APT2 a ή b) για 30 λεπτά. Μετέπειτα το ηλεκτρόδιο εκπλύνεται με PBS και ουσιαστικά ο αισθητήρας προετοιμάζεται για ανίχνευση της AFM1. Η ανίχνευση βασίστηκε στη μέτρηση του οξειδοαναγωγικού ρεύματος της ομάδας του σιδήρου. Σε αυτή τη περίπτωση αναμένουμε ότι η παρουσία του AFM1 θα επιφέρει αλλαγές στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα όπου θα επηρεάσει την οξειδοαναγωγική κατάσταση της επιφάνειας. Αυτή η προσέγγιση χρησιμοποιείται για πρώτη φορά σε αυτή την εργασία, παρόλο που υπάρχει μια παρόμοια προσέγγιση στο παρελθόν [15]. Σε εκείνη την περίπτωση της στη θέση της Neutravidin χρησιμοποιήθηκε ένα ηλεκτροπολυμερισμένο στρώμα που διαμορφώθηκε από Neutral red.

7.5. Λειτουργικός έλεγχος του απτοαισθητήρα σε πρότυπα δείγματα

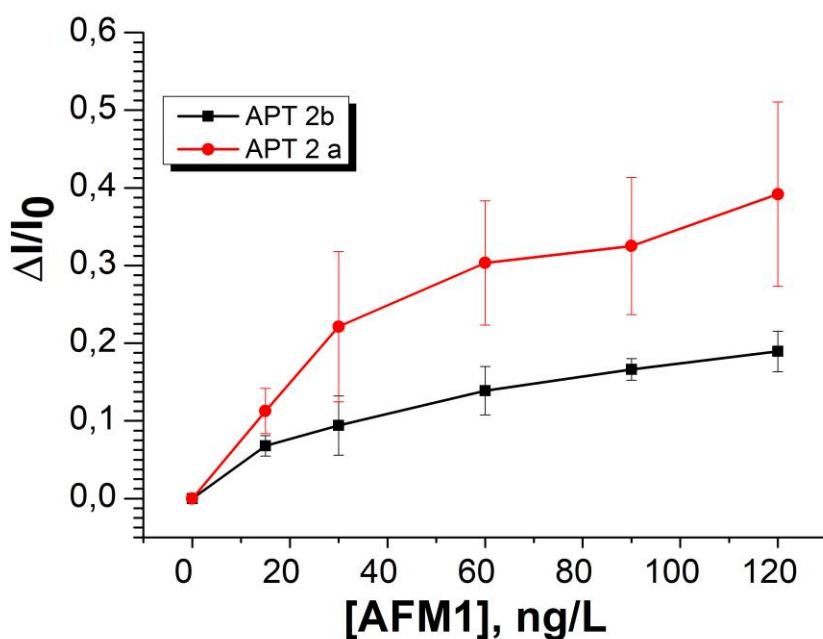
Η DPV για τον απτοαισθητήρα που βασίζεται στο APT2a παρουσιάζεται στο σχήμα 7.2 A και εκείνη του APT2b στο σχήμα 7.2 B. Βάσει αυτών των διαγραμμάτων φαίνεται ότι το εύρος του ρεύματος μειώνεται και της δυο περιπτώσεις με την αύξηση της συγκεντρώσεως της AFM1. Λαμβάνοντας υπόψιν την πιθανή αστάθεια της ομάδας του σιδήρου (Fe) σε μακροχρόνια πειράματα έγινε και DPV χωρίς την παρουσία της AFM1, που χρησιμοποιήθηκε ως αναφορά.

Έπειτα από 5 ώρες μετρήσεων παρατηρήθηκε μόνο ελαφρά αύξηση του ρεύματος των κορυφών, το οποίο δεν ξεπερνάει το 26 %. Χρησιμοποιώντας CV μετά από 30 κύκλους για τον απτοαισθητήρα που συντίθεται με το APT2 πάνω σε στρώμα neutravidin τροποποιημένο με Fe τόσο για PBS όσο και για HEPES, παρατηρήθηκαν και στις δυο περιπτώσεις αμελητέες αλλαγές στο CV.



Σχήμα 7.2: Διαγράμματα ελέγχου του απτοαισθητήρα με διαφορική παλμική βολταμετρία στα απταμερή A) APT2a (PBS), B) APT2b (HEPES) που ακινητοποιούνται σε στρώμα neutravidin τροποποιημένο με Fe-COOH.

Προκειμένου να συγκριθεί η ευαισθησία του απτοαισθητήρα που βασίζεται στα δύο απταμερή (APT 2a και APT 2b) κατασκευάστηκε η καμπύλη βαθμονόμησης με της σχετικές μεταβολές [$\Delta I/I_0 = (I - I_0)/I_0$], όπου το I είναι η κορυφή του ρεύματος σε συγκεκριμένη συγκέντρωση του AFM1 και I_0 εκείνη χωρίς AFM1] έναντι της συγκεντρώσεως της AFM1 (Σχήμα 7.3). Ομοίως με τον προηγούμενο απτοαισθητήρα προσδιορίστηκε το όριο ανίχνευσης LOD και για της δύο απτοαισθητήρες: 8,5 ng/l για τον APT 2a και 8,6 ng/l για τον APT 2b, αντίστοιχα. Έτσι δεν υπάρχει σημαντική διαφορά στο όριο ανίχνευσης των δύο απτοαισθητήρων.



Σχήμα 7.3: Καμπύλες βαθμονόμησης που προέκυψαν από τα διαγράμματα ελέγχου με τις σχετικές αλλαγές των κορυφών ρεύματος ($\Delta I/I_0$) έναντι της συγκεντρώσεως της AFM1 στα δύο απταμερή.

7.6.Συζήτηση αποτελεσμάτων

Ο συγκεκριμένος απτοαισθητήρας είναι **με δείκτες**, επειδή χρειάζεται ως δείκτης το Fe προκειμένου να προσδιοριστεί ο αναλύτης. Η ενεργοποίηση του Fe-COOH έγινε λίγο πριν την ενβύθιση του στον απτοαισθητήρα προκειμένου να επιτραπεί η ανίχνευση των αλλαγών που συντελούνται στην επιφάνεια του απτοαισθητήρα. Η οξειδοαναγωγή προκαλείται λοιπόν από το σίδηρο που περιέχεται στο Fe-COOH.

Σε αυτή την περίπτωση έγινε χρήση της διαφορικής παλμικής βολταμετρίας (DPV) προκειμένου να διακριθούν οι αλλαγές στο οξειδοαναγωγικό ρεύμα. Αυτό που αναμενόταν με βάση προηγούμενη εργασία [181] ήταν μια βαθμιαία αύξηση στην κορυφή του ρεύματος, διότι η πρόσδεση της AFM1 προκαλεί αλλαγές στη διαμόρφωση του απταμερούς, που μπορούν να επηρεάσουν το οξειδοαναγωγικό ρεύμα. Η διαφορά είναι ότι το σίδηρο σε εκείνη την εργασία ήταν ακινητοποιημένο σε επιφάνεια δένδριμερών που ακουμπούσε σε πολλαπλούς νανοσωλήνες άνθρακα. Το σύστημα εδώ της δεν είναι τόσο πολύπλοκο. Ο εξειδικευμένος υποδοχέας σιδήρου (Fe) δίνει την δυνατότητα σύγκρισης της ευαισθησίας του απτοαισθητήρα σε δύο διαφορετικά απταμερή (APT2a και b).

Απτοαισθητήρας με ακινητοποίηση απταμερούς σε στρώμα Neutravidin/Fe-COOH για την ανίχνευση της AFM1 έχει δοκιμαστεί πρώτη φορά. Ο συγκεκριμένος απτοαισθητήρας βέβαια είχε δοκιμαστεί στο παρελθόν για την Ωχρατοξίνη [182] με απταμερή τροποποιημένα ως προς την συγκεκριμένη μυκοτοξίνη. Το σημαντικό πλεονέκτημα αυτού του απτοαισθητήρα είναι ο μικρός χρόνος κατασκευής (περίπου 3 ώρες). Στην εργασία με την Ωχρατοξίνη [182] είχε δοκιμαστεί ένα πλήθος απταμερών που ήταν τροποποιημένοι υποδοχείς για την Ωχρατοξίνη και τα αποτελέσματα ήταν σχετικά κοντά ως προς τα κύρια χαρακτηριστικά (όριο ανίχνευσης, εκλεκτικότητα κ.τ.λ) με τη Neutravidin, που αποδεικνύεται ότι επιδρά ελάχιστα στη σχέση μεταξύ απταμερούς και τοξίνης.

Επίσης πρέπει να τονιστεί ότι έγιναν προκαταρκτικά πειράματα τόσο σε AFB1 όσο και σε Ωχρατοξίνη με τον συγκεκριμένο απτοαισθητήρα και τα αποτελέσματα ήταν αρνητικά ως προς την ανίχνευση τους. Αυτό αποδεικνύει ότι ο απτοαισθητήρας αυτός έχει καλή **εκλεκτικότητα**, αφού δεν μπορεί να ανιχνεύσει άλλες μυκοτοξίνες.

Ο απτοαισθητήρας αυτός επίσης έχει **αναγεννησιμότητα** (τουλάχιστον 3 φορές), χωρίς να υπάρξει σημαντική απώλεια της δραστηρότητάς του, όπως δείχνει και παλαιότερη μελέτη [176]. Αυτό συμβαίνει διότι η αλληλεπίδραση του αναλύτη με το απταμερές βασίζεται σε ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις ή αλληλεπιδράσεις Van der Waals και έτσι η αναγέννηση του απτοαισθητήρα είναι δυνατή με εμβάπτιση του αισθητήρα σε διάλυμα υψηλής ιοντικής ισχύος, για παράδειγμα 2M NaCl ή δωδεκυλοθειικό νάτριο (SDS) (αναφορά 12) ή 0,2 M διαλύματος γλυκίνης.

Τα όρια ανίχνευση που ευρέθηκαν (8,5 ng/l για τον APT 2a και 8,6 ng/l για τον APT 2b) είναι μέσα στα όρια που έχει ορίσει τόσο η ΕΕ (LOD=47,2 ng/l) όσο και οι ΗΠΑ (LOD=472,0 ng/l).

7.7.Συμπεράσματα

Σε αυτή την εργασία κατασκευάστηκε της απτοαισθητήρα που είχε χρησιμοποιηθεί ξανά στο παρελθόν για ανίχνευση της Ωχρατοξίνης [182] με άλλα απταμερή ως υποδοχείς. Για πρώτη φορά της δοκιμάζεται για την ανίχνευση της AFM1 δίνοντας πολύ καλά αποτελέσματα. Το μειονέκτημα της προσέγγισης της είναι ότι δεν έγιναν δοκιμές σε πραγματικά δείγματα για να γίνει σύγκριση μεταξύ των πραγματικών και πρότυπων δειγμάτων αλλά έχει μια πληθώρα πλεονεκτημάτων που είναι τα εξής:

- Η καλή αναγεννησιμότητα (3 φορές χωρίς να χάσει την δραστηκότητά του)
- Η καλή εκλεκτικότητα (μπορεί να δράσει μόνο για την AFM1)
- Ανεκτό και χαμηλό όριο ανίχνευσης
- Ο μικρός χρόνος κατασκευής (3 ώρες)
- Ουδέτερο στρώμα όπου δεν αλληλοεπιδρά στην σχέση του υποδοχέα με την τοξίνη
- Το χαμηλό σχετικά κόστος της Neutravidin

Κεφ 8: Ανάπτυξη πρότυπου απτοαισθητήρα χρυσού με απευθείας ακινητοποίηση του με μερκαπτοεξανόλη για τον προσδιορισμό της Αφλατοξίνης M1 στο γάλα

8.1. Εισαγωγή

Η παρούσα εργασία περιγράφει έναν απτοαισθητήρα με μήτρα (matrix) χρυσού με απευθείας ακινητοποίηση βιοσυμβατού υποδοχέα (απαμερές) με την βοήθεια της μερκαπτοεξανόλης για τον προσδιορισμό της Αφλατοξίνης (AFM1) με Διαφορική Παλμική Βολταμετρία (DPV). Ο απτοαισθητήρας της ελέγχθηκε σε πρότυπα δείγματα με ρυθμιστικό διάλυμα.

Τα πειράματα αυτά έγιναν στο πανεπιστήμιο Comenius της Μπρατισλάβα τα έτη 2016-18 στο εργαστήριο του καθηγητή Tibor Hianik.



Εικόνα 8.1: Ο χώρος που έγιναν τα πειράματα των τριών κεφαλαίων και η εξωτερική όψη του πανεπιστημίου της Μπρατισλάβα (πάνω δεξιά)

8.2. Οργανολογία

Σε αυτή την εργασία χρησιμοποιήθηκε ο ποτενσιοστάτης CHI 440 (CH Instruments, USA) (εικόνα 7.1).

Η διαδικασία της ανίχνευσης εδώ βασίζεται στη μέτρηση του σήματος οξειδοαναγωγής της MB, διότι η είσοδος της Αφλατοξίνης σπάει την αλυσίδα του απταμερούς που περιέχει στο ένα άκρο του κυανό του μεθυλίου (MB) δημιουργώντας ένα σημείο σύνδεσης με τον αναλύτη. Η ανίχνευση έγινε σε ηλεκτρόδια εργασίας χρυσού (Au), αναφοράς Ag/AgCl και μετρήσεως πλατίνας (Pt) σε μεγαλύτερο δυναμικό εύρος 0,1-10 nM (31,45-3145 ng/l). Ο ποτενσιοστάτης ρυθμίστηκε έτσι ώστε η βαθμονόμηση να γίνει με βάση της σχετικές μεταβολές της κορυφής του ρεύματος I στο βολταμογράφημα του εκάστου απταμερούς που χρησιμοποιήθηκε.

Οι ηλεκτρικοί παράμετροι των απτοαισθητήρων προσδιορίστηκαν με χρήση 4 mL Teflon κυψελίδα με διαμόρφωση τριών ηλεκτροδίων. Το ηλεκτρόδιο εργασίας περιείχε χρυσή επιφάνεια διαμέτρου 2 mm, το ηλεκτρόδιο αναφοράς ήταν το Ag/AgCl και το βοηθητικό ηλεκτρόδιο είναι ένα συρματάκι από πλατίνα (Pt). Όλα τα ηλεκτρόδια προέρχονται από την CH Instruments. Το δυναμικό εύρος (potential range) που χρησιμοποιήθηκε ήταν (-0,2- 0,7 V) με χρόνο προετοιμασίας (quiet time) 2s.

Τα πειράματα αυτά έγιναν σε υγρό εργασίας όπου περιείχε διάλυμα (0.1M Tris (pH 7.4) με 140 mM NaCl, 20 mM MgCl, και 20 mM KCl). Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με το πρόγραμμα originlab.

8.3. Χημικά αντιδραστήρια

Σε αυτή τη μέθοδο ακινητοποίησης για την κατασκευή του απτοαισθητήρα χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα Μερκαπτοεξανόλης (MCH), TCEP (Tris(2-CarboxyEthyl) Phosphine hydrochloride) και ένα DNA απταμερές που τροποποιήθηκε στο 5' άκρο με θειική ομάδα και κυανό του μεθυλενίου στο 3' άκρο και έχει την μορφή: 5'-ATG TGA CTG CTA GAG ATT TTC CAC AT-3' (APT3).

Το APT3 αγοράστηκε από την Biosearch Inc. (Petaluma, CA- USA) και περιείχε συμπληρωματική αλυσίδα 5 νουκλεοτιδίων και στα δύο άκρα που του επιτρέπαν το σχηματισμό μοριακής αλυσίδας. Παρουσία της AFM1 η αλυσίδα αυτή σπάει και το απταμερές ξεδιπλώνεται σε τρισδιάστατη δομή που έχει θέση υποδοχής για την AFM1 (Σχήμα 8.1). Για να μπορέσουμε να ετοιμάσουμε το APT3 χρησιμοποιήσαμε ένα ρυθμιστικό διάλυμα (10mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH=8) που βασίζεται σε νερό ελεύθερο από νουκλεοτίδια (Dnase free water) (Sigma-Aldrich).

Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε Αφλατοξίνη M1 (AFM1) (M.w. 328.27 Da), προϊόν της μυκοτοξίνης *Aspergillus flavus* ενώ για της διαλυτοποιήσεις των διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα PBS (137 mM NaCl, 27 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH=7.4).

8.4. Κατασκευή του απτοαισθητήρα

Το απταμερές αυτό επιτρέπει την απευθείας ακινητοποίηση με χημειοαπορρόφηση σε χρυσή επιφάνεια. Για αυτό το σκοπό χρησιμοποιήθηκε ένα απταμερές με τροποποιημένο 5' άκρο από ομάδα θειόλης και 3' άκρο από κυανό του μεθυλίου (MB) (APT 3). Το απταμερές ενώνεται στα δύο του άκρα μεταξύ 5 νουκλεοτιδίων (Σχήμα 8.1) και όταν έρχεται σε επαφή με την AFM1 η αλυσίδα αυτή σπάει για να μπορέσει να δημιουργηθεί σημείο σύνδεσης με τον αναλύτη. Η διαδικασία της ανίχνευσης βασίζεται στη μέτρηση του σήματος οξειδοαναγωγής του κυανού του μεθυλίου (MB).

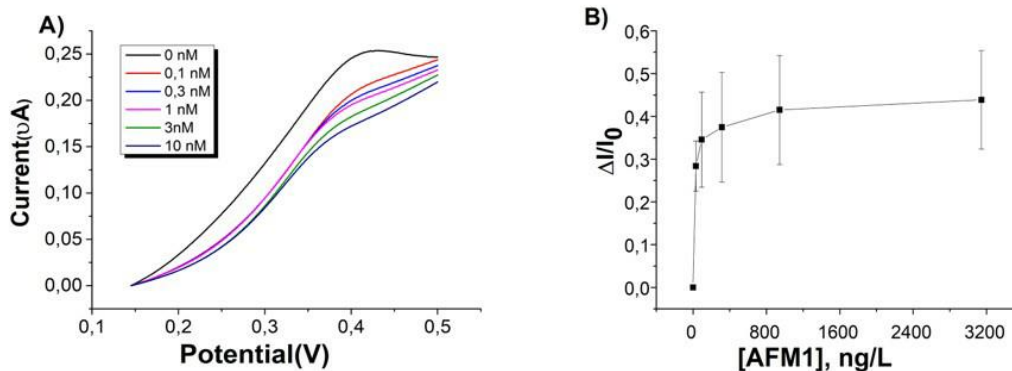


Σχήμα 8.1: Τυπική απεικόνιση του απτοαισθητήρα πριν την είσοδο και μετά την είσοδο της AFM1

Χωρίς τον αναλύτη, το MB πάει κοντά στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου οπότε αναμένεται το μεγαλύτερο σήμα οξειδοαναγωγής, οπότε όσο προστίθεται αναλύτης τόσο το MB μετακινείται πιο μακριά από την επιφάνεια του αισθητήρα και άρα το πλάτος της κορυφής μειώνεται. Αυτή η προσέγγιση έχει χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν με ανάπτυξη του απτοαισθητήρα με διάφορους αναλύτες (δείτε αναφορές [185-186] για λεπτομέρειες). Ο Απτοαισθητήρας αυτός προετοιμάστηκε με καταβύθιση καθαρού ηλεκτροδίου σε μείγμα απταμερούς (1 μ M) και μερκαπτοεξανόλης (MCH)(7 μ M) με 10 μ M TCEP (Tris(2-CarboxyEthyl) Phosphine hydrochloride) για 16 ώρες.

8.5. Λειτουργικός έλεγχος του απτοαισθητήρα σε πρότυπα δείγματα

Το DPV για τον απτοαισθητήρα αυτό παρουσιάζεται στο σχήμα 8.2 A για δυναμικό εύρος 0,1-10 nM. Αυτό που επιβεβαιώνεται στην πράξη είναι ότι όσο αυξάνεται η προσθήκη της AFM1 τόσο η κορυφή μειώνεται. Από τις αλλαγές στις κορυφές του σχήματος 8.2A και με αναφορά το σήμα άνευ τοξίνης (0 nM) ετοιμάσαμε την κατάλληλη καμπύλη βαθμονόμησης σχήμα 8.2 B (ng/l η συγκέντρωση της AFM1 για λόγους σύγκρισης). Στην καμπύλη βαθμονόμησης μπορούμε να δούμε της τραχείς αλλαγές της κορυφές του ρεύματος σε σχετικά μικρές συγκεντρώσεις της AFM1 αλλά και τον κορεσμό που εμφανίστηκε σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από 1 nM (314,5 ng/l). Το όριο ανίχνευσης (LOD) για αυτόν τον απτοαισθητήρα εκτιμήθηκε ως 37,7 ng/l.



Σχήμα 8.2: A) Διάγραμμα ελέγχου του απτοαισθητήρα με διαφορική παλμική βολταμετρία στα απταμερή για τον απτοαισθητήρα (APT3) σε διάφορες συγκεντρώσεις της AFM1. B) Καμπύλη βαθμονόμησης με τις σχετικές αλλαγές στη κορυφή του ρεύματος $\Delta I/I_0$ έναντι της συγκεντρώσεως της AFM1 που προέκυψε από το διάγραμμα A.

8.6.Συζήτηση αποτελεσμάτων

Σε αυτή την εργασία χρησιμοποιήθηκε μια άλλη τεχνική που έχει να κάνει με την χημική απορρόφηση της αφλατοξίνης από το απταμερές. Έγινε προπαρασκευαστική μελέτη της αναλογίας μεταξύ (απταμερούς και μερκαπτοεξανόλης), παρόλα αυτά βρέθηκαν μεγάλες τυπικές αποκλίσεις στην καμπύλη βαθμονόμησης, άρα χρειάζεται περαιτέρω μελέτη ως της την εύρεση της σωστής αναλογίας.

Επίσης πρέπει να τονιστεί ότι έγιναν προκαταρκτικά πειράματα τόσο σε AFB1 όσο και σε Ωχρατοξίνη με τον συγκεκριμένο απτοαισθητήρα και τα αποτελέσματα ήταν αρνητικά ως προς την ανίχνευση τους. Αυτό αποδεικνύει ότι ο απτοαισθητήρας αυτός έχει καλή **εκλεκτικότητα**, αφού δεν μπορεί να ανιχνεύσει άλλες μυκοτοξίνες.

Ο απτοαισθητήρας αυτός επίσης έχει **αναγεννησιμότητα** (τουλάχιστον 3 φορές), χωρίς να υπάρξει σημαντική απώλεια της δραστηρότητάς του, όπως δείχνει και παλαιότερη μελέτη [176]. Αυτό συμβαίνει διότι η αλληλεπίδραση του αναλύτη με το απταμερές βασίζεται σε ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις ή αλληλεπιδράσεις Van der Waals και έτσι η αναγέννηση του απτοαισθητήρα είναι δυνατή με εμβάπτιση του αισθητήρα σε διάλυμα υψηλής ιοντικής ισχύος, για παράδειγμα 2M NaCl ή δωδεκυλοθειικό νάτριο (SDS) (αναφορά 12) ή 0,2 M διαλύματος γλυκίνης.

Το όριο ανίχνευσης που ευρέθη (37,7 ng/l) είναι μέσα στα όρια που έχει ορίσει τόσο η ΕΕ (LOD=47 ng/l) όσο και οι ΗΠΑ (LOD=472ng/l).

8.6.Συμπεράσματα

Σε αυτή την εργασία κατασκευάστηκε της απτοαισθητήρας που είχε χρησιμοποιηθεί ξανά στο παρελθόν για ανίχνευση της Θρομβίνης [183] και της ιντερφερόνης [184]. Για πρώτη φορά δοκιμάζεται για την ανίχνευση της AFM1 και

γενικότερα για της μυκοτοξίνες δίνοντας αποτελέσματα με μειονέκτημα που έχει να κάνει με της αναλογίες μεταξύ της μερκαπτοεξανόλης και του απταμερούς. Τα πλεονεκτήματα της είναι τα εξής:

- Η καλή αναγεννησιμότητα (3 φορές χωρίς να χάσει την δραστικότητα του)
- Η καλή εκλεκτικότητα (μπορεί να δράσει μόνο για την AFM1)
- Το μεγάλο δυναμικό εύρος
- Ο απλός τρόπος κατασκευής

Κεφ 9: Συμπεράσματα-Προοπτικές

9.1. Συμπεράσματα

Για πρώτη φορά αναπτύχθηκε ένας βιοαισθητήρας, με ιδιαίτερα κατασκευαστικά χαρακτηριστικά χρησιμοποιώντας μήτρα (matrix) γραφενίου/Χαλκού και ακινητοποιημένη λιπιδική μεμβράνη, όπου είχε εγκολληθεί ο υποδοχέας (receptor) GM1. Ο βιοαισθητήρας αυτός εφαρμόστηκε για τον προσδιορισμό συγκεκριμένων ποσοτήτων της τοξίνης της Χολέρας (CT) σε πρότυπα δείγματα με ρυθμιστικό διάλυμα και σε πραγματικά εμβολιασμένα με τοξίνη υδατικά δείγματα νερού, που διαχύθηκαν στον βιοαισθητήρα με τη μέθοδο της σταθερής ροής (flow injection). Πρέπει να σημειωθεί ότι αυτή η τεχνική κατασκευής με την συνδυασμένη μέθοδο ανίχνευσης της ποτενσιομετρίας δοκιμάστηκε πρώτη φορά για τον προσδιορισμό αυτής της τοξίνης. Τα ληφθέντα αποτελέσματα συγκρινόμενα με παλαιότερες αναφορές [18-27] μαζί με το χαμηλό κόστος κατασκευής, δίνουν την δυνατότητα εξέλιξης του βιοαισθητήρα σε μια φορητή συσκευή για ταχεία ανίχνευση της ποιότητας νερών. Οι μελετηθείσες παράμετροι του βιοαισθητήρα όπως ο χρόνος απόκρισης και το όριο ανίχνευσης (LOD), δείχνουν την συγκριτικά καλή αξιοπιστία του βιοαισθητήρα όπως φαίνεται στον πίνακα 9.1.

Πίνακας 9.1: Σύγκριση κατασκευαστικών και λειτουργικών στοιχείων του αναπτυχθέντος βιοαισθητήρα για την ανίχνευση της τοξίνης της χολέρας με πρόσφατες αντιπροσωπευτικές αναφορές

Τεχνική κατασκευής	Μέθ. Ανίχ.	Χρόνος Απόκρι	LOD	Αναφ.
+	+	+	-	[18]
+	+	+	-	[19]
+	+	+	-	[23]
+	+	+	+	[26]
+	+	+	+	[27]

(+) θετικό, (-) αρνητικό, στοιχείο που παρέχει ο αναπτυχθείς βιοαισθητήρας σε σχέση με το αντίστοιχο στοιχείο της αναφοράς που γίνεται η σύγκριση.

Έτσι σε σύγκριση με τις πρόσφατες αντιπροσωπευτικές αναφορές η **τεχνική κατασκευής** είναι η πιο απλή που έχει χρησιμοποιηθεί μέχρι στιγμής. Η συνδυασμένη **μέθοδος ανίχνευσης** (ποτενσιομετρία) είναι πιο απλή από την FRET[18], SPR [23], UV[26] και QCM [27] αλλά και από την EIS [19]. Ως προς τις μελετηθείσες παραμέτρους έχει τον καλύτερο **χρόνο απόκρισης** (5 min) σε σχέση με τις πρόσφατες αναφορές [18,19,23,26-27] ενώ έχει σχετικά **χαμηλό όριο ανίχνευσης** (LOD=1 nM), που είναι χαμηλότερο από τις αναφορές [26-27] αλλά υψηλότερο από τις αναφορές [18-19,23] που το όριο φτάνει στην περιοχή των μM . Ο αναπτυχθείς βιοαισθητήρας επιπλέον μπορεί εύκολα και αξιόπιστα να **αναγεννηθεί** (10 φορές) χωρίς να μειωθεί η δραστηριότητά του. Έτσι συνδυάζει μια μοναδική τεχνική κατασκευής, μια απλή συνδυασμένη μέθοδο ανίχνευσης, μια ταχεία απόκριση και ένα ικανοποιητικό όριο ανίχνευσης. Τα ανωτέρω σε συνδυασμό με το γεγονός πως έχει μια αποδεκτή ποσοστιαία διαφορά σήματος μεταξύ πραγματικών και πρότυπων δειγμάτων,

ανάκτηση (recovery) (92-106%), με βάση τις κατευθυντήριες γραμμές του ICH2005, ανάκτηση (80-115%), τον πιστοποιούν ως ένα κατάλληλο βιοαισθητήρα για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις μετά την αναγέννησή του σε υδατικά διαλύματα.

Στη συνέχεια αναπτύχθηκαν 3 απτοαισθητήρες ανίχνευσης της Αφλατοξίνης M1 (AFM1) σε πραγματικά δείγματα γάλακτος και σε πρότυπα δείγματα με ρυθμιστικό διάλυμα. Οι απτοαισθητήρες αυτοί παρουσιάζουν σημαντικά πλεονεκτήματα σε σχέση με τους αντίστοιχους ανοσοαισθητήρες [1-9] και απτοαισθητήρες [10-15] αλλά και με τον DNA αισθητήρα [156], που είχε αναπτυχθεί στο παρελθόν. Οι αναπτυχθέντες απτοαισθητήρες χρησιμοποιούν ηλεκτρόδιο χρυσού ως μήτρα με διαφορετικές επικαλύψεις.

Στον **πρώτο απτοαισθητήρα** η μήτρα επικαλύφθηκε με ένα **ακίνητοποιημένο δενδριμερές και στη συνέχεια ακίνητοποιήθηκε το απταμερές (receptor)** της AFM1 (κεφ. 6). Ο απτοαισθητήρας αυτός δοκιμάστηκε τόσο σε πρότυπα δείγματα με ρυθμιστικό διάλυμα όσο και σε πραγματικά δείγματα γάλακτος. Οι επικαλύψεις έγιναν με τη τεχνική του στρώματος επί στρώμα (layer by layer), ενώ η ανίχνευση της AFM1 έγινε χωρίς δείκτες (Label-free), δηλαδή με ανίχνευση φυσικών παραμέτρων και όχι χρήση μοριακού σήματος. Η φυσική παράμετρος που εξετάστηκε, στο κατασκευαστικό στάδιο, ήταν οι σχετικές μεταβολές της αντίστασης μεταφοράς φορτίου R_{ct} στο κύκλωμα Randles με την μέθοδο της διηλεκτρικής φασματοσκοπίας (EIS). Η σύγκριση της **τεχνικής κατασκευής** και της **μεθόδου ανίχνευσης** με πρόσφατες αντιπροσωπευτικές αναφορές [1-15,156] μαζί με το σχετικά **χαμηλό κόστος κατασκευής** δίνει την δυνατότητα εξέλιξης του απτοαισθητήρα σε μια φορητή συσκευή για την ταχεία ανίχνευση της ποιότητας του γάλακτος. Οι μελετηθείσες παράμετροι όπως το δυναμικό εύρος, το όριο ανίχνευσης (LOD) και η αναγεννησιμότητα δείχνουν την συγκριτικά καλή συμπεριφορά του απτοαισθητήρα.

Πίνακας 9.2: Σύγκριση κατασκευαστικών και λειτουργικών στοιχείων του πρώτου αναπτυχθέντος απτοαισθητήρα για την ανίχνευση της AFM1 με πρόσφατες αντιπροσωπευτικές αναφορές

(α) Σύγκριση με αναφορές Ανοσοαισθητήρων [1-9] και αναφορές DNA αισθητήρων [153]

Τεχνική Κατασκευής	Χρόνος Κατασκευής	Μεθ. Ανίχνευσης	Δ. Εύρος	LOD	Αναγένν.	Αναφ
+	-	+	O	+	+	[1]
+	-	+	-	+	+	[2]
+	-	+	O	O	+	[3]
+	-	+	-	-	+	[4]
O	-	-	-	+	+	[5]
+	-	+	-	-	+	[6]
+	-	+	*	+	+	[7]
+	-	O	*	+	+	[8]
+	-	+	*	+	+	[9]

-	-	-	-	+	-	[153]
---	---	---	---	---	---	-------

(β) Σύγκριση με αναφορές απτοαισθητήρων

Τεχνική Κατασκευής	Χρόνος Κατασκευής	Μεθ. Ανίχνευσης	Δ. Εύρος	LOD	Αναγέννηση	Αναφ
Ο	-	Ο	+	-	Ο	[10]
-	-	Ο	Ο	-	Ο	[11]
-	-	Ο	-	-	Ο	[12]
+	-	Ο	-	-	Ο	[13]
+	-	+	-	+	Ο	[14]
+	-	Ο	Ο	-	Ο	[15]

(+) θετικό, (-) αρνητικό, (0) παρόμοιο στοιχείο που παρέχει ο αναπτυχθείς βιοαισθητήρας σε σχέση με το αντίστοιχο στοιχείο της αναφοράς που γίνεται η σύγκριση.

Με βάση τα ανωτέρω η **τεχνική κατασκευής** είναι σχετικά απλή αλλά η πιο χρονοβόρα που έχει χρησιμοποιηθεί μέχρι στιγμής. Η **μέθοδο ανίχνευσης που χρησιμοποιήθηκε (EIS)** είναι πιο απλή από την ELISA [1-4,6-7], την MRR [9] και TIRE με LSRP [14]. Σχετικές δημοσιεύσεις εφαρμογών απτοαισθητήρων [10-13,15] χρησιμοποιούν τεχνικές (DPV,SWV,CV) που είναι παρόμοιας ευκολίας. Υπάρχουν όμως και αναφορές [5, 156] που οι αναλυτικές μέθοδοι (χρονοαμπερομετρία, ποτενσιομετρία) είναι περισσότερο εύχρηστες και απλές. Ο απτοαισθητήρας που αναπτύχθηκε έχει το χαμηλότερο **όριο ανίχνευσης** (LOD=8.5 ng/L), από τους περισσότερους αναφερόμενους ανοσοαισθητήρες [1-2,5,7-9], παρόμοιο όριο με αυτόν της αναφοράς [3] και υψηλότερο μόνο από τον ανοσοαισθητήρα της αναφοράς [6]. Αυτό είναι ένα από τα χαρακτηριστικά πλεονεκτήματα που αντιστοιχούν στην μεγαλύτερη ευαισθησία των απταμερών (receptors) έναντι των αντισωμάτων (receptors). Επιπρόσθετα ο απτοαισθητήρας αυτός έχει χαμηλότερο όριο ανίχνευσης από τον DNA αισθητήρα της αναφοράς [156], δεν έχει όμως καλύτερα όρια ανίχνευσης από τους υπόλοιπους απτοαισθητήρες [10-13, 15] με μόνη εξαίρεση αυτόν της αναφοράς [14]. Αυτό είναι ένα μειονέκτημα ως προς την ανίχνευση, παρόλα αυτά το όριο ανίχνευσης είναι ικανοποιητικό, αφού καλύπτει τόσο τα όρια που έχει θέσει η ΕΕ (47,2 ng/l) όσο και οι ΗΠΑ (472,0 ng/l), διότι για παράδειγμα ο απτοαισθητήρας της αναφοράς [9] έχει πολύ μεγάλο όριο ανίχνευσης (LOD=1641 ng/l) και δεν καλύπτει τα όρια αυτά. Το **δυναμικό εύρος (15-120 ng/l)** που παρουσιάζει ο απτοαισθητήρας είναι καλύτερο από αυτό της αναφοράς [10] και παρόμοιο με τους ανοσοαισθητήρες των αναφορών [1,3] και τους απτοαισθητήρες των αναφορών [11-15]. Το δυναμικό εύρος δεν το αναφέρουν όλοι οι συγγραφείς των δημοσιεύσεων παρόλα αυτά αποτελεί μια σημαντική παράμετρο αξιολόγησης του αισθητήρα. Σημειώνεται ότι ο απτοαισθητήρας της αναφοράς [12] παρουσιάζει ένα εκπληκτικό δυναμικό εύρος (1-10⁵ ng/l). Ο απτοαισθητήρας της εργασίας αυτής μπορεί επίσης εύκολα και αξιόπιστα να **αναγεννηθεί** (3 φορές) χωρίς να μειωθεί η δραστηριότητά του. Τελικά ο αναπτυχθείς βιοαισθητήρας συνδυάζει μια σχετικά **απλή τεχνική κατασκευής**, μια καλή συνδυασμένη μέθοδο ανίχνευσης και ένα

ικανοποιητικό όριο ανίχνευσης σε ένα καλό δυναμικό εύρος μαζί με μια αποδεκτή ποσοστιαία διαφορά σήματος μεταξύ πραγματικών δειγμάτων γάλακτος και πρότυπων δειγμάτων, ανάκτηση (recovery) (78,04-106,25%), που τον πιστοποιούν ως ένα κατάλληλο απτοαισθητήρα για την ανίχνευση της AFM1 στο γάλα.

Στον **δεύτερο απτοαισθητήρα** η μήτρα επικαλύφθηκε με ένα **ακίνητοποιημένο στρώμα Neutravidin/Fe-COOH και στη συνέχεια ακίνητοποιήθηκε το απταμερές (receptor)** (κεφ. 7) της AFM1 και δοκιμάστηκε σε πρότυπα δείγματα. Οι επικαλύψεις έγιναν με τη τεχνική του στρώματος επί στρώμα (layer by layer), ενώ η ανίχνευση της AFM1 έγινε με δείκτη το Fe του ακίνητοποιημένου στρώματος της Neutravidin. Η παράμετρος που εξετάστηκε ήταν η κορυφή του ρεύματος I με την μέθοδο της διαφορικής παλμικής βολταμετρίας (DPV). Η σύγκριση της τεχνικής, του χρόνου κατασκευής και της μεθόδου ανίχνευσης αυτού του απτοαισθητήρα, με πρόσφατες αντιπροσωπευτικές αναφορές [1-15, 156] σε συνδυασμό με το πολύ χαμηλό κόστος κατασκευής του, δίνουν την δυνατότητα εξέλιξης του απτοαισθητήρα σε μια φορητή συσκευή για την ταχεία ανίχνευση της ποιότητας του γάλακτος. Οι μελετηθείσες παράμετροι όπως το δυναμικό εύρος, το όριο ανίχνευσης (LOD) και η αναγεννησιμότητα δείχνουν την συγκριτικά καλή συμπεριφορά του απτοαισθητήρα.

Πίνακας 9.3: Σύγκριση κατασκευαστικών και λειτουργικών στοιχείων του δεύτερου αναπτυχθέντος απτοαισθητήρα για την ανίχνευση της AFM1 με πρόσφατες αντιπροσωπευτικές αναφορές.

(α) Σύγκριση με αναφορές Ανοσοαισθητήρων [1-9] και DNA αισθητήρες[156]

Τεχνική Κατασκευής	Χρόνος Κατασκευής	Μεθ. Ανίχνευσης	Δ. Εύρος	LOD	Αναγέννηση	Αναφ
+	-	+	O	+	+	[1]
+	-	+	-	+	+	[2]
+	-	+	O	O	+	[3]
+	-	+	-	-	+	[4]
+	-	-	-	+	+	[5]
+	-	+	-	-	+	[6]
+	-	+	*	+	+	[7]
+	-	O	*	+	+	[8]
+	-	+	*	+	+	[9]
+	+	-	-	+	-	[153]

(β) Σύγκριση με αναφορές απτοαισθητήρων

Τεχνική Κατασκευής	Χρόνος Κατασκευής	Μεθ. Ανίχνευσης	Δ. Εύρος	LOD	Αναγέννηση	Αναφ
+	+	O	+	-	O	[10]
+	+	O	O	-	O	[11]

+	O	O	-	-	O	[12]
+	+	O	-	-	O	[13]
+	-	+	-	+	O	[14]
+	-	O	O	-	O	[15]

(+) θετικό, (-) αρνητικό, (0) παρόμοιο, (*) δεν υπάρχει στοιχείο, που παρέχει ο αναπτυχθείς βιοαισθητήρας σε σχέση με το αντίστοιχο στοιχείο της αναφοράς που γίνεται η σύγκριση.

Έτσι σε σύγκριση με της πρόσφατες αντιπροσωπευτικές αναφορές η **τεχνική κατασκευής** είναι πιο απλή και θέλει ελάχιστο χρόνο κατασκευής Η **μέθοδος ανίχνευσης που χρησιμοποιήθηκε (DPV)** είναι πιο απλή από την ELISA [1-4,6-7], την MRR [9] και TIRE με LSRP [14]. Σχετικές δημοσιεύσεις εφαρμογών απτοαισθητήρων [10-13,15] χρησιμοποιούν συνδυασμένες τεχνικές (EIS, SWV, CV) που είναι παρόμοιας ευκολίας. Υπάρχουν όμως και αναφορές [5, 156] που οι αναλυτικές μέθοδοι (χρονοαμπερομετρία, ποτενσιομετρία) είναι περισσότερο εύχρηστες και απλές. Ο απτοαισθητήρας αυτός έχει το **χαμηλότερο όριο ανίχνευσης** (LOD=8.52 ng/L), από τους περισσότερους αναφερόμενους ανοσοαισθητήρες [1-2,5,7-9], παρόμοιο με αυτόν της αναφοράς [3] και υψηλότερο μόνο από τον ανοσοαισθητήρα της αναφοράς [6]. Αυτό είναι ένα από τα χαρακτηριστικά πλεονεκτήματα που αντιστοιχούν στην μεγαλύτερη ευαισθησία των απταμερών (receptors) έναντι των αντισωμάτων (receptors). Επιπρόσθετα ο απτοαισθητήρας αυτός έχει χαμηλότερο όριο ανίχνευσης και από τον DNA αισθητήρα της αναφοράς [156]. Ο απτοαισθητήρας που αναπτύχθηκε δεν έχει όμως καλύτερα όρια ανίχνευσης από τους υπόλοιπους απτοαισθητήρες [10-13, 15] με μόνη εξαίρεση αυτόν της αναφοράς [14]. Αυτό είναι ένα μειονέκτημα, παρόλα αυτά το όριο ανίχνευσης είναι ικανοποιητικό, αφού καλύπτει τόσο τα όρια που έχει θέσει η ΕΕ (47 ng/l) όσο και οι ΗΠΑ (472 ng/l). Το **δυναμικό εύρος (15-120 ng/l)** που παρουσιάζει ο απτοαισθητήρας είναι καλύτερο από αυτό της αναφοράς [10] και παρόμοιο με τους ανοσοαισθητήρες των αναφορών [1,3] και τους απτοαισθητήρες των αναφορών [11-15]. Το δυναμικό εύρος δεν το αναφέρουν όλοι οι συγγραφείς των δημοσιεύσεων παρόλα αυτά αποτελεί μια σημαντική παράμετρο αξιολόγησης του αισθητήρα. Σημειώνεται ότι ο απτοαισθητήρας της αναφοράς [12] παρουσιάζει ένα εκπληκτικό δυναμικό εύρος (1-10⁵ ng/l). Ο αναπτυχθείς απτοαισθητήρας είναι παρόμοιος με τον απτοαισθητήρα της αναφοράς [12] αλλά η neutravidin είναι χαμηλότερου κόστους από την Streptavidin. Ο απτοαισθητήρας της εργασίας αυτής μπορεί επίσης εύκολα και αξιόπιστα να **αναγεννηθεί** (3 φορές) χωρίς να μειωθεί η δραστηριότητά του. Συμπερασματικά ο απτοαισθητήρας συνδυάζει μια **απλή τεχνική κατασκευής**, μια **εύχρηστη μέθοδο ανίχνευσης** και ένα **ικανοποιητικό όριο ανίχνευσης** με ένα **καλό δυναμικό εύρος ανίχνευσης** της AFM1 στο γάλα.

Στον **τρίτο απτοαισθητήρα** στην μήτρα έγινε απευθείας **ακινητοποίηση του απταμερούς (receptor) με την βοήθεια της μερκαπτοεξανόλης**. Ο απτοαισθητήρας αυτός χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση της AFM1 σε πρότυπα δείγματα. Η ανίχνευση της AFM1 έγινε με καταγραφή της κορυφής του ρεύματος I με την μέθοδο της διαφορικής παλμικής βολταμετρίας (DPV). Η σύγκριση της τεχνικής, και της μεθόδου ανίχνευσης αυτού του απτοαισθητήρα, με πρόσφατες αντιπροσωπευτικές

αναφορές [1-15,156] σε συνδυασμό με το πολύ χαμηλό κόστος κατασκευής του, δίνουν την δυνατότητα εξέλιξης του απτοαισθητήρα σε μια φορητή συσκευή για την ταχεία ανίχνευση της ποιότητας του γάλακτος. Ο απτοαισθητήρας αυτός έχει έναν πολύ **εύκολο τρόπο κατασκευής** αλλά όχι τόσο καλό χρόνο κατασκευής. Επίσης έχει γίνει μελέτη σε ένα πολύ καλό **δυναμικό εύρος** (31-3145ng/l), ενώ έχει ένα **ικανοποιητικό όριο ανίχνευσης** (LOD=37,7ng/l), αφού καλύπτει τόσο τα όρια που έχει θέσει η ΕΕ (47,2 ng/l) όσο και οι ΗΠΑ (472,0 ng/l).

Εν κατακλείδι για πρώτη φορά αναπτύχθηκε ένας βιοαισθητήρας για την ανίχνευση της τοξίνης της Χολέρας στο νερό και τρεις απτοαισθητήρες για τον έλεγχο της Αφλατοξίνης Μ1 στο γάλα με πολύ ικανοποιητικά επί μέρους κατασκευαστικά και λειτουργικά στοιχεία σε σχέση με σχετικές βιβλιογραφικές αναφορές.

9.2. Προοπτικές

Η περαιτέρω έρευνα που θα αφορά την **μείωση του ορίου ανίχνευσης** (LOD) στην περιοχή των picomolar του αναπτυχθέντος βιοαισθητήρα της τοξίνης της χολέρας στο νερό αποτελεί ένα σημαντικό βήμα για την βελτίωση του.

Σε ότι αφορά τον πρώτο απτοαισθητήρα, όπου έγινε η ακινητοποίηση του δενδριμερούς, περαιτέρω μελέτη δύναται να γίνει με στόχο να **μειωθεί ο χρόνος κατασκευής**, κάτι που ενδεχομένως να χρειαστεί τροποποιήσεις ως προς την μέθοδο ακινητοποίησης του δενδριμερούς, που είναι πολύ χρονοβόρα.

Σε ότι αφορά τον δεύτερο απτοαισθητήρα, όπου έγινε η ακινητοποίηση της Neutravidin περαιτέρω μελέτη δύναται να γίνει με στόχο την εφαρμογή του **σε πραγματικά εμβολιασμένα με τοξίνη δείγματα γάλακτος**, κάτι που δεν έγινε εδώ λόγω χρονοβόρων προκαταρκτικών ερευνών που δίνουν όμως τις κατευθύνσεις για την επίτευξη του πιο πάνω σκοπού.

Σε ότι αφορά τον τρίτο απτοαισθητήρα, όπου έγινε ακινητοποίηση του απταμερούς με την μερκαπτοεξανόλη περαιτέρω μελέτη δύναται να γίνει με στόχο την εύρεση της αριστοποιημένης αναλογίας επικάλυψης της μερκαπτοεξανόλης και του απταμερούς προκειμένου να διορθωθούν οι μεγάλες τυπικές αποκλίσεις στην καμπύλη βαθμονόμησης.

Σε όλες τις μελετηθείσες περιπτώσεις των αναπτυχθέντων πρότυπων βιοαισθητήρων πρέπει να γίνουν δοκιμές σε μεγαλύτερο δυναμικό εύρος προκειμένου να εντοπιστούν τα πραγματικά όρια ανίχνευσης των βιοαισθητήρων. Επίσης πρέπει να γίνει μελέτη σε περισσότερα πραγματικά δείγματα, διότι για παράδειγμα η αφλατοξίνη υπάρχει τόσο σε ξηρούς καρπούς όσο και στο καλαμπόκι ενώ η τοξίνη της χολέρας βρίσκεται και στο γάλα αλλά και σε μια σωρεία άλλων τροφών. Αν αναλογιστεί κανείς ότι οι τοξίνες, γενικά και εν δυνάμει, βρίσκονται σε τρόφιμα ευρείας κατανάλωσης αλλά και στο περιβάλλον, τότε η εργασία αυτή ανοίγει τον δρόμο για τον έλεγχο αυτών των βιοχημικών ειδών με **κατασκευή και χρήση** φορητών αναλυτικών συσκευών που θα της χειρίζονται απλοί πολίτες. Αυτό είναι μια (state of art) προοπτική της διατριβής της που δύναται να βελτιώσει αφενός την ποιότητα της καθημερινής ζωής και αφετέρου να μπορεί να προφυλάσσει τους πληθυσμούς από ανεξέλεγκτους τοξικούς παράγοντες με συνεχή έλεγχο περιβαλλοντικών παραμέτρων

Γ.Βιβλιογραφία

- [1] Micheli, L., Grecco, R., Badea, M., Moscone, D., Palleschi, G. (2005) “An electrochemical 79mmunosensors for aflatoxin M1 determination in milk using screen-printed electrodes.” *Biosens. Bioelectron.* 21(4), 588-596
- [2] Vig, A., Radoi, A., Muñoz-Berbel, X., Gyemant, G., Marty, J.L. (2009) “Impedimetric aflatoxin M1 immunosensor based on colloidal gold and silver electrodeposition.” *Sensors Actuators B Chem.* 138(1), 214-220
- [3] Parker, C.O., Tothill, I.E. (2009) “Development of an electrochemical 79mmunosensors for aflatoxin M1 in milk with focus on matrix interference.” *Biosens. Bioelectron.* 24(8), 2452-2457
- [4] Neagu, D., Perrino, S., Micheli, L., Palleschi, G., Moscone, D. (2009) “Aflatoxin M1determination and stability study in milk samples using a screen-printed 96-well electrochemical microplate.” *Int. Dairy J.* 19(12), 753-758
- [5] Paniel, N., Radoi, A., Marty, J.L. (2010) “Development of an electrochemical biosensor for the detection of aflatoxin M1 in Milk.” *Sensors*, 10(10), 9439-9448
- [6] Bacher, G., Pal, S., Kanungo, L., Bhand, S.A. (2012) “label-free silver wire based impedimetric 79mmunosensors for detection of aflatoxin M1 in milk.” *Sensors Actuators, B Chem.*, 168(20), 223-230
- [7] Zhang, X., Liu, L., Chen, X., Kuang, H., Song, S., Xu, C. (2013) “Immuno chromatographic strip development for ultrasensitive analysis of aflatoxin M1.” *Anal. Methods*, 5, 6567-6571
- [8] Karczmarczyk, A., Baeumner, A.J., Feller, K.H. (2017) “Rapid and sensitive inhibition-based assay for the electrochemical detection of Ochratoxin A and Aflatoxin M1 in red wine and milk”, *Electrochim. Acta*, 243, 82-89
- [9] Chalyan, T., Pasquardini, L., Gandolfi, D., Guider, R., Samusenko, A., Zanetti, M., Pucker, G., Pederzoli, C., Pavesi, L. (2017) “Aptamer-and Fab'-Functionalized Microring Resonators for Aflatoxin M1 Detection.” *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.* 23(2), 5900208
- [10] Nguyen, B.H., Tran, L.D., Do, Q.P., Nguyen, H.L., Tran, N.H., Nguyen, P.X. (2013) “Label-free detection of aflatoxin M1 with electrochemical Fe₃O₄/polyaniline-based aptasensor.” *Mater. Sci. Eng. C.* 33, 2229-2234
- [11] Istamboulié, G., Paniel, N., Zara, L., Granados, L.R., Barthelmebs, L., Noguier, T. (2016) “Development of an impedimetric aptasensor for the determination of aflatoxin M1 in milk.” *Talanta*, 146, 464-469
- [12] Pandey, A.K., Rajput, Y.S., Sharma, R., Singh, D. (2017) “Immobilized aptamer on gold electrode senses trace amount of aflatoxin M1.” *Appl. Nanosci.* 7, 893-903
- [13] Jalalian, S.H., Ramezani, M., Danesh, N.M., Alibolandi, M., Abnous, K., Taghdisi, S.M. (2018) “A novel electrochemical aptasensor for detection of aflatoxin M1 based on target-induced immobilization of gold nanoparticles on the surface of electrode.” *Biosens. Bioelectron.* 117, 487-492
- [14] Ghanim Al-Rubaye, A., Nabok, A., Catanante, G., Marty, J.L., Takács, E., Székács, A., Ghanim Al-Rubaye, A., Nabok, A., Catanante, G., Marty, J.L., Takács, E., Székács, A. (2018) “Label-Free Optical

- [15] Smolko, V., Shurpik, D., Porfireva, A., Evtugyn, G., Stoikov, I., Hianik, T. (2018) “Electrochemical aptasensor based on poly (Neutral Red) and carboxylated pillar [5] arene for sensitive determination of aflatoxin M1.” *Electroanalysis* 30, 486-496
- [16] Miller, I.R., Vinkler, H., Yavin, E. (1989) “Cholera toxin complexes with the ganglioside GM1 in lipid monolayers and bilayers: Effect on structure and permeability.” *J. Electroanal. Chem.* 22, 365-377
- [17] Fisher, M.I., Tjarnhage, T. (2000) “Structure and activity of lipid membrane biosensor surfaces studied with atomic force microscopy and a resonant mirror” *Biosens.Bioelectron.* 15, 463-471
- [18] Song, X., Shi, J., Swanson, B. (2000) “Flow Cytometry-Based Biosensor for Detection of Multivalent Proteins.” *Anal. Biochem.* 284, 35-41
- [19] Alfonta, L., Willner, I., Throckmorton, D.J., Singh, A.K. (2001) “Electrochemical and Quartz Crystal Microbalance Detection of the Cholera Toxin Employing Horseradish Peroxidase and GM1-Functionalized Liposomes.” *Anal.Chem.* 73, 5287-5295
- [20] Nikolelis, D.P., Mitrokotsa, M. (2002) “Stabilized lipid film-based biosensor for atenolol.” *Biosens.Bioelectron.* 17, 565-572
- [21] Nikolelis, D.P., Drivelos, D.A., Simantiraki, M.G., Koinis, S. (2004) “An Optical Spot Test for the Detection of Dopamine in Human Urine Using Stabilized in Air Lipid Films.” *Anal. Chem.* 76, 2174-2180
- [22] Nikolelis, D.P., Psaroudakis, N., Ferderigos, N. (2005) “Preparation of a Selective Receptor for Ephedrine for the Development of an Optical Spot Test for the Detection of Ephedrine in Human Urine Using Stabilized in Air Lipid Films with Incorporated Receptor.” *Anal.Chem.* 77, 3217-3221
- [23] Phillips, K.S., Han, J.H., Martinez, M., Wang, Z., Carter, D., Cheng, Q. (2006) “Nanoscale Glassification of Gold Substrates for Surface Plasmon Resonance Analysis of Protein Toxins with Supported Lipid Membranes.” *Anal.Chem.* 78, 596-603
- [24] Viswanathan, S., Wu, L.C., Huang, M.R., Ho, J.A. (2006) “Electrochemical immunosensors for cholera toxin using liposomes and poly (3, 4-ethylenedioxythiophene)-coated carbon nanotubes.” *Anal. Chem.* 78(4), 1115-1121
- [25] Edwards, K.A., March, J.C. (2007) “GM (1)-functionalized liposomes in a microtiter plate assay for cholera toxin in *Vibrio cholerae* culture samples.” *Anal.Biochem.* 368, 39-48
- [26] Schofield, C.L., Field, R.A., Russell, D.A. (2007) “Glyconanoparticles for the Colorimetric Detection of Cholera Toxin.” *Anal. Chem.* 79, 1356-1361
- [27] Chen, H., Qing-Yuan, H., Zheng, Y., Jiang, J.H., Shen, G.L., Yu, R.Q. (2010) “Construction of supported lipid membrane modified piezoelectric biosensor for sensitive assay of cholera toxin based on surface-agglutination of ganglioside-bearing liposomes.” *Anal.Chim. Act.* 657, 204-209
- [28] De, S.N., Sarkar, J.K., Tribedi, B.P. (1951) “An experimental study of the action of cholera toxin.” *J. Pathol. Bacteriol.* 63, 707-717
- [29] Richard, J. L. (2007) “Some major mycotoxins and their mycotoxicoses-An overview.” *Int.J. Food Microbiol.* 119(1-2), 3-10

- [30] Fraden, J. (2010) "Data Acquisition." Handbook of Modern Sensors. New York, Springer, 1-12
- [31] Kalantar-zadeh, K. and Fry, B. (2008) "Nanotechnology-Enabled Sensors." Boston, MA: Springer US
- [32] Doebelin, E.O. (1989) "Measurement Systems Application and Design." 4th ed. McGraw
- [33] Bănică, F-G (2012) "Chemical Sensors and Biosensors: Fundamentals and Applications." Chichester, UK, John Wiley & Sons. 576
- [34] Gotoh, M., Tamiya, E., Momoi, M., Kagawa, Y., and Karube, I. (1987) "Acetylcholine Sensor Based on Ion Sensitive Field Effect Transistor and Acetylcholine Receptor". Analytical letters 20 (6), 857-870
- [35] Takai, N., Sakuma, I., Fukui, Y., Kaneko, A., Fujie, T., Taguchi, K., and Nagaoka, S. (1991) "Studies of the Development of Optical Fiber Sensors for Biochemical Analysis." Artificial Organs 15 (2), 86-89
- [36] Cammann, K. (1977) Bio-sensors Based on Ion-selective Electrodes. 287 (1), 1-9
- [37] Clark, L.; Lyons, C. (1962). "Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery". Ann. N. Y. Acad. Sci. 102 (29).
- [38] Buck, R.P., Hatfield, W.E., Umana, M., and Bowden, E.F. (1990) Biosensor Technology: Fundamentals and Applications. 1st edn. CRC Press
- [39] Thompson, M. and Krull, Ulrich J. (1984) "Biosensors and Bioprobes". TrAC Trends in Analytical Chemistry 3 (7), 173-178
- [40] Zhao, S. and Lennox, R.B. (1991) "Pyrroloquinolinequinone Enzyme Electrode Based on the Coupling of Methanol Dehydrogenase to a Tetrathiafulvalene-tetracyanoquinodimethane Electrode". Analytical Chemistry 63 (11), 1174-1178
- [41] Skoog, D.A., Holler, J.F., Crouch, S.R. (2006) Principles of Instrumental Analysis. 6th edn. Cengage Learning
- [42] Winter, G. and Milstein, C. (1991) "Man-made Antibodies." Nature 349 (6307), 293-299
- [43] Paleček, E., Jelen, F., Teijeiro, C., Fučík, V., Jovin, T.M. (1993) "Biopolymer-modified Electrodes in the Voltammetric Determination of Nucleic Acids and Proteins at the Submicrogram Level". Analytica Chimica Acta 273 (1-2), 175-186
- [44] Bergveld, P. (1988) "Development and Application of Chemical Sensors in Liquids". In Sensors and Sensory Systems for Advanced Robots. Ed. By Dario, P. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 397-414
- [45] Weber, S.G. (1992) "Internal Volume of Competitive Binding Biosensors Controls Sensitivity: Equilibrium Theory". Analytical Chemistry 64 (3), 330-332
- [46] Bowers, L.D. and Carr, P.W. (1980) "Immobilized Enzymes in Analytical Chemistry". In Advances in Biochemical Engineering, Springer Berlin Heidelberg, 15, 89-129
- [47] Bernstein, R.K. (1985) "Improving the Accuracy of Blood Glucose Meters That Use Enzymatic Reagent Strips." Diabetes Care 8 (1), 101-102
- [48] Schultz, J.S. (1987) "Sensitivity and Dynamics of Bioreceptor-based Biosensors." Annals of the New York Academy of Sciences 506, 406-414
- [49] La Rosa, C., Pariente, F., Hernández, L., Lorenzo, E. (1995) "Amperometric Flow-through Biosensor for the Determination of Pesticides". Analytica Chimica Acta 308 (1-3), 129-136

- [50] Sasso, S.V., Pierce, R.J., Walla, R., Yacynych, A.M. (1990) "Electropolymerized 1,2-diaminobenzene as a Means to Prevent Interferences and Fouling and to Stabilize Immobilized Enzyme in Electrochemical Biosensors". *Analytical Chemistry* 62 (11), 1111-1117
- [51] Tran, M. C. and Beaux, J. (1979) "Enzyme Electrode for Inhibitors Determination: Urease-fluoride System". *Analytical Chemistry* 51 (1), 91-95
- [52] Rogers, K.R. (2000) "Principles of Affinity-based Biosensors." *Molecular Biotechnology* 14 (2), 109-129
- [53] Arya, S.K., Saha, S., Ramirez-Vick, J.E., Gupta, V., Bhansali, S., Singh, S.P. (2012) "Recent Advances in ZnO Nanostructures and Thin Films for Biosensor Applications: Review." *Analytica Chimica Acta* 737, 1-21
- [54] Rodriguez-Mozaz, S., Marco, M.P., Lopez, M.J., Barcelo, D. (2004) "Biosensors for environmental monitoring of endocrine disruptors: a review article." *Anal Bioanal Chem.* 378(3), 588-598.
- [55] Malhotra, B. D. and Chaubey A. (2003) "Biosensors for clinical diagnostics industry." *Sensors and Actuators B: Chemical* 91(1-3), 117-127
- [56] Alocilja, E.C., Radke, S.M. (2003) "Market analysis of biosensors for food safety." *Biosens Bioelectron.* 18(5-6), 841-846.
- [57] Ambrosi, A., Sasaki, T., Pumera, M. (2010) "Platelet Graphite Nanofibers for Electrochemical Sensing and Biosensing: The Influence of Graphene Sheet Orientation." *Chemistry, An Asian Journal* 5 (2), 266-271
- [58] Artiles, M.S., Rout, C.S., Fisher, T.S. (2011) "Graphene-based Hybrid Materials and Devices for Biosensing." *Advanced Drug Delivery Reviews* 63 (14-15), 1352-1360
- [59] Bao, H., Pan, Y., Li, L. (2012) "Recent Advances in Graphene-based Nanomaterials for Biomedical Applications". *Nano life* 02 (01), 1230001
- [60] Pumera, M. (2011) "Graphene in Biosensing". *Materials Today* 14 (7-8), 308-315
- [61] Zhou, M., Zhai, Y., Dong, S. (2009) "Electrochemical Sensing and Biosensing Platform Based on Chemically Reduced Graphene Oxide." *Analytical Chemistry* 81 (14), 5603-5613
- [62] Shao, Y., Wang, J., Wu, H., Liu, J., Aksay, I., Lin, Y. (2010) "Graphene Based Electrochemical Sensors and Biosensors: A Review". *Electroanalysis* 22 (10), 1027-1036
- [63] Palanisamy, S., Chen, S.-M., Sarawathi, R. (2012) "A Novel Nonenzymatic Hydrogen Peroxide Sensor Based on Reduced Graphene oxide/ZnO Composite Modified Electrode". *Sensors and Actuators B: Chemical* 166-167, 372-377
- [64] Niu, X., Yang, W., Guo, H., Ren, J., Gao, Ji. (2013) "Highly Sensitive and Selective Dopamine Biosensor Based on 3,4,9,10-perylene Tetracarboxylic Acid Functionalized Graphene Sheets/multi-wall Carbon Nanotubes/ionic Liquid Composite Film Modified Electrode." *Biosensors & Bioelectronics* 41, 225-231
- [65] Israr, M. Q., Hasan, K. ul, Sadaf, J.R. (2011) "Structural Characterization and Biocompatible Applications of Graphene Nanosheets for Miniaturization of Potentiometric Cholesterol Biosensor". *Journal of biosensors & bioelectronics* 02 (03),109

- [66] Wu, J.F., Xu, M.Q. and Zhao, G.C. (2010) "Graphene-based Modified Electrode for the Direct Electron Transfer of Cytochrome c and Biosensing". *Electrochemistry communications* 12 (1), 175-177
- [67] Retna Raj, C. and Ohsaka, T. (2001) "Electrocatalytic Sensing of NADH at an in Situ Functionalized Self-Assembled Monolayer on Gold Electrode". *Electrochemistry communications* 3 (11), 633-638
- [68] Lu, C.H., Yang, H.H., Zhu, C.L., Chen, X., Chen, G.N. (2009) "A Graphene Platform for Sensing Biomolecules." *Angewandte Chemie* 48 (26), 4785-4787
- [69] Lu, G., Ocola, L.E., Chen, J. (2009) "Gas Detection Using Low-temperature Reduced Graphene Oxide Sheets". *Applied physics letters* 94 (8), 083111
- [70] Lu, G., Ocola, L.E., Chen, J. (2009) "Reduced Graphene Oxide for Room-temperature Gas Sensors." *Nanotechnology* 20 (44), 445502
- [71] Lv, S., Lin, Z., Zhang, K., Lu, M., Tang, D., (2017) "Polyion oligonucleotide-decorated gold nanoparticles with tunable surface charge density for amplified signal output of potentiometric 83mmunosensors." *Anal. Chim. Acta* 964, 67-73
- [72] Hu, T., Lu, S., Chen, C., Sun, J., Yang, X. (2017) "Colorimetric sandwich 83mmunosensors for A β (1-42) based on dual antibody-modified gold nanoparticles." *Sens. Actuators B: Chem.* 243, 792-799.
- [73] Lv, S., Zhang, K., Lin, Z., Tang, D. (2017) "Novel photoelectrochemical 83mmunosensors for disease-related protein assisted by hemin/G-quadruplex-based DNAzyme on gold nanoparticles to enhance cathodic photocurrent on p-CuBi₂O₄ semiconductor." *Biosens. Bioelectron.* 96, 317-323.
- [74] Alexander, C.M., Maye, M.M., Dabrowiak, J.C. (2011) "DNA-capped nanoparticles designed for doxorubicin drug delivery." *Chem. Commun.* 47 (12), 3418-3420
- [75] Priyadarshini, E. and Pradhan, N. (2017) "Gold nanoparticles as efficient sensors in colorimetric detection of toxic metal ions: A review." *Sens. Actuators B: Chem.* 238, 888-902
- [76] Radousky, H.B. and Liang, H. (2012) "Energy harvesting: an integrated view of materials, devices and applications." *Nanotechnology* 23 (50), 502001
- [77] Shan, C., Yang, H., Song, J., Han, D., Ivaska, A., Niu, L. (2009) "Direct Electrochemistry of Glucose Oxidase and Biosensing for Glucose Based on Graphene." *Analytical Chemistry* 81 (6), 2378-2382
- [78] Alwarappan, S., Liu, C., Kumar, A., Li, C.Z. (2010) "Enzyme-Doped Graphene Nanosheets for Enhanced Glucose Biosensing". *The Journal of Physical Chemistry C* 114 (30), 12920-12924
- [79] Wu, P., Shao, Q., Hu, Y., Jin, J., Yin, Y., Zhang, H., Cai, C. (2010) "Direct Electrochemistry of Glucose Oxidase Assembled on Graphene and Application to Glucose Detection". *Electrochimica acta* 55 (28), 8606-8614
- [80] Wang, K., Liu, Q., Guan, Q.M., Wu, Jun, Li, H.N., Yan, J.J. (2011) "Enhanced Direct Electrochemistry of Glucose Oxidase and Biosensing for Glucose via Synergy Effect of Graphene and CdS Nanocrystals." *Biosensors & Bioelectronics* 26 (5), 2252-2257
- [81] Zeng, Q., Cheng, J.S., Liu, X.F., Bai, H.T., Jiang, J.H. (2011) "Palladium Nanoparticle/chitosan-grafted Graphene Nanocomposites for Construction of a Glucose Biosensor." *Biosensors & Bioelectronics* 26 (8), 3456-3463

- [82] Yang, J., Deng, S., Lei, J., Ju, H., Gunasekaran, S. (2011) "Electrochemical Synthesis of Reduced Graphene sheet-AuPd Alloy Nanoparticle Composites for Enzymatic Biosensing." *Biosensors & Bioelectronics* 29 (1), 159-166
- [83] Hasan, K. ul and Asif, M.H. (2012) "Needle-Type Glucose Sensor Based on Functionalized Graphene". *Journal of biosensors & bioelectronics* 3,114
- [84] Xue, K., Zhou, S., Shi, H., Feng, X., Xin, H., Song, W. (2014) "A novel amperometric glucose biosensor based on ternary gold nanoparticles/polypyrrole/reduced graphene oxide nanocomposite." *Sens.Actuators B: Chem.* 203, 412-416
- [85] Miao, Z., Wang, P., Zhong, A., Yang, M., Xu, Q., Hao, S., Hu, X. (2015) "Development of a glucose biosensor based on electrodeposited gold nanoparticles–polyvinylpyrrolidone–polyaniline nanocomposites." *J. Electroanal. Chem.* 756, 153-160.
- [86] Devasenathipathy, R., Mani, V., Chen, S.M., Huang, S.T., Huang, T.T., Lin, C.M., Hwa, K.Y., Chen, T.Y., Chen, B.J. (2015) "Glucose biosensor based on glucose oxidase immobilized at gold nanoparticles decorated graphene-carbon nanotubes." *Enzym. Microb. Technol.* 78, 40–45
- [87] Sabury, S., Kazemi, S.H., Sharif, F. (2015) "Graphene–gold nanoparticle composite: Application as a good scaffold for construction of glucose oxidase biosensor." *Mater.Sci. Eng. C* 49, 297-304.
- [88] He, C., Xie, M., Hong, F., Chai, X., Mi, H., Zhou, X., Fan, L., Zhang, Q., Ngai, T., Liu, J. (2016) "A Highly Sensitive Glucose Biosensor Based on Gold Nanoparticles/Bovine Serum Albumin/Fe₃O₄ Biocomposite Nanoparticles." *Electrochim.Acta* 222, 1709–1715.
- [89] Thanh, T.D., Balamurugan, J., Lee, S.H., Kim, N.H., Lee, J.H. (2016) "Effective seed-assisted synthesis of gold nanoparticles anchored nitrogen-doped graphene for electrochemical detection of glucose and dopamine." *Biosens. Bioelectron.* 81, 259-267.
- [90] Azak, H., Kurbanoglu, S., Yildiz, H.B., Ozkan, S.A. (2016) "Electrochemical glucose biosensing via new generation DTP type conducting polymers/gold nanoparticles/glucose oxidase modified electrodes." *J. Electroanal. Chem.* 770, 90–97.
- [91] Rafighi, P., Tavahodi, M., Haghghi, B. (2016) "Fabrication of a third-generation glucose biosensor using graphene-polyethyleneimine-gold nanoparticles hybrid." *Sens. Actuators B: Chem.* 232, 454–461
- [92] Gao, Y., Wu, Y., Di, J. (2017) "Colorimetric detection of glucose based on gold nanoparticles coupled with silver nanoparticles." *Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc.* 173, 207–212
- [93] Sapountzi, E., Braiek, M., Vocanson, F., Chateaux, J.F., Jaffrezic-Renault, N., Lagarde, F. (2017) "Gold nanoparticles assembly on electrospun poly (vinyl alcohol)/poly (ethyleneimine)/glucose oxidase nanofibers for ultrasensitive electrochemical glucose biosensing." *Sens. Actuators B: Chem.* 238, 392-401
- [94] Parlak, O., İncel, A., Uzun, L., Turner, A.P., Tiwari, A. (2017) "Structuring Au nanoparticles on two-dimensional MoS₂ nanosheets for electrochemical glucose biosensors." *Biosens.Bioelectron.* 89, 545–550
- [95] Kang, X., Wang, J., Wu, H., Aksay, I.A., Liu, J., Lin, Y. (2009) "Glucose Oxidase-graphene-chitosan Modified Electrode for Direct Electrochemistry and Glucose Sensing." *Biosensors & Bioelectronics* 25 (4), 901-905

- [96] Kong, F.Y., Li, X.R., Zhao, W.W., Xu, J.J., Chen, H.Y. (2012) “Graphene oxide–thionine–Au Nanostructure Composites: Preparation and Applications in Non-enzymatic Glucose Sensing”. *Electrochemistry communications* 14 (1), 59–62
- [97] Luo, J., Jiang, S., Zhang, Hongyan, Jiang, J., Liu, X. (2012) “A Novel Non-Enzymatic Glucose Sensor Based on Cu Nanoparticle Modified Graphene Sheets Electrode.” *Analytica Chimica Acta* 709, 47–53
- [98] Li, Limiao, Du, Z., Liu, S., Hao, Q., Wang, Yanguo, Li, Q., Wang, T. (2010) “A Novel Nonenzymatic Hydrogen Peroxide Sensor Based on MnO₂/graphene Oxide Nanocomposite.” *Talanta* 82 (5), 1637–1641
- [99] Liu, Xuexia, Zhu, H., Yang, X. (2011) “An Amperometric Hydrogen Peroxide Chemical Sensor Based on graphene-Fe₃O₄ Multilayer Films Modified ITO Electrode.” *Talanta* 87, 243–248
- [100] Palanisamy, S., Chen, S.M., Sarawathi, R. (2012) “A Novel Nonenzymatic Hydrogen Peroxide Sensor Based on Reduced Graphene oxide/ZnO Composite Modified Electrode”. *Sensors and Actuators B: Chemical* 166-167, 372–377
- [101] Ensafi, A.A., Jafari-Asl, M., Rezaei, B. (2013) “A Novel Enzyme-free Amperometric Sensor for Hydrogen Peroxide Based on Nafion/exfoliated Graphene oxide-Co₃O₄ Nanocomposite.” *Talanta* 103, 322–329
- [102] Gong, Y., Chen, X., Lu, Y., Yang, W. (2015) “Self-assembled dipeptide–gold nanoparticle hybrid spheres for highly sensitive amperometric hydrogen peroxide biosensors.” *Biosens. Bioelectron.* 66, 392-398.
- [103] Boujakhrou, A., Díez, P., Sánchez, A., Martínez-Ruiz, P., Pingarrón, J.M., Villalonga, R. (2016) “Gold nanoparticles-decorated silver-bipyridine nanobelts for the construction of mediatorless hydrogen peroxide biosensor.” *J. Colloid Interface Sci.* 482, 105-111
- [104] Zhang, M.R., Chen, X.Q., Pan, G.B. (2017) “Electrosynthesis of gold nanoparticles/porous GaN electrode for non-enzymatic hydrogen peroxide detection.” *Sens. Actuators B: Chem.* 240, 142-147
- [105] Rivero, P.J., Ibañez, E., Goicoechea, J., Urrutia, A., Matias, I.R., Arregui, F.J. (2017) “A self-referenced optical colorimetric sensor based on silver and gold nanoparticles for quantitative determination of hydrogen peroxide.” *Sens. Actuators B: Chem.* 251, 624-631
- [106] Yan, S., Fu, L., Li, K., Wang, B., Xu, X., Xiao, L. (2017) “Solvothermal Synthesis of SnS₂ /Gold Nanoparticle Hybrids and Their Application in Non-Enzymatic Hydrogen Peroxide Sensing.” *Nanosci. Nanotechnol-Asia*, 7(1), 51-57
- [107] Li, F., Chai, J., Yang, H., Han, D., Niu, L. (2010) “Synthesis of Pt/ionic Liquid/graphene Nanocomposite and Its Simultaneous Determination of Ascorbic Acid and Dopamine.” *Talanta* 81 (3), 1063–1068
- [108] Silva RT and Vieira I.C. (2015) “A biosensor based on gold nanoparticles stabilized in poly(allylamine hydrochloride) and decorated with laccase for determination of dopamine.” *Analyst*, 141, 216-224
- [109] Dey, R.S. and Raj, C.R. (2010) “Development of an Amperometric Cholesterol Biosensor Based on Graphene–Pt Nanoparticle Hybrid Material”. *The Journal of Physical Chemistry C* 114 (49), 21427–21433
- [110] Wu, J.F., Xu, M.Q., Zhao, G.C. (2010) “Graphene-based Modified Electrode for the Direct Electron Transfer of Cytochrome c and Biosensing”. *Electrochemistry communications* 12 (1), 175–177

- [111] Xiang, C., Zou, Y., Sun, L.X., Xu, F. (2008) "Direct Electron Transfer of Cytochrome c and Its Biosensor Based on Gold Nanoparticles/room Temperature Ionic Liquid/carbon Nanotubes Composite Film". *Electrochemistry communications* 10 (1), 38-41
- [112] Liu, H., Gao, Jian, Xue, M., Zhu, N., Zhang, M., Cao, T. (2009) "Processing of Graphene for Electrochemical Application: Noncovalently Functionalize Graphene Sheets with Water-soluble Electroactive Methylene Green." *Langmuir: the ACS Journal of Surfaces and Colloids* 25 (20), 12006–12010
- [113] Wan, Y., Wang, Yi, Wu, Jiajia, Zhang, D. (2011) "Graphene Oxide Sheet-mediated Silver Enhancement for Application to Electrochemical Biosensors." *Analytical Chemistry* 83 (3), 648–653
- [114] Zhao, J., Chen, G., Zhu, L., Li, G. (2011) "Graphene Quantum Dots-based Platform for the Fabrication of Electrochemical Biosensors". *Electrochemistry communications* 13 (1), 31–33
- [115] Bo, Y., Wang, W., Qi, J., Huang, S. (2011) "A DNA Biosensor Based on Graphene Paste Electrode Modified with Prussian blue and Chitosan." *The Analyst* 136 (9), 1946–1951
- [116] Wan, Y., Lin, Z., Zhang, D., Wang, Y., Hou, B. (2011) "Impedimetric immunosensors doped with reduced graphene sheets fabricated by controllable electrodeposition for the non-labelled detection of bacteria." *Biosens Bioelectron.* 26(5),1959-1964
- [117] Malo, R.H., Vallés, C., Benito, A.M., Maser, W.K., Rius, F.X., Riu, J. (2014) "Graphene-based potentiometric biosensor for the immediate detection of living bacteria." *Biosensors & Bioelectronics* 54, 553-557
- [118] Fang, X., Bai, L., Han, X., Wang, J., Shi, A., Zhang, Y. (2014) "Ultra-sensitive biosensor for K-ras gene detection using enzyme capped gold nanoparticles conjugates for signal amplification." *Anal.Biochem.* 460, 47-53
- [119] Sattarahmady, N., Tondro, G., Gholchin, M., Heli, H. (2015) "Gold nanoparticles biosensor of *Brucella* spp. Genomic DNA: Visual and spectrophotometric detections." *Biochem. Eng. J.* 97, 1-7
- [120] Cai, B., Huang, L., Zhang, H., Sun, Z., Zhang, Z., Zhang, G.J. (2015) "Gold nanoparticles-decorated graphene field-effect transistor biosensor for femtomolar MicroRNA detection." *Biosens.Bioelectron.* 74, 329–334.
- [121] Wang, X., Ge, L., Yu, Y., Dong, S., Li, F. (2015) "Highly sensitive electrogenerated chemiluminescence biosensor based on hybridization chain reaction and amplification of gold nanoparticles for DNA detection." *Sens. Actuators B: Chem.* 220, 942–948
- [122] Li, S., Qiu, W., Zhang, X., Ni, J., Gao, F., Wang, Q. (2016) "A high-performance DNA biosensor based on the assembly of gold nanoparticles on the terminal of hairpin-structured probe DNA." *Sens. Actuators B: Chem.* 223, 861–867
- [123] Hajihosseini, S., Nasirizadeh, N., Hejazi, M.S., Yaghmaei, P. (2016) "A sensitive DNA biosensor fabricated from gold nanoparticles and graphene oxide on a glassy carbon electrode." *Mater.Sci.Eng. C.* 61, 506–515
- [124] McVey, C., Huang, F., Elliott, C., Cao, C. (2016) "Endonuclease controlled aggregation of gold nanoparticles for the ultrasensitive detection of pathogenic bacterial DNA." *Biosens. Bioelectron.* 92, 502-508

- [125] Mohammed, A.M. (2016) "Fabrication and characterization of gold nano particles for DNA biosensor applications." *Chin.Chem. Lett.* 27 (5), 801–806
- [126] Sattarahmady, N., Movahedpour, A., Heli, H., Hatam, G. (2016) "Gold nanoparticles-based biosensing of *Leishmania major* kDNA genome: Visual and spectrophotometric detections." *Sens. Actuators B: Chem.* 235, 723–731
- [127] Wang, Q., Liu, R., Yang, X., Wang, K., Zhu, J., He, L., Li, Q. (2016) "Surface plasmon resonance biosensor for enzyme-free amplified microRNA detection based on gold nanoparticles and DNA supersandwich." *Sens. Actuators B: Chem.* 223, 613-620
- [128] Esmaeili, C., Heng, L.Y., Chiang, C.P., Rashid, Z.A., Safitri, E., Marugan, R.S.P.M. (2017) "A DNA biosensor based on kappa-carrageenan-polyppyrrrole-gold nanoparticles composite for gender determination of Arowana fish (*Scleropages formosus*)." *Sens. Actuators B: Chem.* 242, 616-624
- [129] Tugba, K., Arzum E., Ozsoz, M., Carrara (2017) "microRNA biosensors: Opportunities and challenges among conventional and commercially available techniques." *Biosens. Bioelectron.* 99, 525-546
- [130] Peng, Y., Li, L., Yi, X., Guo, L. (2014) "Label-free picomolar detection of Pb²⁺ using atypical icosahedra gold nanoparticles and rolling circle amplification." *Biosens. Bioelectron.* 59, 314-320
- [131] Yang, Y., Zhang, S., Kang, M., He, L., Zhao, J., Zhang, H., Zhang, Z. (2015) "Selective detection of silver ions using mushroom-like polyaniline and gold nanoparticle nanocomposite-based electrochemical DNA sensor." *Anal. Biochem.* 490, 7-13
- [132] Ebrahimi, M., Raouf, J.B., Ojani, R. (2015) "Novel electrochemical DNA hybridization biosensors for selective determination of silver ions." *Talanta*, 144, 619-626
- [133] Taghdisi, S.M., Danesh, N.M., Lavaee, P., Ramezani, M., Abnous, -K. (2015) "An aptasensor for selective, sensitive and fast detection of lead (II) based on polyethyleneimine and gold nanoparticles." *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 39 (3), 1206-1211
- [134] Wang, G., Lu, Y., Yan, C., Lu, Y. (2015) "DNA-functionalization gold nanoparticles-based fluorescence sensor for sensitive detection of Hg²⁺ in aqueous solution." *Sens. Actuators B: Chem.* 211, 1–6
- [135] Zhang, B., Chen, J., Zhu, H., Yang, T., Zou, M., Zhang, M., Du, M. (2016) "Facile and green fabrication of size-controlled AuNPs/CNFs hybrids for the highly sensitive simultaneous detection of heavy metal ions." *Electrochim. Acta.* 196, 422–430.
- [136] Wang, N., Lin, M., Dai, H., Ma, H. (2016) "Functionalized gold nanoparticles/reduced graphene oxide nanocomposites for ultrasensitive electrochemical sensing of mercury ions based on thymine–mercury–thymine structure." *Biosens. Bioelectron.* 79, 320-326
- [137] Zhang, R., Scott, D., Westbrook, M., Nance, S., Spangler, B., Shipley, G., Westbrook, E. (1995) "The three-dimensional crystal structure of cholera toxin." *J. Mol. Biol.* 251 (4), 563-573.
- [138] De Haan, L., Hirst, T.R. (2004) "Cholera toxin: a paradigm for multi-functional engagement of cellular mechanisms (Review)." *Mol. Membr. Biol.* 21(2), 77-92
- [139] Alam, M., Hasan, N.A., Sultana, M., Balakrish Nair, G., Sadique, A., Faruque, A.S.G., Endtz, H.P., Sack, R.B., Huq, A., Colwell, R.R., Izumiya, H., Morita, M., Watanabe, H., Cravioto, A., (2010) "Diagnostic limitations to accurate diagnosis of cholera." *J. Clin. Microbiol.* 48, 3918-3922

- [140] Fishman, P.H. (1982) "Role of Membrane Gangliosides in the Binding and Action of Bacterial Toxins." *The Journal of Membrane Biol.* 69(2), 85-97
- [141] Wands, A.M., Fujita, A., McCombs, J.E., Cervin, J., Dedic, B., Rodriguez, A.C, Nischan, N., Bond, R.M., Mettlen, M., et.al. (2015) "Fucosylation and protein glycosylation create functional receptors for cholera toxin." *eLIFE.* 4, e09545
- [142] Cervin, J., Wands, A.M., Casselbrant, A., Wu, H., Krishnamurthy, S., Cvjetkovic, A., et.al. (2018) "GM1 ganglioside-independent intoxication by Cholera toxin." *Plos Pathog.* 14(2), e1006862
- [143] Wands, A.M., Cervin, J., Huang, H., Zhang, Y., Youn, G., Brautigam, C.A., Matson Dzebo, M., Björklund, P., Wallenius, V., Bright, D.K., Bennett, C.S., Wittung-Stafshede, P., Sampson, N.S., Yrlid, U., Kohler, J.J. (2018) "Fucosylated Molecules Competitively Interfere with Cholera Toxin Binding to Host Cells." *ACS Infect Dis.* 4(5), 758-770
- [144] Tsai, B. and Rapoport, T.A. "Unfolded cholera toxin is transferred to the ER membrane and released from protein disulfide isomerase upon oxidation by Ero1." *J.Cell.Biol.* 159(2), 207-216.
- [145] Bennett, J. W., Klich, M. (2003) "Mycotoxins", *clinical microbiology review*, 3, 497-516
- [146] Hussein, H., Brasel, J., (2001) "Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on human and animals." *Toxicology*, 167, 101-134
- [147] Fallah, A. A. (2010) "Assessment of aflatoxin M1 contamination in pasteurized and UHT milk marketed in central part of Iran." *Food Chem. Toxicol.* 48(3), 988-991
- [148] Prandini, A.; Tansini, G.; Sigolo, S.; Filippi, L.; Laporta, M.; Piva, G. (2009) "On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products." *Food Chem. Toxicol.* 47(5), 984-991
- [149] Beltrán, E., Ibáñez, M., Sancho, J. V., Cortés, M. Á., Yus, V., Hernández, F. (2011) "UHPLC-MS/MS highly sensitive determination of aflatoxins, the aflatoxin metabolite M1 and ochratoxin A in baby food and milk." *Food Chem.* 126, 737-744
- [150] Boutrif, E. (1998). "Prevention of aflatoxin in pistachios". *Food, nutrition and agriculture.*" 21
- [151] Bognanno, M., La Fauci, L., Ritieni, A., Tafuri, A., De Lorenzo, A., Micari, P., Di Renzo, L., Ciappellano, S., Sarullo, V. Galvano, F. (2006) "Survey of the occurrence of Aflatoxin M1 in ovine milk by HPLC and its confirmation by MS." *Mol. Nutr. Food Res.* 50(3), 300-305.
- [152] Rastogi, S., Dwivedi, P.D., Khanna, S.K., Mukul, D. (2004) "Detection of Aflatoxin M1 contamination in milk and infant milk products from Indian markets by ELISA." *Food Control*, 15(4), 287-290
- [153] Siontorou, C.G., Nikolelis, D.P., Miernik, A., Krull, U.J. (1998) "Rapid methods for detection of Aflatoxin M1 based on electrochemical transduction by self-assembled metal-supported bilayer lipid membranes (s-BLMs) and on interferences with transduction of DNA hybridization." *Electrochim.Acta*, 43(23), 3611-3617
- [154] Hianik, T. (2016) "Affinity Biosensors for Detection Immunoglobulin E and Cellular Prions. Antibodies vs. DNA Aptamers." *Electroanalysis*, 28(8), 1764-1776
- [155] Tuerk, C., Gold, L. (1990) "Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase." *Science*, 249, 505-510.
- [156] Ellington, A.D., Szostak, J.W. (1990) "In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands." *Nature*, 346, 818-822.

- [157] Nikolelis, D.P., Raftopoulou, G., Nikoleli, G.P., Simantiraki, M. (2006) "Stabilized Lipid Membrane Based Biosensors with Incorporated Enzyme for Repetitive Uses." *Electroanalysis* 18(24), 2467-2474
- [158] Hennrich, F., Krupke, R., Arnold, K., Rojas Stütz, J.A., Lebedkin, S., Koch, T., Schimmel, T., Kappes, M.M. (2007) "The Mechanism of Cavitation-induced Scission of Single-walled Carbon Nanotubes." *The Journal of Physical Chemistry. B.* 111(8), 1932-1937
- [159] Ciesielski, A. and Samorì, P. (2014) "Graphene via Sonication Assisted Liquid-phase Exfoliation." *Chemical Society Rev.* 43(1), 381-398
- [160] Lotya, M., Hernandez, Y., King, P.J., Smith, R.J., Nicolosi, V., Karlsson, L.S., Blighe, F.M., et.al. (2009) "Liquid Phase Production of Graphene by Exfoliation of Graphite in Surfactant/water Solutions." *Journal of the American Chemical Soc.* 131(10), 3611-3620
- [161] Nikolelis, D., Chaloulakos, T., Nikoleli, G., Psaroudakis, N. (2008) "A Portable Sensor for the Rapid Detection of Naphthalene Acetic Acid in Fruits and Vegetables Using Stabilized in Air Lipid Films with Incorporated Auxin-binding Protein 1 Receptor." *Talanta* 77 (2), 786-792
- [162] Nikolelis, D., Ntanos, N., Nikoleli, G.P., Tampouris, K. (2008) "Development of an Electrochemical Biosensor for the Rapid Detection of Naphthalene Acetic Acid in Fruits by Using Air Stable Lipid Films with Incorporated Auxin-Binding Protein 1 Receptor." *Protein & Peptide Lett.* 15 (8), 789-794
- [163] Olaru, A., Gheorghiu, M., David, S., Polonschii, C., Gheorghiu, E. (2013) "Quality Assessment of SPR Sensor Chips; Case Study on L1 Chips." *Biosens.Bioel.* 45, 77-81
- [164] Shahal, T., Melzak, K.A., Lowe, C.R., Gizeli, E. (2008) "Poly (dimethylsiloxane)-coated Sensor Devices for the Formation of Supported Lipid Bilayers and the Subsequent Study of Membrane Interactions." *Langmuir: the ACS Journal of Surfaces and Colloids* 24 (19), 11268-11275
- [165] Nikolelis, D.P., Siontorou, C.G., Andreou, V.G, Viras, K.G., Krull, U.J. (1995) "Bilayer lipid membranes as electrochemical detectors for flow injection immunoanalysis." *Electroanalysis*, 7, 1082-1089
- [166] Ahyayauch, H., Bennouna, M., Alonso, A., Goñi, F.M. (2010) "Detergent Effects on Membranes at Subsolubilizing Concentrations: Transmembrane Lipid Motion, Bilayer Permeabilization, and Vesicle Lysis/reassembly Are Independent Phenomena." *Langmuir: the ACS Journal of Surfaces and Colloids* 26 (10), 7307-7313
- [167] Shi, J., Yang, T., Kataoka, S., Zhang, Y., Diaz, A.J., Cremer, P.S. (2007) "GM1 clustering inhibits cholera toxin binding in supported phospholipid membranes." *J Am Chem Soc*, 129(18),5954-5961
- [168] De Wolf, M.J., Van Dessel, G.A., Lagrou, A.R., Hilderson, H.J., Dierick, W.S. (1987) "pH-induced Transitions in Cholera Toxin Conformation: A Fluorescence Study." *Biochem.* 26(13), 3799-3806
- [169] Dimitriou, E., Karaouzas, I., Sarantakos, K., Zacharias, I., Bogdanos, K., Diapoulis, A. (2008) "Groundwater Risk Assessment at a Heavily Industrialised Catchment and the Associated Impacts on a Peri-urban Wetland." *Journal of Environmental Manag.* 88(3), 526-538
- [170] Terrettaz, S., Stora, T., Duschl, C., Vogel, H. (1993) "Protein binding to supported lipid membranes: investigation of the cholera toxin-ganglioside interaction by simultaneous impedance spectroscopy and surface plasmon resonance." *Langmuir.* 9 (5), 1361-1369
- [171] Basu, I and Mukhopadhyay, C. (2014) "Insights into Binding of Cholera Toxin to GM1 Containing Membrane" *Langmuir.* 30 (50), 15244-15252

- [172] Brunger, A.T. and Rummel, A. (2009) "Receptor and Substrate Interactions of Clostridial Neurotoxins." *Toxicon* 54(5), 550-560
- [173] Lencer, W.I. and Saslowsky, D. (2005) "Raft Trafficking of AB5 Subunit Bacterial Toxins." *Biochimica et Biophysica Acta* 1746 (3), 314–321
- [174] Buhleier, E.; Wehner, W.; Vögtle, F. (1978). "Cascade"- and "Nonskid-Chain-like" Syntheses of Molecular Cavity Topologies." *Synthesis*. 2, 155-158.
- [175] Fischer, L.M., Tenje, M., Heiskanen, A.R., Masuda, N., Castillo, J., Bentien, A., Émneus, J., Jakobsen, M.H., Boisen, A. (2009) "Gold cleaning methods for electrochemical detection applications." *Microelectron. Eng.* 86(4-6), 1282-1285
- [176] Castillo, G., Spinella, K., Poturnayová, A., Šnejdárková, M., Mosiello, L., Hianik, T. (2015) "Detection of aflatoxin B1 by aptamer-based biosensor using PAMAM dendrimers as immobilization platform." *Food Control*, 52, 9-18
- [177] Hianik, T., Wang, J. (2009) "Electrochemical aptasensors – recent achievements and perspectives." *Electroanalysis*, 21, 1223-1235
- [178] Hamula, C.L.A., Guthrie, J.W., Zhang, H., Li, X.F., Le, X.C. (2006) "Selection and analytical applications of aptamers." *Trends Anal. Chem.* 25(7), 681-691
- [179] Tassew, N., Thompson, M. (2003) "Kinetic characterization of TAR RNA-Tat peptide and neomycin interactions by acoustic wave biosensor." *Biophys. Chem.* 106, 241-252
- [180] Radi, A.E., Acero Sánchez, J.L., Baldrich, E., O'Sullivan, C.K. (2006) "Reagentless, reusable, ultrasensitive electrochemical molecular beacon aptasensor." *J. Am. Chem. Soc.* 128, 117-124
- [181] Miodek, A., Castillo, G., Hianik, T., Korri-Youssoufi, H. (2013) "Electrochemical aptasensor of human cellular prion based on multiwalled carbon nanotubes modified with dendrimers: A platform for connecting redox markers and aptamers." *Anal. Chem.* 85, 7704-7712
- [182] Castillo, G., Lamberti, I., Mosiello, L., Hianik, T. (2012) "Impedimetric DNA Aptasensor for Sensitive Detection of Ochratoxin A in Food." *Electroanalysis*, 24, 512-520
- [183] Xiao, Y., Lubin, A.A., Heeger, A.J., Plaxco, K.W. (2005) "Label-free electronic detection of thrombin in blood serum by using an aptamer-based sensor." *Angew. Chem. Int. Ed.* 44, 5456-5459
- [184] Liu, Y., Tuleouva, N., Ramanculov, E., Revzin, A. (2010) "Aptamer-based electrochemical biosensor for interferon gamma detection." *Anal. Chem.* 82, 8131-8136

Δ.Παραρτήματα

1. Ακρωνύμια
2. Τίτλοι Σχημάτων-εικόνων και πινάκων
3. Poster σε συνέδριο
4. Δημοσιεύσεις
5. Βιογραφικά στοιχεία

I.Ακρωνύμια

ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ	ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ
AFM	Atomic Force Microscopy Μικροσκοπία Ατομικής Δύναμης
AFM1	Aflatoxin M1 Αφλατοξίνη M1
AIBN	Azobisisobutyronitrile 2,2'-αζωδισοβούτυρονιτρίλιο
BLMs	Bilayer Lipid Membranes Διστρωματική Λιπιδική Μεμβράνη
CRGO	Chemically Reduced Graphene Oxide Χημικό Ανηγμένο Οξείδιο Γραφενίου
CS	Chitosan Χιτοζάνη
CV	Cyclic voltammetry Κυκλική βολταμετρία
DPPA	Dipalmitoylphosphatidic acid Διπαλμιτούλ φωσφατιδικό οξύ
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholine Διπαλμιτούλφωσφατιδυλοχολίνη
DPV	Differential Pulsive Voltammetry Διαφορική Παλμική Βολταμετρία
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide
EMF	Electromotive Force Ηλεκτρεγερτική Δύναμη
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assays Δοκιμασίες ενζυμικής ανοσοαπορρόφησης
EIS	Electrochemical Impedance spectroscopy Φασματοσκοπία ηλεκτροχημικής αντίστασης ή Διηλεκτρική φασματοσκοπία
ERGO	Electrochemically Reduced Graphene Oxide Ηλεκτροχημικά Ανηγμένο Οξείδιο Γραφενίου
FRET	Fluorescence Resonant Energy Transfer Μεταφορά ενέργειας φθορισμού
GC	Glass Carbon Υαλώδης Άνθρακας
GO	Graphene Oxide Οξείδιο Γραφενίου
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

	4- (2-υδροξυαιθυλο) -1-πιπεραζινο-αιθανοσουλφονικό οξύ
HRP	horseradish peroxidase
IDA	Interdigitated electrode array Συστοιχία ηλεκτροδίων αλληλεπίδρασης
IL	Ionic Liquid Ιοντικό Υγρό
LOD	Limit of detection Όριο ανίχνευσης
LSRP	Localized Surface Plasmon Resonance Φαινόμενο συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων
MG	Methylene Green Πράσινο του Μεθυλενίου
MB	Methylene blue Κυανό του Μεθυλενίου
MRR	microring resonator μικροδακτύλιος συντονισμού
NHS	N-Hydroxysuccinimide
PB	Prussian Blue
PBS	Phosphate Buffer Saline Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού άλατος
QCM	Quartz Crystal Microbalance Μικροζυγός κρυστάλλου χαλαζία
SEM H.M.Σ	Scanning Electrode Microscope Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σαρώσεως
SELEX	Systematic Evolution of Ligand with Exponential enrichment Συστηματική εξέλιξη του υποκαταστάτη με εκθετικό εμπλουτισμό
SiON	Silicon OxyNitride Οξυνιτρίδιο ενός Σιλικόνης
SPCE	Screen Printed Electrodes Ηλεκτρόδια με τυπωμένη οθόνη
SPR	Surface Plasmon Resonance
SWV	Square Wave Voltammetry Βολταμετρία τετραγωνικού κύματος
TCEP	Tris(2-CarboxyEthyl) Phosphine hydrochloride
TEM	Transmission Electronic Microscopy Μικροσκοπία Ηλεκτρονικής Διαπερατότητας
TRGO	Thermally Reduced Graphene, TRGO Θερμικώς Ανηγμένο Γραφένιο

TIRE	Total Internal Reflection Ellipsometry Ελλειψομετρία εσωτερικής αντανάκλασης
------	---

II. Τίτλοι Σχημάτων-εικόνων-πινάκων

ΣΧΗΜΑΤΑ

ΣΧΗΜΑ	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ	ΣΕΛ
2.1	Τυπική απεικόνιση της λειτουργίας της κοινού βιοαισθητήρα	6
2.2	Τυπική απεικόνιση του ενζυματικού βιοαισθητήρα του Clark	7
2.3	Τυπική απεικόνιση βιοαισθητήρα που χρησιμοποιείται στην αμπερομετρία	10
2.4	Τυπική απεικόνιση βιοαισθητήρα που χρησιμοποιείται στην ποτενσιομετρία	11
2.5	Τυπική απεικόνιση της πιεζοηλεκτρικού βιοαισθητήρα	12
2.6	Τυπική απεικόνιση της οπτικού βιοαισθητήρα	12
2.7	Τυπική απεικόνιση της θερμικού βιοαισθητήρα	13
2.8	Τυπική απεικόνιση μιας σταθεροποιημένης λιπιδικής μεμβράνης.	15
3.1	Τυπική απεικόνιση του γραφενίου	17
3.2	Μερικές δομές νανοϋλικών γραφενίου	18
3.3	Γενική απεικόνιση ενός νανοσωματιδίου του χρυσού (Au-Nps)	20
3.4	Τυπική απεικόνιση βιοαισθητήρα για την ανίχνευση γλυκόζης	22
3.5	Τυπική απεικόνιση βιοαισθητήρα για την ανίχνευση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H ₂ O ₂)	25
3.6	Τυπική απεικόνιση βιοαισθητήρα για την ανίχνευση της Ντοπαμίνης	26
3.7	Τυπική απεικόνιση βιοαισθητήρα για την ανίχνευση της Χοληστερόλης	27
3.8	Τυπική απεικόνιση βιοαισθητήρα για την ανίχνευση του κυτοχρώματος C	27
3.9	Τυπική απεικόνιση βιοαισθητήρα για την ανίχνευση του NADH	28
3.10	Τυπική απεικόνιση βιοαισθητήρα για την ανίχνευση DNA	29
3.11	Τυπική απεικόνιση βιοαισθητήρα για την ανίχνευση βαρέων μετάλλων	31
4.1	Τυπική απεικόνιση της τρισδιάστατης δομής της τοξίνης της Χολέρας με τις πέντε πρωτεϊνικές υπομονάδες	34
4.2	Τυπική απεικόνιση του μηχανισμού της παθογόνας δράσης της τοξίνης της Χολέρας.	35
5.1	Τυπική απεικόνιση μιας πειραματικής διάταξης και της επιφάνειας του βιοηλεκτροδίου εργασίας	45
5.2	Η απόκριση του βιοαισθητήρα σε συγκέντρωση (C=100nM) της τοξίνης της χολέρας σε pH= 6.5-7.8 .	47
5.3	Η απόκριση του αισθητήρα μετά από κάθε προσπάθεια αναγέννησης με επαναεισορή της τοξίνης της Χολέρας.	49
5.4	Καμπύλη βαθμονόμησης για την ανίχνευση της τοξίνης της Χολέρας	50

6.1	Τυπική απεικόνιση του απτοαισθητήρα που χρησιμοποιήθηκε	55
6.2	A) Ποτενσιομετρικό διάγραμμα ελέγχου του AFM1 του απτοαισθητήρα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις B) Καμπύλη βαθμονόμησης των σχετικών μεταβολών της R_{ct} ($\Delta R_{ct}/R_{cto}=(R_{ct}-R_{cto})/R_{cto}$) έναντι της συγκεντρώσεως, που προέκυψε από το διάγραμμα A.	56
6.3	Ποτενσιομετρικά διαγράμματα που αντιστοιχούν στα στάδια της παρασκευής του απτοαισθητήρα α) στην επιφάνεια του σκέτου χρυσού (bare) β) στο στρώμα της κυσταμίνης (cystamine) γ) το δενδριμερές (dendrimer) δ) στην ακινητοποίηση του απταμερούς (aptamer).	57
6.4	Καμπύλες βαθμονόμησης των σχετικών αλλαγών της R_{ct} ($\Delta R_{ct}/R_{cto}=(R_{ct}-R_{cto})/R_{cto}$) σε γάλα (milk) και ρυθμιστικό διάλυμα (PBS) έναντι της συγκεντρώσεως της AFM1	58
7.1	Τυπική απεικόνιση του απτοαισθητήρα που χρησιμοποιήθηκε	64
7.2	Διαγράμματα ελέγχου του απτοαισθητήρα με διαφορετική παλμική βολταμετρία στα απταμερή A) APT2 (PBS), B) APT3 (HEPES) που ακινητοποιούνται σε στρώμα neutravidin τροποποιημένο με Fe-COOH.	65
7.3	Καμπύλες βαθμονόμησης που προέκυψαν από τα διαγράμματα ελέγχου με τις σχετικές αλλαγές των κορυφών ρεύματος ($\Delta I/I_0$) έναντι της συγκεντρώσεως της AFM1 στα δύο απταμερή.	65
8.1	Τυπική απεικόνιση του απτοαισθητήρα πριν την είσοδο και μετά την είσοδο της AFM1	70
8.2	A) Διάγραμμα ελέγχου του απτοαισθητήρα με διαφορετική παλμική βολταμετρία στα απταμερή για τον απτοαισθητήρα (APT4) σε διάφορες συγκεντρώσεις της AFM1. B) Καμπύλη βαθμονόμησης με τις σχετικές αλλαγές στη κορυφή του ρεύματος $\Delta I/I_0$ έναντι της συγκεντρώσεως της AFM1 που προέκυψε από το διάγραμμα A.	71

ΕΙΚΟΝΕΣ

ΕΙΚΟΝΑ	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ	ΣΕΛ
5.1	Το ηλεκτρόμετρο Keithley που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματά της εν ώρα λειτουργίας.	44
5.2	Το μικρόφιλτρο μαζί με το μίγμα των λιπιδίων	46
6.1	Το μηχάνημα AUTOLAB PGSTAT12 που χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα πριν τη χρήση (αριστερά) και κατά τη διάρκεια της χρήσης (δεξιά)	53
7.1	Το μηχάνημα CHI 440 που χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα	61
7.2	Το σύστημα τριών ηλεκτροδίων εν ώρα εργασίας	62
8.1	Ο χώρος που έγιναν τα πειράματα των τριών κεφαλαίων και η εξωτερική όψη του πανεπιστημίου της Μπρατισλάβα (πάνω δεξιά)	68

ΠΙΝΑΚΕΣ

ΠΙΝΑΚΑΣ	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ	ΣΕΛ
2.1	Η ιστορική εξέλιξη των βιοαισθητήρων	8
2.2	Ταξινόμηση βιοαισθητήρων ανάλογα με την αρχή της μεθόδου και με το είδος του μετατροπέα σήματος (φυσικό στοιχείο αναγνώρισης)	10
4.1	Όρια ανίχνευσης (LOD) και χρόνοι απόκρισης από επιλεγμένες βιβλιογραφικές πηγές σε βιοαισθητήρες για προσδιορισμό της CT σε nM	36
4.2	Όρια ανίχνευσης (LOD) και δυναμικό εύρος από επιλεγμένες βιβλιογραφικές πηγές σε ανοσοαισθητήρες [1-9] και DNA αισθητήρα [153] για τον προσδιορισμό της AFM1 σε ng/l	39
4.3	Όρια ανίχνευσης (LOD) και δυναμικό εύρος από επιλεγμένες βιβλιογραφικές πηγές σε απτοαισθητήρες για τον προσδιορισμό της AFM1 σε ng/l	41
5.1	Η ποσοστιαία ανάκτηση του βιοαισθητήρα για την ανίχνευση της Χολέρας της τοξίνης σε πραγματικά δείγματα νερού	51
6.1	Σύγκριση των κορυφών στις καμπύλες βαθμονόμησης του σχήματος 6.4	63
9.1	Σύγκριση κατασκευαστικών και λειτουργικών στοιχείων του αναπτυχθέντος βιοαισθητήρα για την ανίχνευση της τοξίνης της χολέρας με πρόσφατες αντιπροσωπευτικές αναφορές	73
9.2	Σύγκριση κατασκευαστικών και λειτουργικών στοιχείων του πρώτου αναπτυχθέντος απτοαισθητήρα για την ανίχνευση της AFM1 με πρόσφατες αντιπροσωπευτικές αναφορές	74-75
9.3	Σύγκριση κατασκευαστικών και λειτουργικών στοιχείων του δεύτερου αναπτυχθέντος απτοαισθητήρα για την ανίχνευση της AFM1 με πρόσφατες αντιπροσωπευτικές αναφορές.	76-77

III. Poster σε συνέδριο

HIGH SENSITIVE ELECTROCHEMICAL APTASENSOR FOR DETECTION AFLATOXIN M1 IN MILK

Stefanos Karapetis², Marianna Ellásová-Sohová¹, Lenka Bábellová³, Alexandra Poturnayová^{1,3}, Attila Hucker⁴, Katalin Szabó⁴, Robert Kocsis⁴, Dimitrios P. Nikolettis⁵, Tibor Hlanik⁴

¹ Faculty of Mathematics, Physics and Informatics, Department of Nuclear Physics and Biophysics, Comenius University in Bratislava, Slovakia

² School of Chemical Engineering, National Technical University of Athens, Greece

³ Center of Biosciences Slovak Academy of Sciences, Institute of Biochemistry and Animal Genetics, Slovakia

⁴ Hungarian Dairy Research Institute, Mosonmagyaróvár, Hungary

⁵ Department of Chemistry, University of Athens, Greece



Introduction

Mycotoxins are toxic fungal metabolites that under specific conditions are associated with diseases or mouldy crops [1]. Among mycotoxins the most relevant group are aflatoxins. There have been identified four types of aflatoxins: AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, plus two additional metabolites: AFM1 and AFM2, being AFB1 classified as the most abundant and carcinogenic. The presence of AFB1 in feed and its exposure of lactating animals lead to the contamination of milk by its hydroxylated metabolite AFM1 [2]. Because milk is the main nutrient for children, the presence of AFM1 in milk is considered as one of the most serious problems of food safety. Therefore the development of rapid and sensitive method of detection AFM1 is among priorities in the milk analysis. Currently the AFM1 is detected only in specialized laboratories using HPLC or ELISA methods. However, for widespread of the milk analysis also in small farms the development of less expensive and friendly to use system is among priorities. The biosensor technology based on specific receptors - DNA aptamers can be one of the option. In this work we report simple impedimetric aptasensor for detection AFM1.

Sensor preparation

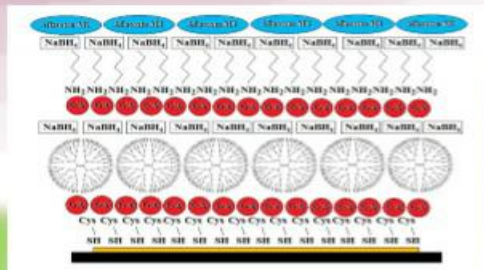


Fig. 1 Scheme of the sensor for aflatoxin M1 detection on gold electrodes.

The 5 mM compound NaBH_4 was incubated for 30 min and again glutaraldehyde for 1h. After this sandwich assay 1 μM aptamer selective for aflatoxine M1 was dropped onto electrode for 16 hours and 5 mM NaBH_4 was incubated for 30 minutes. Scheme of the sensor can be seen in Fig. 1. After this procedure the sensor was ready for detection of aflatoxin M1 in desired concentration. Our target range was 15-120 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Each concentration of toxin was incubated for one hour and measured in electrochemical cell containing K_3K_4 redox species for detection linking AFM1 with aptamer.

The sensor was prepared as follows: gold electrodes were immersed into 0.1M cysteamine dihydrochloride in H_2O . After 2 hours 5% glutaraldehyde in PBS was used for the linking PAMAM G4 dendrimers to cysteamine. Then dendrimers were incubated for 5 hours.

Cyclic voltammetry

Cyclic voltammetry (CV) is commonly used method for protein aptamer interactions. In the Fig. 2 the CV results show decreasing of the current flowing via the sensor layer and the oxidation and reduction peaks are separating with increasing concentration of aflatoxin M1 incubated with the sensor. Different colors in graph show different concentrations of AFM1 incubated on the biosensing surface.

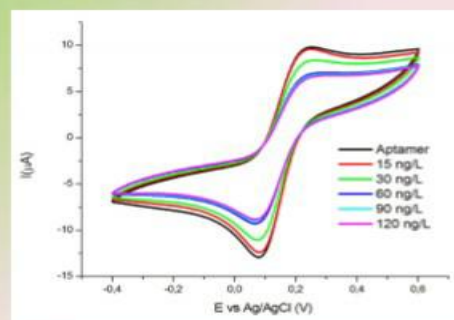


Fig. 2 Cyclic voltammogram I vs. Ag/Ag/Cl for Aflatoxin M1 concentration range 15-120 ng/L.

Electrochemical impedance spectroscopy

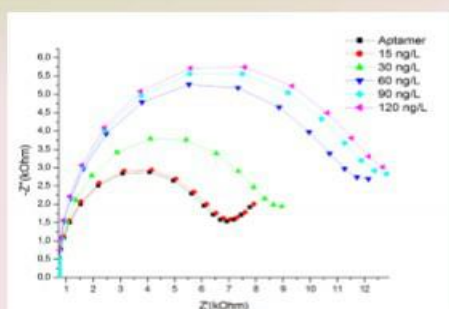


Fig. 3 Nyquist plot from electrochemical impedance spectroscopy biosensor for Aflatoxin M1.

Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) was performed in the same electrochemical cell with $\text{K}[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ redox probe. In the Fig.3 there is shown increasing resistivity of layer with increasing concentration of aflatoxin M1 incubated with the sensor. In higher concentrations of aflatoxin there is a small difference probably because of the full filling of biosensing layer.

Ratio and ELISA testing of Aflatoxin M1 in samples

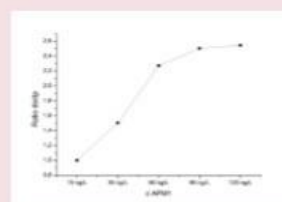


Fig. 4 Ratio of d_1/d_0 . Where $d_1=R_{ox}(\text{Apt-AFM1})-R$ (bare gold electrode) and $d_0=R_{ox}(\text{Apt})-R$ (bare gold electrode) as a function of concentration.

In Fig. 4 there is shown the ratio of d_1/d_0 . Where $d_1=R_{ox}(\text{Apt-AFM1})-R$ (bare gold electrode) and $d_0=R_{ox}(\text{Apt})-R$ (bare gold electrode). The curve tendency shows estimated result good for calibration curve creation. Such calibration line can be in the future used in real samples like milk, cheese etc. First measurements in samples have been done with ELISA tests. The results can be seen in Fig. 5.

Milk sample	AFM1 [ppb]	Spiked sample 40 ppt Recovery [%]
UNT milk	5.30 ± 3.43	99
Raw milk	11.02 ± 1.26	93
Milk powder	86.21 ± 3.76	110

Fig. 5 Results of ELISA testing in the food samples.

Summary

The DNA aptamers specific to AFM1 have been immobilized at the surface of poly (amidoamine) dendrimers (PAMAM) of four generation covalently attached to a gold surface. Impedance spectroscopy at presence of 5 mM redox indicator $\text{K}[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ allowed detection of charge transfer resistance which increased following addition of AFM1. This method has been successfully used for detection of AFB1 in or recent work [3]. The biosensor allowed detection of AFM1 with high sensitivity of approx. 20 ng/L, while the maximum permitted level in milk in EU 50 ng/L. Traditional ELISA test was done on three food samples. This samples are going to be tested also with mentioned electrochemical sensor.

References

- [1] J. Boonen et al., *Toxicology* **301** (2012) 21.
- [2] A.A. Falah, *Food Chem. Toxicol.* **48** (2010) 988.
- [3] G. Castillo et al., *Food Control* **52** (2015) 9.

Acknowledgment

This work was financially supported by European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under the Marie Skłodowska-Curie grant agreement No 690898.

IV. Δημοσιεύσεις σε διεθνή περιοδικά

Δημοσίευση στο περιοδικό electroanalysis

DOI: 10.1002/elan.201501134

Development of an Electrochemical Biosensor for the Rapid Detection of Cholera Toxin Based on Air Stable Lipid Films with Incorporated Ganglioside GM1 Using Graphene Electrodes

Stephanos Karapetis,^[a] Georgia-Paraskevi Nikoleli,^[a] Christina G. Siontorou,^[b] Dimitrios P. Nikolelis,^{*[c]} Nikolaos Tzamtzis,^[a] and Nikolas Psaroudakis^[d]

Abstract: The present work describes a miniaturized potentiometric cholera toxin sensor on graphene nanosheets with incorporated lipid films. Ganglioside GM1, the natural cholera toxin receptor, immobilized on the stabilized lipid films, provided adequate selectivity for detection over a wide range of toxin concentrations, fast response time of ca. 5 min, and detection limit of 1 nM. The pro-

posed sensor is easy to construct and exhibits good reproducibility, reusability, selectivity, long shelf life and high sensitivity of ca. 60 mV/decade of toxin concentration. The method was implemented and validated in lake water samples. This novel ultrathin film technology is currently adapted to the rapid detection of other toxins that could be used in bioterrorism.

Keywords: Stabilized lipid films • Cholera toxin biosensor • Graphene electrodes • Gangliosides • Electroanalysis

1 Introduction

Cholera toxin (CT) is a bacterial polypeptide belonging to a diverse group of biologically active substances that interact with specific gangliosides in natural and artificial membranes. It is now well known that the specific interaction between the cholera toxin and the membrane-bound monosialo-ganglioside GM1 causes the activation of adenylate cyclase [1], a scheme considered as a classical example for signal transduction through biological membranes [2]. CT has been shown to form channels in artificial bilayers containing GM1, presumably in an analogous way. In addition to its role as a specific binding site for the toxin, GM1 appears to facilitate the transmembrane movement of CT [3]. Other toxins, such as tetanus, botulinum and shiga, use polysialic gangliosides as cell surface receptors [4], whereas *E.coli* toxins share with CT a preference for GM1 [5].

Cholera toxin, produced by the bacterium *Vibrio cholera*, can cause an epidemic disease leading to rapid dehydration, acidosis, and death within a few hours of exposure. According to WHO Global Health Observatory data, cholera outbreaks may sum up to 4.3 million morbidity cases and 142,000 deaths per year worldwide, with high rates, though, in Africa and India. Since CT fits the bioterrorism profile, there has been increasing interest in the development of rapid and sensitive methods for its detection [6].

There are many analytical techniques for CT. Specific detection is based either on the CT antibody or the ganglioside GM1. Antibody-based immunosensors for CT have been developed using impedance measurements on ion-sensitive field-effect transistor devices coupled with

surface plasmon resonance (SPR) [7] and fluorescence microarray technology [8]. Ganglioside GM1 offers certain advantages over the antibody, mainly in two aspects: (i) GM1 exhibits higher affinity for the toxin resulting in a much more rapid binding process [9]; (ii) GM1 can be easily incorporated into a phospholipid bilayer structure to develop a nature-mimicking CT detection probe [10], thereby avoiding the resource-intensive multi-step antibody protocols. The binding affinity and specificity of GM1 to CT have been investigated by surface plasmon resonance and impedance spectroscopy [11]; thereafter, the receptor and its analogues have found widespread use in cholera toxin detection. Lipid film with incorporated GM1 has been packed into an optical CT biosensor using

- [a] S. Karapetis, G.-P. Nikoleli, N. Tzamtzis
Laboratory of Inorganic & Analytical Chemistry, School of Chemical Engineering, Dept 1, Chemical Sciences, National Technical University of Athens, 9 Iroon Polytechniou St., Athens 157 80, Greece
- [b] C. G. Siontorou
Laboratory of Simulation of Industrial Processes, Department of Industrial Management and Technology, School of Maritime and Industry, University of Piraeus
- [c] D. P. Nikolelis
Laboratory of Environmental Chemistry, Department of Chemistry, University of Athens, Panepistimiopolis-Kouponia, GR-15771 Athens, Greece
Tel: +302107274754
*e-mail: nikolelis@chem.uoa.gr
- [d] N. Psaroudakis
Laboratory of Inorganic Chemistry, Department of Chemistry, University of Athens, Panepistimiopolis-Kouponia, GR-15771 Athens, Greece

resonant mirror and SPR [12–13]. The construction of a piezoelectric lipid membrane biosensor modified with surface-agglutinated ganglioside-bearing liposomes has been recently reported in literature [14]. Direct homogeneous detection of CT has been also reported based on color changes [15] and fluorescence quenching [16]. In a following attempt to improve the detection sensitivity, sandwiched immunoassay techniques have been developed using a combination of capture antibody and GM1-incorporated liposome probe labeled with fluorescent reagents [17], enzymes [18] and electroactive species [19]; sensitivity has been much enhanced, although the regeneration of the sensor proved problematic in retaining the antibody activity during the elution treatment.

The electrochemical interactions of CT with lipid films have been previously investigated, suggesting high dielectric, ion-permeable perturbations in the monolayers [20]. Notwithstanding, this early system is not suitable for sensor development as the films were formed by the hairbrush technique using a lipid solution prepared in *n*-decade; it is now well known that these lipid films suffer from instability and low reproducibility.

Significant progress has been recently achieved in the design and stabilization of biosensors based on lipid films [21–23], demonstrated in the development of rugged sensors for dopamine and ephedrine [22,23].

The present work describes a miniaturized potentiometric cholera toxin biosensor using GM1 - incorporated lipid films on graphene nanosheets. The results indicate that the proposed lipid platform allows the natural receptor to retain its activity. The sensor exhibited fast response times of ca. 5 min over a wide range of toxin concentrations. Validation studies indicated good reproducibility, reusability, selectivity, long shelf life, nanomolar detection limit and high sensitivity of ca. 60 mV/decade of toxin concentration. The influence of sample matrix components on sensor's response was also investigated using a range of anionic and cationic species at concentrations usually met at waters. The suitability of the sensor developed for assessing lake samples was further verified on CT-spiked lake water samples.

2 Experimental

2.1 Materials and Solutions

Dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC) was purchased from Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA. DPPC was used as lipid for the formation of the films supported on a polymer. The functional monomer, methacrylic acid, and the crosslinker, ethylene glycol dimethacrylate, were both supplied by Aldrich (Aldrich-Chemie, Steinheim, Germany). The initiator, 2,2'-azobis-(2-methylpropionitrile) (AIBN), was supplied by Merck KGaA (Darmstadt, Germany). Cholera toxin (CT) was purchased from Calbiochem (La Jolla, CA) and GM1 was obtained from FIDIA Research Laboratory (Abano Terme, Italy). Water was purified by passage through a Milli-Q car-

tridge filtering system (Milli-Q, Millipore, El Paso, TX, USA) and had minimum resistivity of 18 M Ω cm. All other chemicals were of analytical-reagent grade. The filters and (nominal) pore sizes used were glass microfiber (0.7 and 1.0 μ m, Whatman Scientific Ltd., Kent, UK). The stock solution of cholera toxin in methanol was 1.0 μ M. Dilute aqueous solutions of cholera toxin were prepared daily just before use. Buffer solutions (PBS) were prepared by mixing appropriate volumes of 0.5 M KH₂PO₄ and 0.5 M Na₂HPO₄. All experiments were performed at 25 \pm 1 $^{\circ}$.

Note that CT is potentially hazardous and should be handled with extreme care. Personal protective garments were worn at all times. All surfaces, glassware and other containers used were treated with bleach prior to standard washing. Disposables were placed in biohazard bags and incinerated. Analyte solutions were treated with bleach before disposed of as hazardous waste.

2.2 Fabrication of the Lipid-based Sensor Electrode with Incorporated Receptor on a Graphene Electrode

The graphene electrode has been prepared as previously described [24]. A homogeneous graphene dispersion (ca. 0.4 mg/mL) has been obtained in N-methyl-pyrrolidone (NMP) through mild sonication (using a Bandelin SONOREX Digital 10P sonicator, Sigma-Aldrich, Taufkirchen Germany) for 180 hours and centrifugation at 700 rpm for 2 h [24]. It has been noticed that this increased sonication time is required because the size of the flakes is severely reduced [25,26] which is a critical parameter for several applications [25,26]; in addition to the reduced flake size, long sonication of graphite can also affect the quality of graphene (i.e., number and position of broken-conjugation areas in graphene, so-called graphene atomic- or point-defects, which can affect the electronic properties of graphene; these defects are predominantly located at the edges of the graphene flakes, and the basal plane of the flakes is relatively defect free [27]).

This graphene suspension has been poured onto a copper wire ($d=0.25$ mm) mounted on a glass fiber filter; the evaporation of the organic solvent was carried out using a fan heater. This copper wire has been utilized to establish the connection for the extraction of voltage signals for the calibration curve.

Stabilized lipid films were prepared by polymerization, as previously described in literature [28,29]. The polymerization could take place either by using UV irradiation or thermal polymerization; 5 mg of DPPC were added to a mixture of 0.070 mL of methylacrylic acid, 0.8 mL of ethylene glycol dimethacrylate, 8 mg of 2,2'-azobis-(2-methylpropionitrile), 1.0 mL of acetonitrile. The mixture was sparged with nitrogen for about 1 min and sonicated for 30 min. For the preparation of the stabilized lipid films, 0.15 mL of this mixture was spread on the microfilter. The filter with the mixture was then irradiated using the UV deuterium lamp. Polymerization was completed within 4 hours. Alternatively, the polymerization could

take place by thermal polymerization in 80 °C, but the time of polymerization is longer. These membranes were stable to store in air for periods of more than two months.

GM1 was incorporated in bilayer lipid membranes (BLMs) during polymerization by spreading 10 μL of the receptor suspension along with the polymerization mixture (i.e., for the preparation of the GM1-incorporated lipid films, the microfilter was spread with 0.15 mL of the polymerization mixture and 10 μL of receptor suspension). These electrodes can be used once (and then disposed of) or repetitively (after regenerated – see below); when not in use, they are kept at 4 °C.

The preparation of the potentiometric biosensor concluded after the encapsulation of the filter-supported polymerized lipid film onto the copper wire containing graphene nanosheets (Figure 1). The bioelectrode can be stored at 4 °C when not in use; it remains stable for over three months.

2.3 Electrochemical Measurements

A two electrode system, i.e., the working bioelectrode: stabilized polymeric lipid membrane/graphene, and the reference electrode: (homemade) standard Ag/AgCl, used to measure the potentiometric electrochemical re-

sponse of the fabricated cholera toxin biosensor using a Keithley Electrometer Model 614 (in the voltage mode); the voltage was measured against the reference electrode (Figure 1).

Sensor calibration performed in a stopped-flow mode: CT solutions, at 10- μL or 20- μL aliquots, were injected into the carrier electrolyte (pH=7.0) inflow; the flow stopped for 5 min (adequate time to record the response) and then re-started for sensor regeneration. The flow rate used was 2.0 mL/min.

2.4 Simulated and Real Lake Samples

Seven potential interferents usually met in waters were selected (the tested concentration range for each is shown in parenthesis): Mg^{2+} (8–40 mg/L), Ca^{2+} (30–155 mg/L), HCO_3^- (100–800 mg/L), SO_4^{2-} (50–200 mg/L), Cl^- (100–300 mg/L), NO_3^- (200–800 mg/L), NH_4^+ (10–70 mg/L). Each species was tested individually throughout its stated range and in mixtures on freshly prepared sensors, according to the procedures developed in [24,28,29].

Real water has been obtained from Lake Koumoundourou, located at the western part of Attica region (Chaidari City, Greece), with a well known physicochemical and biological profile [30]. Water has been stored in 4 °C, according to the procedures described in [30]. Fol-

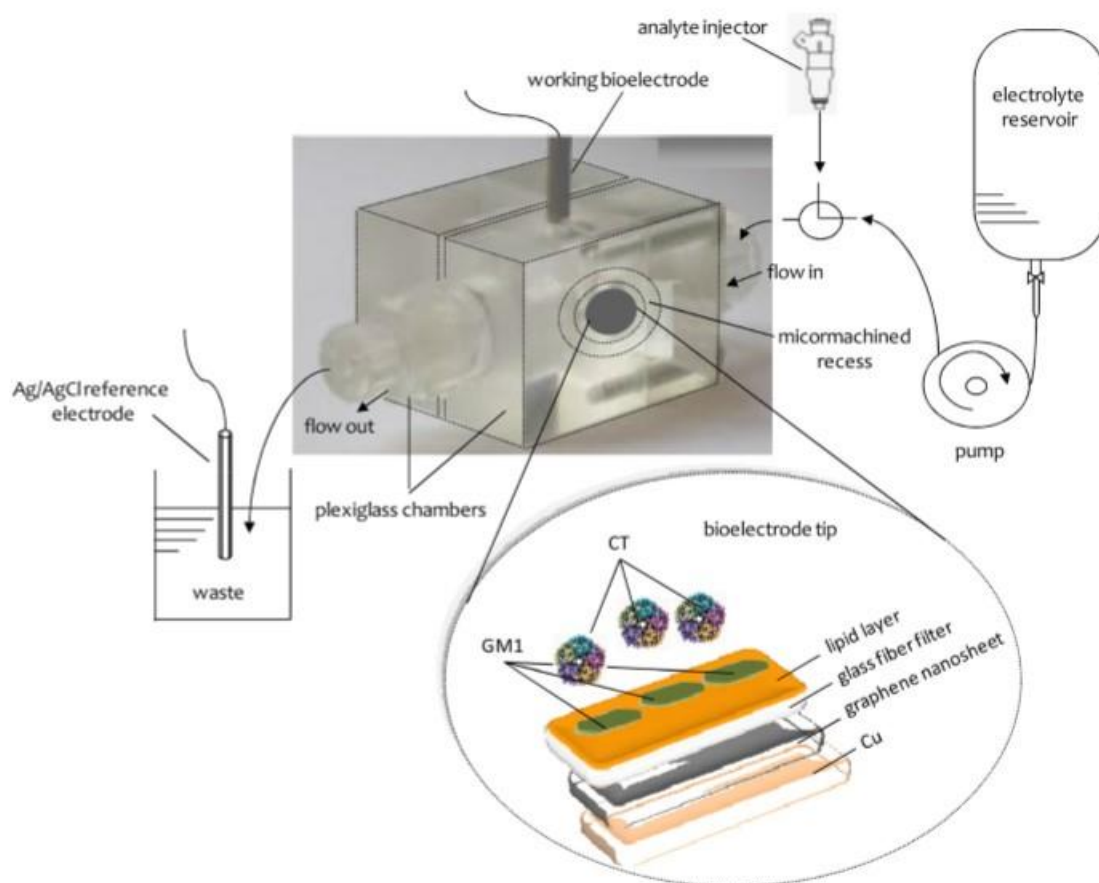


Fig. 1. Schematic of the experimental set-up and the bioelectrode edge surface.

lowing filtration (two times through Whatman filters Grade GF/A: 1.6 μm), ten lake samples were spiked with CT solution; the samples were mixed with phosphate buffer to pH=7.0 and analyzed immediately similarly to the sensor calibration procedure. An unspiked lake sample, treated similarly to the spiked ones, was used as control.

3 Results and Discussions

The preparation of stabilized in the air lipid films for repetitive uses has been reported in literature [29,31] using thermal polymerization 60–80°C. These high temperature profiles prohibited the incorporation of proteinaceous moieties into the lipid film during the polymerization process; to avoid deactivation, enzymes or receptors could be incorporated afterwards. UV polymerization used in the current study permitted the incorporation of the receptor during film construction, allowing, thereby, optimizing receptor loading.

Previous studies with Raman spectroscopy have provided information on the mechanism of polymerization and how the lipid film is attached to the polymer [32]. The lipid is attached to the polymer through electrostatic bonding. A peak at 1690 cm^{-1} (corresponding to the C=O stretching of the methacrylate) was decreased with time, showing that the C=O bond is altered to C–O⁻; this signifies the formation of electrostatic bonding between the C–O⁻ and -NHR₃⁺ of phosphatidylcholine. There was also a shift of the 1176 cm^{-1} peak to 1195 cm^{-1} that showed a strong electrostatic interaction between those two groups. These forces can preserve the film, in structure and function, for multiple uses after storage in air; noticeably, air stabilized films exhibit responses similar to freely-suspended BLMs and can be considered as adequate analogues [28,29].

Graphene nanosheets used herein allowed sensor miniaturization in a facile manner. The electrochemical response of the biosensor has been measured as the potential difference between the working electrode and the reference electrode. A highly stable output has been extracted along with a good linear sensitivity curve over a large dynamic range from 10×10^{-9} M to 10×10^{-6} M at pH 7.0; the coefficient of determination, r^2 , was found to be 0.9992 ($n=30$) (Fig. 2). The detection limit, based on the lowest concentration that could be reliably ($S/N=3$) measured, was 1 nM. The sensor exhibited an excellent sensitivity slope curve with the value of ~ 60 mV per decade confirming the enhancement in the potential value near the surface of the biosensor as the concentration of the analyte increases. The high sensitivity achieved can be attributed to the high surface to volume ratio of graphene nanosheets. The variability of the measurement, as relative standard error (5.95% confidence limit), was found to be ± 3.8 –4.4%, ($n=40$, on the same sensor, analyst and day) and 4.6–5.2% ($n=30$, on different days with newly constructed sensors and different analysts).

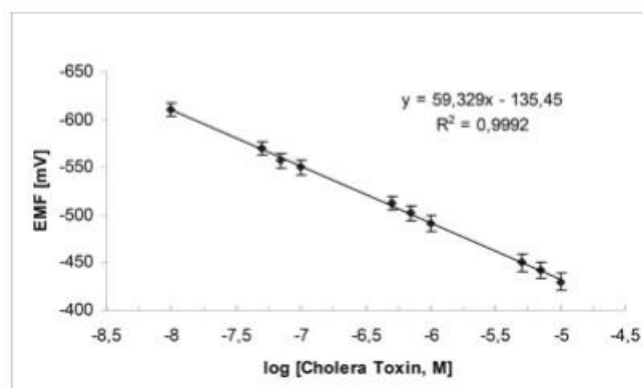


Fig. 2. Calibration curve for CT detection using the miniaturized potentiometric cholera toxin sensor: GM1 receptor incorporated in polymerized lipid films on graphene nanosheets. Experimental conditions: pH 7.0 (PBS); Temperature: 25°C; CT concentration range: 10×10^{-9} M to 10×10^{-6} M; responses obtained at stop flow mode; reference electrode: Ag/AgCl. Error bars denote standard deviation ($n=3$).

Preliminary investigations on the response of the sensor to CT in the absence of a receptor, indicated a poor output with a sensitivity slope of ~ 3 mV per decade of concentration, over a concentration range of 1×10^{-6} M to 1×10^{-3} M (at pH=7). Thus, it is evident that non-specific binding is not a critical issue in the reliability of measurements of the sensor developed.

Recent studies in the association-dissociation kinetics of cholera toxin binding to GM1 revealed that high GM1 concentrations lead to slow CT association kinetics [11]; total internal reflection fluorescence and atomic force microscopy in supported phospholipid membranes [3] directly showed that high molar GM1 densities inhibit CT binding due to ganglioside clustering at the film's surface. Thus, the variation of GM1 density on the sensor was considered in this work as a signal optimization option. Various amounts of GM1 were tested up to 10% w/w of lipid concentration. This largest signal recorded was achieved for ratios of lipid to GM1 of 20:1, i.e., 5% w/w GM1 to lipid concentration; nonetheless, larger amounts of GM1 have caused a slight instability of the lipid film.

The response times recorded herein (i.e., 5 min) are in good agreement with values reported in literature [10,18,19], whereas optimum pH values for CT-GM1 binding range between 7–8.5, depending on GM1 density [3,10] and GM1 to CT molar ratios [8,9]. The effect of pH on sensor's response towards a CT concentration of 100 nM is provided in Fig. 3. The maximum response was obtained at pH 7.0, whereas at higher values response decreased dramatically. At lower pH values, CT binding to GM1 is inhibited [10]; the weak response obtained at pH is probably due to CT aggregation at the film surface [33].

Mixed lipid bilayer/GM have shown that the polar GM~ head group has a maximal extension of 15 Å from the center of the phosphocholine (PC) group at the membrane surface and that the carboxylate group of the sialic

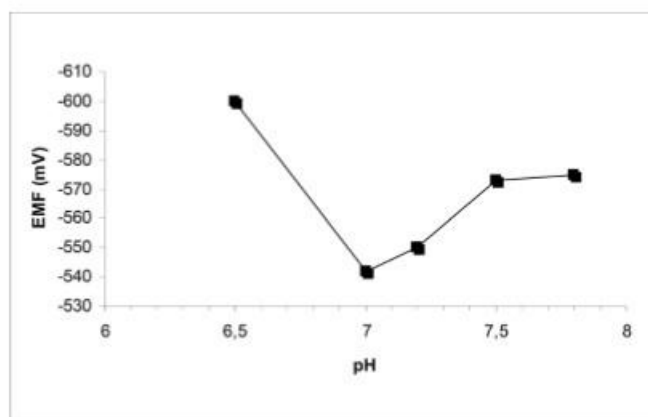


Fig. 3. The response of the miniaturized sensor to 1×10^{-7} M CT over the pH range 6.5–7.8 (PBS).

acid moiety is located 10 \AA from the PC. The binding of CT to GM1 results in a substantial reorganization of the lipid membrane structure [11].

The insertion of partially charged protein parts into the lipid membrane and the structural changes in the lipid layer induce a change of the membrane electrostatics (i.e., capacitance); CT is bound to the lipid membranes with the A subunit oriented away from the membrane surface in an edge-on adsorption mode. This will result in alterations of membrane potential difference that is been measured using our present system. Cholera toxin has an isoelectric point (pI) of 6.6. Chromatographic properties, however, suggest that a cationic surface is exposed at pH 7.0, which apparently resides in B subunit [3]; this is in agreement with our obtained results that the optimum pH is at a value of pH level of 7.0.

The use of stabilized filter-supported BLMs in toxin detection provides a measuring system in which the receptor, bound onto the lipid membrane, interacts with the toxin reversibly. GM1 locks its structure in place after CT binding, becoming firmer [3]; the interaction is reversible albeit its slow dissociation kinetics that depend on CT to GM1 molar ratios and the lipid film density of GM1 [9, 11, 17, 18, 20]. Sensor reversibility has been extensively studied herein. Fast and (to certain extend) efficient approaches to lipid platform regeneration involve mild acids, detergents or chaotropic agents [34, 35]. Regenerating, however, the sensor while retaining its sensing capabilities is not an easy task. Acidic conditioning may disrupt membrane structure and induce the formation of ion channels. Chaotropic agents generally disrupt biological complexes at a high chance of irreversibly denaturing proteinaceous moieties [36]. Detergents may cause membrane solubilization through a multi-step process that involves transmembrane lipid motion (flip-flop), breakdown of the membrane permeability barrier (leakage), and reassembly or lysis [37].

Regeneration of the sensor can be made by infinite dilution allowing dissociation to occur by mass action. This method is easily implemented by the use of the continu-

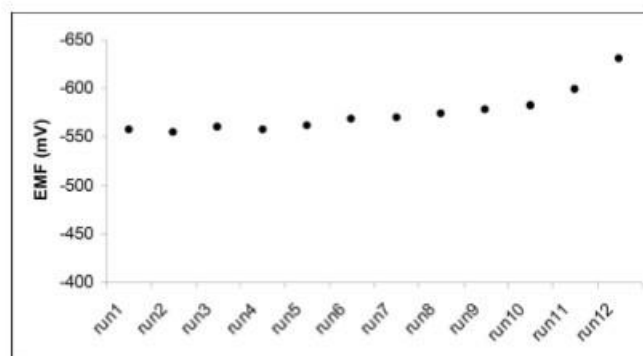


Fig. 4. Sensor response to repetitive injections of 7×10^{-8} M CT (pH=7.0); after each response (recorded at 5-min stop flow mode), the sensor was regenerated at 2.0 ml/min flow rate for 6 min before the next CT injection.

ous flow system in which the dissociated toxin is continuously removed and prevented from re-associating with the receptor. The effect of the flow rate on both, platform regeneration and receptor washing off, has been studied herein. The results indicated that at flow rates higher than 2.5 ml/min, the sensor's signal returned to background (noise) level within 2–5 minutes; the higher the flow rate, the faster the regeneration. Some loss of the receptor has been observed, however, particularly evident after the third washing cycle (as decline of sensor response). At flow rates lower than 2.5 ml/min, platform regeneration required more time to conclude (reaching 12 min at a flow rate of 1.0 ml/min); yet no receptor desorption has been observed. The optimum regeneration flow rate has been set to 2.0 ml/min for 6 minutes.

The maximum number of experiments that could be performed, within the accuracy level set during sensor calibration, was about 10, given that the potential difference and not the absolute value of the potential is recorded (Figure 4). The sensor drifts for larger number of injections, possibly due to receptor detachment from the lipid film.

4 Application in Simulated and Real Water Samples

The suitability of the sensor developed for assessing the quality of waters has been investigated using simulated samples with varying levels of seven potential interferents (the tested concentration range for each is shown in parenthesis): Mg^{2+} (8–40 mg/L) Ca^{2+} (30–155 mg/L), HCO_3^- (100–800 mg/L), SO_4^{2-} (50–200 mg/L), Cl^- (100–300 mg/L), NO_3^- (200–800 mg/L), NH_4^+ (10–70 mg/L). These ions have been selected as they are expected to be found in waters (at various concentration levels and composition); minimum and maximum concentrations are in accordance with the seasonal variation observed for Lake Koumoundourou [30]. Each species was tested individually throughout its stated range and in mixtures on freshly prepared sensors. No significant interferences were noticed from the presence of these compounds, either indi-

vidually or in mixtures; at all cases the relative error did not exceed 5%.

Water from Koumoundourou Lake has provided an appropriate real sample matrix for testing the applicability of the sensor for environmental samples. The microbiological and chemical quality of the lake has been previously investigated, confirming the absence of bacterial toxins [30]. Water has been filtered and divided in ten aliquots; each aliquot was spiked with toxin solution to required contamination level and mixed with phosphate buffer to pH=7.0. Five samples have been used as low-level control, with a CT concentration of 50 nM, and the remaining five as high-level control, with a CT concentration of 7 μ M. Unspiked water, treated similarly to the spiked samples, provided no measurable response from the sensor.

All samples were analyzed immediately after preparation on the same sensor, using the calibration plot presented in Fig. 2 and the 6-min regeneration scheme described above. The results from the analyses of the spiked lake samples are presented in Table 1, as % apparent re-

Table 1. Cholera toxin detection in lake water spiked samples with the potentiometric minisensor based on GM1 - incorporated lipid films on graphene nanosheets

CT Contamination level	apparent recovery (% , observed value/reference value)	
Low (5×10^{-8} M)	#1	92.14
	#2	105.7
	#3	92.85
	#4	104.1
	#5	96.33
High (7×10^{-6} M)	#6	102.8
	#7	98.84
	#8	96.63
	#9	101.1
	#10	97.26

covery [38]. Recovery ranged between 92–106% for the low concentration and 96–103% for the high concentration. According to the 2005 ICH guidelines for analytical validation Q2(R1), apparent recoveries of 80–115% are acceptable; values greater than 100% are the expected positive side from a typical distribution of analytical results from analytes present at or near 100% that are balanced by equivalent results on the negative side of the mean.

The high recoveries achieved at the present study indicate an almost complete mass balance of the recovery analyte, i.e., a good alignment of spiked toxin concentration and calibration. No positive or negative trends, indicative of standard errors, were observed at both CT levels. These results verify the analytical development data, thereby proving the suitability of the minisensor for repetitive water monitoring.

5 Conclusions

The present paper describes the preparation of a novel minisensor, based on a polymer stabilized lipid film and an incorporated natural receptor packed on graphene nanosheets. The sensor exhibits long shelf life and adequate operational stability for environmental analysis, whereas it is constructed in a three-step, amenable to commercialization, routine: (i) preparation of graphene electrode, (ii) lipid film UV polymerization and receptor incorporation, and (iii) encapsulation of the lipid film onto the graphene electrode. The sensor has been successfully validated for cholera toxin detection in water; the results indicate that the GM1-cholera toxin interactions employed herein might serve as a suitable model for developing detection schemes for other receptor-mediated toxin uptake, such as *E.coli*, *Clostridium*, *Shigella* or *Pertussis* toxins. GM1 receptor can also serve for *E.coli* toxin detection, whereas polysialic gangliosides might be more appropriate for other toxins [3–5].

The method offers fast response times (~5 min) and nanomolar detection levels without significant interference from other water constituents. The limit of detection in the proposed method is 1.0 nM which is comparable or lower to most biosensor systems reported in literature, e.g., the piezoelectric membrane sensor has a detection limit of 2.5 nM and similar response times [14], whereas immunosensing can provide nanomolar detection within 5–8 min at very complex and tedious assay platforms [17–19]. The color detection scheme proposed in [15] exhibits a detection limit of 54 nM and a response time of 10 minutes. The SPR CT biosensor reported in [13] exhibits a detection limit of 1×10^{-14} M at optimized conditions, although the time of response is 15 min; similarly, the fluorescence quenching platform proposed in [16] provides a 10 pM detection limit at a response time of 30 min. A detection limit of 0.06 micromolar has been previously reported for a similar lipid membrane platform [39], although bioelectrode regeneration or real water applicability has not been established. Limits of detection of as low as 45.6 ng/mL were recently reported in the literature [40]. However, the thin lipid biosensor platforms proposed herein can be easily engineered into portable field detectors for onsite alarm monitoring.

The biosensing surface can be easily and reproducibly prepared and renewed. The lipid membrane interface at the biosensing surface provides a biocompatible environment that has proven beneficial in resisting nonspecific adsorption of anionic and cationic species, thus ensuring a low background signal in the assay. The proposed sensor reveals good reproducibility, reusability and selectivity along with high sensitivity of ca. ~60 mV/decade over a wide logarithmic range of cholera toxin concentrations ranging from 10×10^{-9} M to 10×10^{-6} M. Notwithstanding, further experiments are required for sensor validation, utilizing field protocols for water quality assessment through a pilot-scale study that would also provide data on the reliability of the sensor.

The CT detection technique developed offers certain advantages over the commonly preferred immunoassay approaches: (a) the incorporation of the receptor in the lipid membrane platform is performed through a simple polymerization step avoiding any activity loss; (b) the receptor binds rapidly to CT with strong affinity that allows rapid detection; (c) the sensor can be easily and reliably regenerated in a flow system without receptor leakage or memory effects. In effect, the proposed scheme can be easily packed into a portable field detector for rapid water quality preliminary assessment for life-threatening contaminants and bioterrorism attacks.

References

- [1] P. H. Fishman, *J. Membrane Biol.* **1982**, *69*, 85.
- [2] B. J. Wisniesky, J. S. Bramhall, *Nature (London)* **1981**, *289*, 389.
- [3] I. Basu, C. Mukhopadhyay, *Langmuir* **2014**, *30*, 15244.
- [4] A. T. Brunger, A. Rummel, *Toxicon* **2009**, *54*, 550.
- [5] W. I. Lencer, D. Saslow, *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1746*, 314.
- [6] M. Alam, N. A. Hasan, M. Sultana, G. Balakrish Nair, A. Sadique, A. S. G. Faruque, H. P. Endtz, R. B. Sack, A. Huq, R. R. Colwell, H. Izumiya, M. Morita, H. Watanabe, A. Cravioto, *J. Clin. Microbiol.* **2010**, *48*, 3918.
- [7] M. Zayats, O. A. Raitman, V. I. Chegel, A. B. Kharitonov, I. Willner, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 4763.
- [8] C. R. Taitt, G. P. Anderson, B. M. Lingerfelt, M. J. Feldstein, F. S. Ligler, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 6114.
- [9] M. M. Ngundi, C. R. Taitt, F. S. Ligler, *Biosens. Bioelectron.* **2006**, *22*, 124.
- [10] J. Shi, T. Yang, S. Kataoka, Y. Zhang, A. J. Diaz, P. S. Cremer, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 5954.
- [11] S. Terrettaz, T. Stora, C. Duschl, H. Vogel, *Langmuir* **1993**, *9*, 1361.
- [12] M. I. Fisher, T. Tjærnhage, *Biosens. Bioelectron.* **2000**, *15*, 463.
- [13] K. S. Phillips, J. H. Han, M. Martinez, Z. Z. Wang, D. Carter, Q. Cheng, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 596.
- [14] H. Chen, Q.-Y. Hu, Y. Zheng, J.-H. Jiang, G.-L. Shen, R.-Q. Yu, *Anal. Chim. Acta* **2010**, *657*, 204.
- [15] C. L. Schofield, R. A. Field, D. A. Russell, *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 1356.
- [16] X. D. Song, J. Shi, B. I. Swanson, *Anal. Biochem.* **2000**, *284*, 35.
- [17] K. A. Edwards, J. C. March, *Anal. Biochem.* **2007**, *368*, 39.
- [18] L. Alfonta, I. Willner, D. J. Throckmorton, A. K. Singh, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 5287.
- [19] S. Viswanathan, L. C. Wu, M. R. Huang, J. A. Ho, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 1115.
- [20] I. R. Miller, H. Vinkler, E. Yavin, *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1989**, *22*, 365.
- [21] D. P. Nikolelis, M. Mitrokotsa, *Biosens. Bioelectron.* **2002**, *17*, 565.
- [22] D. P. Nikolelis, D. A. Drivelos, M. G. Simantiraki, M. G. S. Koinis, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 2174.
- [23] D. P. Nikolelis, N. Psaroudakis, N. Ferderigos, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 3217.
- [24] D. P. Nikolelis, G. Raftopoulou, G.-P. Nikoleli, M. Simantiraki, *Electroanalysis* **2006**, *18* (24), 2467.
- [25] A. Ciesielskia, P. Samorì, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 381.
- [26] F. Hennrich, R. Krupke, K. Arnold, J. A. R. Stutz, S. Lebedkin, T. Koch, T. Schimmel, M. M. Kappes, *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 1932.
- [27] M. Lotya, Y. Hernandez, P. J. King, R. J. Smith, V. Nicolosi, L. S. Karlsson, F. M. Blighe, S. De, Z. M. Wang, I. T. McGovern, G. S. Duesberg, J. N. Coleman, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 3611.
- [28] D. P. Nikolelis, N. Ntanos, G.-P. Nikoleli, K. Tampouris, *Protein Peptide Lett.* **2008**, *15*, 789.
- [29] D. P. Nikolelis, T.-I. Chaloulakos, G.-P. Nikoleli, N. Psaroudakis, *Talanta* **2008**, *77*, 786.
- [30] E. Dimitriou, I. Karaouzas, K. Sarantakos, I. Zacharias, K. Bogdanos, A. Diapoulis, *J. Environ. Manage.* **2008**, *88*, 526.
- [31] G.-P. Nikoleli, M. Q. Israr, N. Tzamtzis, D. P. Nikolelis, M. Willander, N. Psaroudakis, *Electroanalysis* **2012**, *24* (6), 1285.
- [32] G.-P. Nikoleli, Z. H. Ibupoto, D. P. Nikolelis, V. Likodimos, N. Psaroudakis, N. Tzamtzis, M. Willander, T. Hianik, *Cent. Eur. J. Chem.* **2013**, *11*, 1554.
- [33] M. J. De Wolf, G. A. Van Dessel, A. R. Lagrou, H. J. Hilderson, W. S. Dierick, *Biochemistry*, **1987**, *26*, 3799.
- [34] T. Shahal, K. A. Melzak, C. R. Lowe, E. Gizeli, *Langmuir* **2008**, *24*, 11268.
- [35] A. Olaru A, M. Gheorghiu, S. David, C. Polonschii, E. Gheorghiu, *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *45*, 77.
- [36] D. P. Nikolelis, C. G. Siontorou, V. G. Andreou, K. G. Viras, U. J. Krull, *Electroanalysis* **1995**, *7*, 1082.
- [37] H. Ahyayauch, M. Bennouna, A. Alonso, F. M. Goñi, *Langmuir* **2010**, *26*, 7307.
- [38] D. T. Burns, K. Danzer, A. Townshend, *Pure Appl. Chem.* **2002**, *74*, 2201.
- [39] G.-P. Nikoleli, D. P. Nikolelis, N. Tzamtzis, *Electroanalysis* **2011**, *23*, 2182.
- [40] N. Bunyakul, C. Promptmas, A. J. Baeum, *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, *407*, 727.

Received: December 4, 2015

Accepted: January 25, 2016

Published online: February 24, 2016

Δημοσίευση στο περιοδικό Sensors



Article

Label-Free and Redox Markers-Based Electrochemical Aptasensors for Aflatoxin M1 Detection

Stefanos Karapetis ^{1,2} , Dimitrios Nikolelis ³ and Tibor Hianik ^{1,*}

¹ Department of Nuclear Physics and Biophysics, Comenius University, Mlynska dolina F1, 842 48 Bratislava, Slovakia; stevekara@chem.uoa.gr

² Laboratory of Inorganic & Analytical Chemistry, School of Chemical Engineering, Department of Chemical Sciences, National Technical University of Athens, 9 Iroon Polytechniou St., 157 80 Athens, Greece

³ Laboratory of Environmental Chemistry, Department of Chemistry, University of Athens, Panepistimiopolis-Kouponia, 157 71 Athens, Greece; dnikolel@chem.uoa.gr

* Correspondence: tiber.hianik@fmph.uniba.sk; Tel.: +421-2-6029-5683

Received: 10 November 2018; Accepted: 27 November 2018; Published: 1 December 2018



Abstract: We performed a comparative analysis of the sensitivity of aptamer-based biosensors for detection mycotoxin aflatoxin M₁ (AFM1) depending on the method of immobilization of DNA aptamers and method of the detection. Label-free electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and differential pulse voltammetry (DPV) for ferrocene labeled neutravidin layers were used for this purpose. Amino-modified DNA aptamers have been immobilized at the surface of polyamidoamine dendrimers (PAMAM) of fourth generation (G4) or biotin-modified aptamers were immobilized at the neutravidin layer chemisorbed at gold surface. In the first case the limit of detection (LOD) has been determined as 8.47 ng/L. In the second approach the LOD was similar 8.62 ng/L, which is below of allowable limits of AFM1 in milk and milk products. The aptasensors were validated in a spiked milk samples with good recovery better than 78%. Comparative analysis of the sensitivity of immuno- and aptasensors was also performed and showed comparable sensitivity.

Keywords: biosensors; aflatoxin M1; aptasensors; electrochemical impedance spectroscopy; differential pulse voltammetry

1. Introduction

One of the main toxic factors in dairy products is the concentration of mycotoxins, which are secondary metabolites produced by organisms of the fungus kingdom [1]. They can cause diseases and even deaths either in humans or in animals [2]. The term “mycotoxin” is usually intended for the toxic chemical products of fungi. The fungi consume organic matter where humidity and temperature are adequate. If the conditions are appropriate, fungi proliferate into colonies and mycotoxin levels become high. The reason for the production of mycotoxins is not yet known [3].

The major groups of mycotoxins are the aflatoxin, ochratoxin, citrinin, ergot alkaloids, patulin and fusarium. In this work we focused on development of biosensor for detection aflatoxin M1 (AFM1), which is important pollutant of dairy products. Aflatoxin M1 is the natural metabolite of aflatoxin B1 (AFB1). Its presence in feed and the subsequent exposure of lactating animals lead to the contamination of milk by its hydroxylated metabolite, AFM1 [4,5]. Therefore, fresh milk must be regularly checked for the concentration level of AFM1. If the concentration of AFM1 is above 0.05 µg/kg (0.15 nM), or 0.5 µg/kg (1.5 nM) (according to EU or USA regulations, respectively), this milk cannot be used in the human food chain. This limit is even lower (0.025 µg/kg or 0.08 nM) for infant milk, follow-on milk, and dietary foods for infants [6].

The commercially used methods for AFM1 determination are mostly based on high-performance liquid chromatography (HPLC) [7], which advantageously substituted the thin layer chromatography technique (TLC) [8]. Enzyme-Linked Immunosorbent assay (ELISA) has become also very popular for mycotoxin analysis, leading to the development of many commercially available kits, which are essentially based on competitive assays [8]. Although the abovementioned techniques allowing detection of AFM1 with the required sensitivity and selectivity, they are rather expensive, time consuming and require qualified staff.

Biosensor technology can overcome the abovementioned difficulties. For instance, some biosensors in contrast with ELISA allow label-free detection of the analyte. Most of the biosensors for aflatoxin detection reported so far use one of two types of receptors as recognition elements—antibodies and DNA aptamers. Immunosensors are based on the immobilization of specific monoclonal antibodies on various surfaces. DNA (or RNA) aptamers represent a new alternative to expensive and less stable antibodies. Aptamers are single stranded DNA or RNA that in solution folds into a 3D structure with a binding site specific to the analyte. Aptamers are produced *in vitro* by the Systematic Evolution of Ligands with Exponential enrichment (SELEX) method using affine chromatography separation of randomly synthesized sequences [9,10]. The specificity of aptamers to the analyte is comparable with those of antibodies, but aptamers are more stable, easier to immobilize on surfaces and easier to modify chemically.

The main problems of immunosensors are the elevated cost of antibodies and in the ethical issues, as immunoglobulins are produced through animal immunization. Among potential recognition element alternatives, aptamers have been proposed as very promising tools in biosensing applications owing to their many advantages such as cost effectiveness, flexibility, ease of modification, high stability, and compatibility with large-scale production [11].

The first electrochemical immunosensor for AFM1 detection was reported by Micheli et al. [12]. In this work the design of the sensor was adopted from ELISA, but AFM1 specific antibodies were immobilized directly on screen-printed electrodes. The secondary antibody conjugated with horse radish peroxidase (HRP) was used for chronoamperometric detection of AFM1 with a detection limit of 25 ppt (25 ng/L) and a working range between 30 and 160 ppt. This range was comparable with those of ELISA, but the detection time was shorter. Vig et al. described an impedimetric immunosensor based on gold-labeled antibodies. This sensor detected AFM1 in a concentration range between 15 and 1000 ng/L (45 pM–3 nM) [13]. A competitive immunoassay based on antibodies immobilized on a gold microelectrode array and horseradish peroxidase (HRP)-AFM1 conjugate has been reported by Parker et al. [14]. The assay allows detection of AFM1 with a LOD of 8 ng/L in a dynamic range of 10 to 100 ng/L.

More recently, an indirect competitive immunoassay has been elaborated with a screen-printed electrode array adapted with a standard 96-well microplate for the analysis of frozen and lyophilized milk [15]. Paniel et al. detected AFM1 with a sensor that was based on a competitive immunoassay using HRP-AFM1 conjugate as a tag [16]. The samples containing AFM1 were incubated with a fixed amount of antibody and HRP-AFM1 tracer until the system reached equilibrium. The sensor allowed detection of AFM1 with LOD 10 ng/L. Bacher et al. reported a label-free impedimetric immunosensor based on a silver wire electrode that allows the detection of AFM1 within the range 6.25–100 ng/L (18.75 pM–0.3 nM), with a LOD of 1 ng/L (3 pM) [17].

In the last years an immunochromatographic strip with monoclonal antibodies was described for sensitive AFM1 detection in pasteurized and powdered milk [18]. Later, an electrochemical immunosensor with capture antibodies immobilized on the Au screen-printed electrode and signaling antibodies conjugated with alkaline phosphatase was tested in spiked milk samples with a LOD of 37 ng/L [19]. Chalyan et al. developed a sensing device that consisted of four silicon oxynitride (SiON) micro-ring resonators that detected AFM1 with off-chip silicon photodetectors onto which either DNA aptamers or antigen binding fragments (Fab') were immobilized [20]. The most reproducible signal

was obtained for sensors based on a Fab'-functionalized surface with a LOD of 5 nM (1641 ng/L). Immunosensors for AFM1 detection have been recently reviewed [21–24].

The first electrochemical aptasensor for AFM1 detection was reported by Nguyen et al. [25]. The sensor design was based on an interdigitated electrode array (IDA) fabricated on a silicon substrate via a lithography technique. Silicon wafers were covered with a SiO₂ layer. Chromium (Cr) and platinum (Pt) layers were sputtered on the top of the wafer. After electropolymerization with Fe₃O₄/PANi, the aptamers were immobilized on this layer and detection of AFM1 was performed by differential pulse voltammetry (DPV). The sensor allowed detection of AFM1 with LOD 1.98 ng/L in the range of 6–60 ng/L. AFM1 has been also detected by square wave voltammetry (SWV) using an aptamer-based biosensor designed with a streptavidin layer coated by biotinylated aptamers with a dynamic range of 1–10⁵ ppt [26]. Later an impedimetric aptasensor designed with a 4-carboxy-phenyldiazonium salt surface on screen-printed electrodes (SPCE) has been proposed by Istamboulie et al. [27]. The working range of this sensor was 2–150 ng/L with a LOD of 1.15 ng/L.

The latest works described an AFM1 sensitive aptasensor based on a glassy carbon electrode (GCE) covered with polymeric Neutral Red dye (NR) obtained by electropolymerization in the presence of a polycarboxylated pillar[5]arene derivative [28]. In this case the detection of AFM1 was performed using electrochemical impedance spectroscopy (EIS) in a dynamic range of 15–120 ng/L (LOD 0.5 ng/L). An optical label-free aptasensor using total internal reflection ellipsometry (TIRES) combined with a localized surface plasmon resonance (LSRP) phenomenon in nanostructured gold films immobilized with specific aptamers was reported [29]. The working range was 10 ng/L–100 µg/L and the LOD 10 ng/L. Jalalian et al. also reported a novel electrochemical aptasensor based on a hairpin-shaped aptamer, gold nanoparticles (Au-NPs) and a complementary strand of the aptamer (CS). The DPV allowed detecting AFM1 in the range of 2–600 ng/L with a LOD of 0.9 ng/L [30]. Recent achievements in electrochemical DNA sensors and available techniques have been reviewed by Fojta et al. [31].

Among alternative methods of detection, it is worth mentioning a biosensor based on a metal-supported bilayer lipid membrane (s-BLM) [32]. It has been shown that AFM1 affected hybridization of DNA at the surface of s-BLM, which was recorded as changes of the displacement current. The LOD obtained by this approach was 0.5 nM of AFM1 in a working range of 1.9–20.9 nM.

In aptasensors the sensitivity and dynamic range depend on the method of aptamer immobilization as well as on the signal detection method. However, a comparative analysis of the effects of the aptamer immobilization and the method of detection has not been reported yet. In this work we present electrochemical sensors based on two methods of aptamer immobilization on a surface composed either of dendrimers or neutravidin. Impedance spectroscopy (EIS) and differential pulse voltammetry (DPV) have been used for the detection of AFM1 with aptamers.

2. Materials and Methods

2.1. Reagents and Aptamers

Aflatoxin M1 (AFM1, m.w. 328.27 Da) from *Aspergillus flavus*, cystamine dihydrochloride 96% (Cys), sodium borohydride NaBH₄, glutaraldehyde solution in H₂O 25% (GA), poly(amido-amine) dendrimers generation 4.0, 10 wt.% in methanol (PAMAM G4), 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC), N-hydroxysuccinimide (NHS), potassium hexacyanoferrate(II) trihydrate K₄Fe(CN)₆·3H₂O, potassium ferricyanide(III) K₃Fe(CN)₆, ferrocene carboxylic acid, Fc-COOH, tablets for preparation of phosphate buffer saline (PBS) as well as other standard chemicals were of p.a. grade and purchased from Sigma-Aldrich, (Schnelldorf, Germany). Neutravidin (NA) was supplied by Biotech (Bratislava, Slovakia). Sulfuric acid 96% H₂SO₄, hydrogen peroxide 30% H₂O₂, and ethanol, p.a. grade were from Slavus (Bratislava, Slovakia).

We used following buffers: PBS (137 mM NaCl, 27 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH = 7.4) and HEPES 10 mM pH 7.4.

Following aptamers were used in experiments: 21-mer DNA aptamer of following sequence: 5'-ACT GCT AGA GAT TTT CCA CAT-3' (APT1) described by Nguyen et al. [25] and modified at the 5' end by an amino group or by biotin at the 5' end, but containing a dT₁₅ spacer: 5'-TTT TTT TTT TTT TTT ACT GCT AGA GAT TTT CCA CAT-3' (APT2) and 50-mer DNA aptamer modified by biotin at the 5' end: 5'-GTT GGG CAC GTG TTG TCT CTC TGT GTC TCG TGC CCT TCG CTA GGC CCA CA-3' (APT3) [20,33] that is characterized by high specificity to AFM1 (dissociation constant $K_d = 10$ nM). Aptamers were purchased from Eurogentec (Seraing, Belgium). For preparation of stock solution of aptamers, we used TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH = 8) based on DNase-free water (Sigma-Aldrich Schnellendorf, Germany). The working solutions of aptamers were prepared by dilution of the abovementioned stock solution in a corresponding working buffer.

2.2. Preparation of Aptasensors

The aptasensors were prepared using gold electrodes of 2 mm diameter (CH Instruments, Austin, TX, USA). The electrodes were carefully cleaned according to the procedure described earlier [34,35]. The gold surface was polished using an electrode-polishing kit consisting of 1.0 and 0.3 μm alumina powder (CH Instruments) and then sonicated for 15 min in ethanol followed by 20 successive cycles of electrochemical cleaning in 1 M H₂SO₄ in the potential range from +0.2 to +1.5 V vs. Ag/AgCl reference electrode with a scan rate of 100 mV/s. After that the electrodes were properly rinsed again in deionized water, ethanol and dried under nitrogen and the immobilization started immediately.

2.2.1. Aptasensors Based on Immobilization Aptamers at Dendrimer Modified Surface

The preparation of an aptasensor on a dendrimer surface was adopted from our previous work [35]. Briefly, after cleaning the gold surface, the electrode was immersed in 0.1 M aqueous solution of cystamine for 2 h. This resulted in formation of a self-assembled cystamine layer due to chemisorption. After careful cleaning of the surface in deionised water it was immersed in 5% glutaraldehyde (GA) in water for 1 h, rinsed with PBS and incubated with 70 μM PAMAM G4 dendrimers in PBS buffer for 5 h. The unreacted groups of GA were blocked by immersion of the electrode in 5 mM NaBH₄ during 30 min. The electrode has been then rinsed in PBS and again immersed into 5% GA solution for 1 h. This surface was ready for immobilization of amino-modified APT1. For this purpose, the electrode was immersed in 1 μM APT1 dissolved in PBS for 16 h and then again in 5 mM NaBH₄ for 30 min. After rinsing the surface by PBS the aptasensor was used for AFM1 detection.

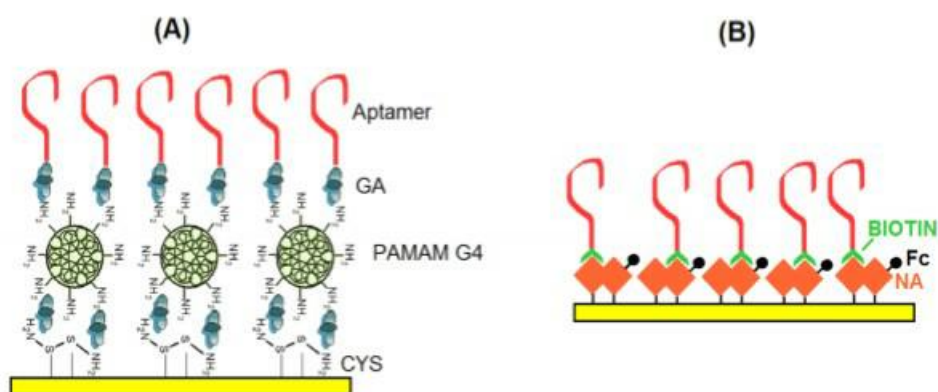


Figure 1. The schemes of aptasensors: (A) aptamers are immobilized at the surface of PAMAM G4 dendrimers. (B) biotinylated aptamers are immobilized at the neutravidin (NA) layer modified by ferrocene carboxylic acid (Fc). GA—glutaraldehyde, CYS—cystamine.

The sensing surface scheme is presented in Figure 1A. The AFM1 detection was performed using electrochemical impedance spectroscopy in the presence of 5 mM redox couple $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. It is based

on determination of the charge transfer resistance R_{ct} that changes in the presence of an analyte. This is known approach that was used in previous aptasensor research (see [36] and Section 2.3 for details).

2.2.2. Aptasensors Based on Biotinylated Aptamers Immobilized on Neutravidin Layers

These aptasensors were prepared using DNA aptamers (APT2 or APT3) modified at the 5' end with biotin and immobilized on a neutravidin layer chemisorbed at the surface of gold electrodes. This is based on the strong affinity of biotin for neutravidin. In order to detect AFM1 electrochemically the neutravidin layer was modified by ferrocenecarboxylic acid (Fc-COOH), that displays well-resolved redox signals. The scheme of the sensing layer is presented in Figure 1B. The aptasensor has been prepared using the following steps. First a clean gold electrode was immersed in neutravidin dissolved in deionised water at a concentration of 125 $\mu\text{g/mL}$ for 15 min. This is the common way to prepare a stable neutravidin layer on a gold surface [37]. After rinsing in deionised water the electrode with the neutravidin layer was immersed in a solution containing activated Fc-COOH for 2 h. The activation has been performed according to the procedure described in [38]. Briefly, 20 nM Fc-COOH has been added into the mixture of 1 mM EDC and 5 mM NHS for 15 min. Activated Fc-COOH was prepared freshly before its immobilization at neutravidin layer. Addition of activated Fc-COOH onto the neutravidin layer resulted in its strong binding to NA molecules. After rinsing the ferrocene-neutravidin layer with deionized water and PBS the electrode was immersed in a 1 μM solution of biotinylated aptamer for 30 min. After rinsing with PBS, the sensor was ready for AFM1 detection. The detection was based on measurement of the ferrocene redox current. It can be expected that in the presence of AFM1 the environment close to the sensing surface changes which may affect the redox current. This approach has been used in this work for the first time, although similar principle was applied in our recent work [28]. In this case, however instead of Fc we used redox properties of electropolymerized layers formed by Neutral Red. In all cases the detection of AFM1 was accomplished by immersion of the sensor into the AFM1 solution in a concentration range of 15–120 ng/L. The sensor was incubated with corresponding concentration of AFM1 during 1 h at ambient temperature (approx. 22 °C).

2.3. Electrochemical Measurements

2.3.1. Instrumentation

The electrical parameters of aptasensors were determined by an AUTOLAB PGSTAT12 potentiostat-galvanostat equipped with a FRA impedance module (Metrohm Autolab b.v., Herisau, Switzerland) or a CHI 440 potentiostat (CH Instruments) in a 8 mL Teflon cell using three electrode configuration consisting in working gold electrode (diameter 2 mm), Ag/AgCl reference electrode and Pt wire as auxiliary electrode. All electrodes were from CH Instruments. The sensor response following addition of AFM1 was measured by electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and differential pulse voltammetry (DPV) with the following parameters. EIS: frequency range from 0.1 Hz to 100 kHz by applying 5 mV voltage amplitude and DC potential 0.22 V. EIS experiments were performed in PBS containing 5 mM (1:1) $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Data from Nyquist plots were fitted according to Nova software version 1.7 (Metrohm Autolab, b.v). Randle's equivalent circuit (see inset in Figure 2) has been used in the analysis of the charge transfer resistance, R_{ct} . In the case of DPV detection, the following parameters were used: potential range from 0 to +0.5 V with a resting time of 2 s.

2.3.2. Validation of the Aptasensors in Milk Samples

The milk samples were prepared according to the procedure described in our recent paper [28]. A sample of UHT cow milk, 3.5% fat, obtained from local supermarket was first spiked with a certain amount of AFM1 in a concentration range of 15–120 ng/L and then thermostated at 40 °C. After that, the sample was diluted with methanol in the 3:1 *v/v* ratio and centrifuged at 5000 rpm for 5 min. The supernatant was diluted to 1:10 *v/v* ratio with the PBS. The aptasensor was incubated in the milk sample for 60 min and then its signal was recorded. The sensor recovery was calculated according

to: $[(\Delta R_{ct}/R_{cto})_{milk}/(\Delta R_{ct}/R_{cto})_{PBS}] \times 100\%$, where $(\Delta R_{ct}/R_{cto})_{PBS}$ are changes of charge transfer resistance at certain concentration of AFM1 in a buffer and $(\Delta R_{ct}/R_{cto})_{milk}$ those in a milk, respectively.

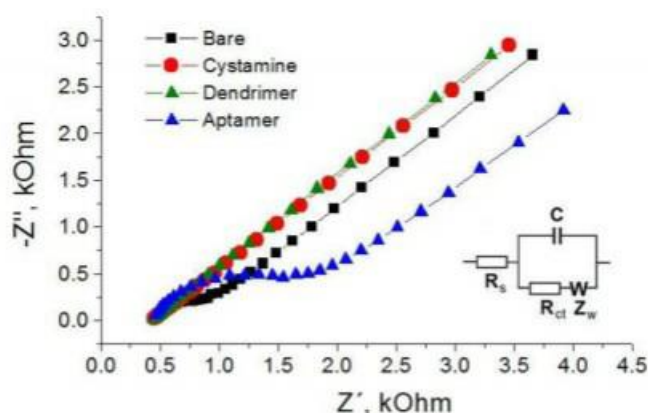


Figure 2. Nyquist plots corresponding to the main steps of aptasensor preparation from bare gold surface to cystamine layer, dendrimer adlayer and finally after immobilization of aptamers (see the legend). Inset represent Randles equivalent circuit that models electrical properties of the layers. R_s and R_{ct} are the electrolyte and charge transfer resistances, respectively. Z_w is the Warburg impedance resulting from the diffusion of the redox probe and C is the capacitance of the electrode surface/solution interface. Experiments were performed in the working phosphate buffer containing 5 mM (1:1) $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ as a redox probe.

3. Results and Discussion

3.1. Determination of AFM1 by Aptasensors Depending on Aptamer Immobilization and Detection

In this part we compare the response of aptasensors depending on the method of immobilization and detection. As a first we used aptamers APT1 modified at the 5' end by an amino group. The aptamers were immobilized at the surface of PAMAM dendrimers (see Figure 1A). Because AFM1 is not electroactive, as a convenient tool for detection of AFM1 we selected electrochemical impedance spectroscopy (EIS) at the presence of the $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ redox couple. At a formal potential of approx. 0.22 V vs. Ag/AgCl reference electrode (determined by CV) the charge transfer between the redox couple and the electrode surface is maximal. The changes at the sensing surface such as binding of AFM1 can affect this charge transfer. Therefore, detecting the changes in the charge transfer resistance, R_{ct} , allows analysis of the interaction of AFM1 with the sensing surface. In addition, EIS allows analysis of all steps of the sensing surface preparation. This is demonstrated on Figure 2 where the corresponding Nyquist plot is presented. It can be seen that the plot consists of semicircles and linear parts which depend on the diffusion of the redox couple to the sensing surface. The Nyquist plot can be characterized by its Randles equivalent circuit (inset in Figure 2). The diameter of the semicircles is proportional to the R_{ct} values. The straight line corresponding to cystamine layer chemisorbed at the gold surface is due to the high conductivity of this structure, which is caused by a more rapid diffusion of redox markers. Also the PAMAM adlayer revealed these properties partially due to its positive charge that make the diffusion of the redox probe close to the electrode surface easier. Immobilization of aptamers resulted in an increase of semicircle diameter. This is due to the fact that DNA aptamers are negatively charged. As a result, the redox couple is repulsed from the electrode surface which increases the R_{ct} values. This agrees well with our previous work [39].

Figure 3A shows a Nyquist plot following stepwise incubation of the sensing surface with an increased concentration of AFM1. It can be seen that addition of AFM1 to the sensor surface resulted in an increase of the diameters of semicircles. This can be due to establishment of a barrier that partially blocks the diffusion of the redox couple from the solution to the electrode surface. Using the NOVA software (Metrohm Autolab b.v.) we fitted the Nyquist plot using the Randles equivalent circuit

(lines in Figure 3A) and determined the charge transfer resistance with (R_{ct}) and without (R_{ct0}) AFM1. The plot of the relative changes of charge transfer resistance ($\Delta R_{ct}/R_{ct0}$) vs. AFM1 concentration is presented in Figure 3B.

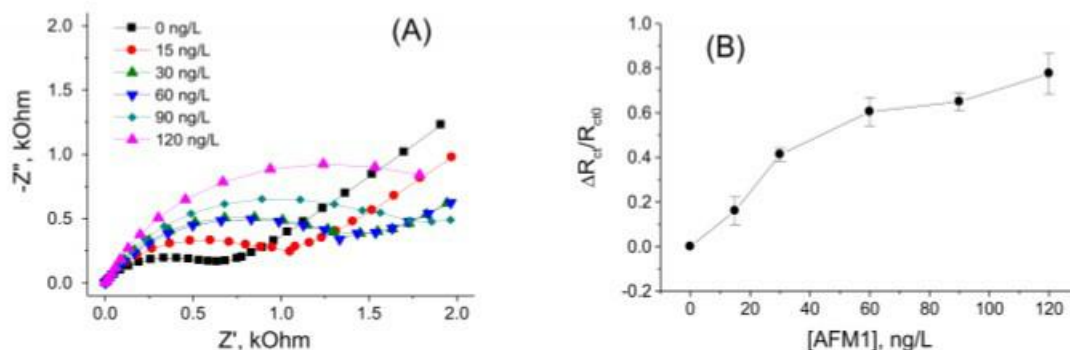


Figure 3. (A) Nyquist plots corresponding to the aptasensor without AFM1 and after incubation with various AFM1 concentrations (see the legend). (B) plot of the relative changes of R_{ct} values vs. concentration of AFM1 ($\Delta R_{ct}/R_{ct0} = (R_{ct} - R_{ct0})/R_{ct0}$, where R_{ct0} , R_{ct} are charge transfer resistances without and with certain concentration of AFM1, respectively). Results represent mean \pm SD from 3 independent experiments. Experiments were performed in working phosphate buffer containing 5 mM (1:1) $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ as a redox probe.

It can be seen that with increasing concentration of AFM1 the relative changes of the resistance increase. The plot of $\Delta R_{ct}/R_{ct0}$ vs. AFM1 concentration is close to linear up to 60 ng/L of AFM1, then saturation started. Using the signal to noise ratio rule ($S/N = 3$) we determined LOD as 8.47 ng/L (see also Table 1). This is below the allowable limit established by EU legislation, so the sensor can be used in practical applications. The validation of this sensor in a spiked milk samples is presented below in the Section 3.3.

The aptasensor presented above and the EIS method of analysis can be considered as label-free, because does not require any labeling of aptamers or the sensing surface. This is advantageous in respect of practical applications for which the low cost is among the priorities considering the rather large number of milk samples that should be analyzed.

In order to compare the sensitivity of AFM1 detection using label-free and label-based detection, we applied the following approach: we prepared an aptasensor using DNA aptamers (APT2 or APT3) modified at the 5' end by biotin. The aptamers were immobilized on the surface of gold electrodes with a chemisorbed neutravidin layer. Prior to aptamer immobilization the neutravidin molecules were modified by Fc-COOH according to the procedure described above in Section 2.2.2. This modification allows detection of the changes at the sensing surface by monitoring the redox properties of ferrocene (Fc). This is possible by using a DPV method. We can expect that binding of AFM1 will cause conformational changes of the aptamer and as a result the redox current can also be affected. This principle has been used in our earlier work, but Fc has been immobilized at the surface of dendrimers attached to the multiwalled carbon nanotubes [40]. For this purpose, a special Fc-linker has been synthesized. This approach gives us also possibility to compare the sensitivity of the sensors prepared from two different aptamers. The DPV for the sensor based on APT2 is presented in Figure 4A and those for APT3 in Figure 4B. It can be seen that the amplitude of the current decreases in both cases with increasing AFM1 concentration. Considering the possible instability of Fc during long term experiments and during CV cycling we also performed 30 CV scans for the aptasensor composed of APT2 on a neutravidin layer modified by Fc both in PBS and HEPES. In both cases only negligible changes of CV have been observed (results are not shown). Thus, the decrease of the peak current cannot be caused by instability of Fc. In order to compare the sensitivity of the aptasensors based on APT2 and APT3, we constructed a plot of relative changes of the peak current $\Delta I/I_0$ vs. AFM1 concentration (Figure 5). Similarly, like above we determined the LOD for both sensors (8.52 and 8.64 ng/L for APT2

and APT3, respectively). Thus, the sensitivity of AFM1 detection by both aptamers does not differ significantly and is close to the values obtained based on the label-free aptasensor presented above using APT1 and the EIS method of detection. We should also mention that the sensitivity of Fc-based detection by APT3 is much higher in comparison with optical detection as reported in [20].

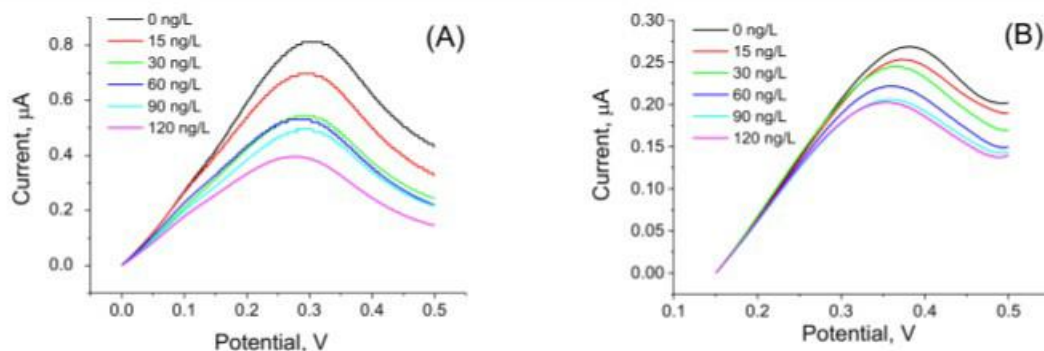


Figure 4. DPV of aptasensors based on biotinylated aptamers immobilized at Fc-modified neutravidin layer. (A) APT2 (in PBS), (B) APT3 (in HEPES).

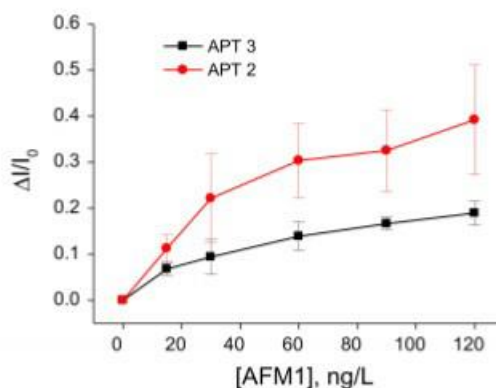


Figure 5. Plot of the relative changes of peak current $\Delta I/I_0$ vs. concentration of AFM1 constructed based on the DPV presented on Figure 4. ($\Delta I/I_0 = (I - I_0)/I_0$, where I is the peak current at certain concentration of AFM1 and I_0 those without AFM1). Results represent mean \pm SD obtained from 3 independent experiments in each series.

3.2. Comparison of the Sensitivity of Immuno- and Aptasensors in AFM1 Detection

As we mentioned above the aptasensors developed so far detect AFM1 with sufficient sensitivity comparable with that of immunosensors. However, aptasensors are more stable and cheaper in comparison with immunosensors. In addition, aptasensors are in principle reusable. Because the interaction of an analyte with the aptamer is based on electrostatic or Van der Waals interactions, the regeneration of the aptasensor is possible by immersion of the sensor in a solution of high ionic strength, for example 2 M NaCl, sodium dodecyl sulfate (SDS) or 0.2 M glycine-HCl solution. In particular, we proved this in our previous work on the detection of aflatoxin B1 using a dendrimer immobilization platform [35]. The sensor can be regenerated in 0.2 M glycine-HCl at least three times, without any significant loss of the sensitivity, which reduces the cost for its preparation. Similar aptasensor regeneration results were reported in [26]. In this case 10% SDS was used as regeneration agent. In contrast, immunosensors based on antibodies cannot be regenerated mostly due to the strong binding of the analyte to the antibody. Application of regeneration methods that are suitable for aptasensors resulted in irreversible changes in the antibodies that lost their binding affinity [41].

Table 1 compares the basic properties of immunosensors, DNA sensors and aptasensors for detection of AFM1 published so far.

Table 1. Comparison of the LOD values of electrochemical aptasensors for AFM1 determination.

Sensor Preparation	Method of Detection	Dynamic Range, ng/L	LOD, ng/L	Reference
Immunosensors				
Immobilization of the specific antibodies on the screen-printed electrode	ELISA	30–160	25	[12]
An amperometric immunosensor based on the gold-labeled antibodies immobilized at screen-printed electrodes	ELISA	15–1000	15	[13]
A screen-printed electrode array adapted with a standard 96-well microplate	ELISA	5–250	1	[15]
A sensor based on a competitive immunoassay using horseradish peroxidase (HRP)	Chronoamperometry	10–500	10	[16]
A label-free impedimetric immunosensor based on silver wire electrode	ELISA	1–100	1	[17]
Immuno-chromatographic strip with immobilized AFB1–bovine serum albumin as the immobilized antigen and anti-AFM1 antibody labeled with gold nanoparticles as tracers	ELISA	-	200	[18]
An electrochemical immunosensor with capture antibodies immobilized on the gold screen-printed electrode. Competitive assay	DPV	-	37	[19]
Microelectrode array immunosensor with antibodies immobilized by cross-linking with 1,4-phenylene diisothiocyanate.	ELISA	1–100	8	[42]
Antigen-binding fragments (Fab') immobilized on silicon oxynitride micro ring resonators	MRR	-	1641	[20]
DNA Sensors				
Metal-supported bilayer lipid membranes (s-BLMs)	Amperometry	0.5–6572	157	[31]
Aptasensors				
Aptasensor with electrochemical Fe ₃ O ₄ /PANi interface	DPV	6–60	1.98	[25]
Aptasensor based on biotin-modified aptamer at streptavidin layer on a screen-printed electrode	CV, SWV	1–10 ⁵	1	[26]
Hexaethyleneglycol-modified aptamers immobilized on a carbon screen-printed electrode	CV, EIS	2–150	1.15	[27]
Neutral Red electropolymerized film modified by pillar[5]arene	EIS	5–120	0.5	[28]
Optical label-free. Aptamers immobilized on nanostructured Au films	TIRE with LSRP	10–10 ⁵	10	[29]
Hairpin-shaped aptamer immobilized on gold nanoparticles. Methylene blue as a redox probe	DPV	2–600	0.9	[30]
Aptamers immobilized at PAMAM dendrimers	EIS	15–120	8.47	This work
Biotinylated aptamers immobilized at neutravidin layer modified by ferrocene	DPV	15–120	8.52	This work

CV—cyclic voltammetry; DPV—differential pulse voltammetry; EIS—electrochemical impedance spectroscopy; ELISA—Enzyme linked immunosorbent assay; LSRP—localized surface plasmon resonance; MRR—optical microring resonator; SWV—square wave voltammetry; TIRE—total internal reflection ellipsometry.

It can be seen that the sensitivity of aptasensors is comparable with that of immunosensors. The only exception is work by Chalyan et al. [20] in which an immunosensor based on an AFM1-selective Fab' fragment revealed higher sensitivity in comparison with those based on aptamers analyzed by the micro-ring resonator method. However, the LOD of this immunosensor (1641 ng/L) is not sufficient for practical applications. Among so far published AFM1-sensitive aptasensors the highest sensitivity is revealed by those based on immobilization of aptamers on pillar[5]arene Neutral Red layers (LOD 0.5 ng/L) [28]. This sensor was label-free because does not require labeling of the aptamers. It has been successfully validated in various milk samples. A label-free aptasensor based on immobilization of an electroactive Fe₃O₄/PANi interface also revealed a rather good LOD of 1.98 ng/L. The only disadvantage of this sensor was its relatively low dynamic range (up to 60 ng/L), but the fabrication

of this sensor as well as detection using DPV method was relatively easy. Unfortunately, the sensor has not been validated in real milk samples. A similar LOD (1 ng/L) has been reported in [26]. This electrochemical sensor was based on immobilization of biotinylated aptamers on streptavidin layers. For detection by square wave voltammetry (SWV), a 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ redox probe has been used. The sensor provided a surprisingly high dynamic range of $1-10^5$ ng/L. The advantage of this sensor was possibility of its regeneration in 10% SDS. However, validation in milk samples was missing. A rather simple aptasensor preparation method was presented in [27] using carbon screen-printed electrodes onto which amino-modified aptamers were immobilized by covalent binding. The sensor revealed good sensitivity (LOD 1.15 ng/L) and dynamic range. The sensor also revealed good stability and was validated in real milk samples with recoveries between 99–111%. The sensor can also be considered as label-free due to the application of the EIS method in the presence of 1 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ redox couple. Rather good sensitivity (LOD 0.9 ng/L) has been obtained in recent work by Jalalian et al. [30] using hairpin-shaped aptamers. The detection is based on conformational changes of the aptamers at the presence of AFM1 with subsequent hybridization of aptamers with added complementary DNA strands immobilized on gold nanoparticles. The only disadvantage of this assay is a more complicated scheme that requires both DNA-modified nanoparticles as well as methylene blue as a redox probe. This sensor has also been validated in real milk samples with recoveries of 91.3 to 96.5%. Finally, the optical sensor reported in [29] revealed also good LOD (10 ng/L). It was relatively easy to fabricate. The only disadvantage is that for detection of AFM1 more sophisticated methods of total internal reflection ellipsometry (TIRE) combined with localized surface plasmon resonance (LSPR) are required. The sensor, however, has not been validated in milk samples. The sensor presented in our work based on label-free EIS detection and those based on Fc-modified neutravidin layers are of comparable sensitivity and dynamic range, therefore they can be used in practical applications. We should especially point out the new method of AFM1 detection based on biotinylated aptamers immobilized at chemisorbed neutravidin layer modified by Fc. This aptasensor can be easily prepared and detection of AFM1 can be performed by DPV or CV methods that are not difficult to handle, so can be used even in remote milk laboratories. The preparation of this sensor is relatively rapid and requires approx. 3 h, which is much faster in comparison with those published so far. In addition, due to availability on the market of low cost potentiostats this detection is also cost effective.

3.3. Validation of the Biosensors in Spiked Milk Samples

Considering the advantages of label-free detection of AFM1 using aptasensors based on immobilization of aptamers on a dendrimer surface, we used these aptasensors for validation in a real milk sample. The samples were prepared according to the procedure described in Section 2.3.2. The experiments in a spiked milk samples were performed as follows: first the aptasensor was incubated in a milk without AFM1 during 1 h. After washing the surface in a buffer, it has been immersed in PBS containing 5 mM (1:1) $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ redox probe and the R_{ct} value has been determined. The same procedure has then been performed but with milk samples spiked with certain concentrations of AFM1 in a range from 15 to 120 ng/L. Figure 6 compares the changes of charge transfer resistance vs. AFM1 concentration in buffer and in milk. It can be seen that there are only relatively small deviations between the values that evidence a good sensor recovery.

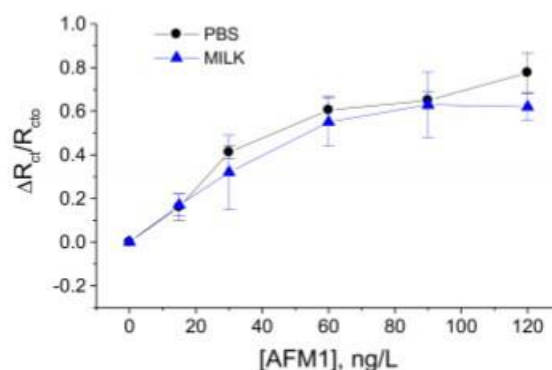


Figure 6. Plot of the relative changes of R_{ct} values vs. concentration of AFM1 ($\Delta R_{ct}/R_{cto} = (R_{ct} - R_{cto})/R_{cto}$, where R_{cto} , R_{ct} are charge transfer resistances without and with certain concentration of AFM1, respectively) in a PBS and in a spiked milk samples (see the legend). Results represent mean \pm SD from 3 independent experiments in each series. Experiments were performed at presence of 5 mM (1:1) $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ as a redox probe.

This is also demonstrated in Table 2 where the sensor recovery is calculated. The recovery varied between 78.04 to 106.25% which may be due to certain influence of milk proteins on the properties of the sensing surface, such as non-specific binding that can partially block the diffusion of the redox probe to the sensing surface.

Table 2. Comparison of the EIS response of the aptasensor in a PBS and in spiked milk samples. Recovery was calculated as: $[(\Delta R_{ct}/R_{cto})_{\text{milk}}/(\Delta R_{ct}/R_{cto})_{\text{PBS}}] \times 100\%$.

Concentration of AFM1, ng/L	Buffer $\Delta R_{ct}/R_{cto}$	Milk $\Delta R_{ct}/R_{cto}$	Recovery, %
15	0.16	0.17	106.25%
30	0.41	0.32	78.04%
60	0.61	0.55	90.16%
90	0.65	0.63	97.00%
120	0.78	0.62	79.5%

4. Conclusions

Two aptasensors for the sensitive determination of aflatoxin M1 (AFM1) in aqueous solutions and in milk samples were developed and compared in respect of aptamer immobilization and method of detection. For the first time we report aptasensors for the detection of AFM1 based on aptamer immobilization on a dendrimer layers as well as on neutravidin layers modified by Fc-COOH. Comparison of label-free EIS based biosensor with those utilizing Fc-labelled neutravidin revealed a similar limit of detection (LOD), which is below the allowable contamination of the milk and milk products by AFM1. The aptasensor based on dendrimer layers has been validated in spiked milk samples and revealed recoveries between 78.04–106.25%. The possible deviation can be due to effect of milk proteins on the sensing layer properties. This will require further efforts to overcome this influence.

Author Contributions: Conceptualization, T.H.; Methodology, T.H.; Validation, S.K. and T.H.; Formal Analysis, S.K. and T.H.; Investigation, S.K. and T.H.; Resources, T.H.; Data Curation, S.K. and T.H.; Writing-Original Draft Preparation, T.H. and S.K.; Writing-Review & Editing, T.H. and D.N.; Supervision, T.H. and D.N.; Project Administration, T.H.; Funding Acquisition, T.H.

Funding: All the investigations were funded by Slovak Research and Development Agency (Project No. APVV-14-0267), Science Grant Agency VEGA (project No. 1/0152/15), European Union's Horizon 2020 research and innovation program under the Marie Skłodowska-Curie grant agreement No. 690898 as well as by the Research and Development Operational Program funded by the ERDF (Contract No. ITMS 26240120027).

Acknowledgments: Stefanos Karapetis is grateful to Erasmus+ program of European Union for supporting his internship in Comenius university in Bratislava. Tibor Hianik is thankful to the Slovak Research and Development Agency (Project No. APVV-14-0267), Science Grant Agency VEGA (project No. 1/0152/15) and to the European Union's Horizon 2020 research and innovation program under the Marie Skłodowska-Curie grant agreement No. 690898 for financial support. This contribution is also the result of the project implementation "Development of the Centre of Excellence for Exploitation of Informational Biomacromolecules for Improvement of Quality of Life" project supported by the Research and Development Operational Program funded by the ERDF (Contract No. ITMS 26240120027). We are grateful to Lenka Babelova for technical assistance.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Richard, J.L. Some major mycotoxins and their mycotoxicosis—An overview. *Int. J. Food Microbiol.* **2007**, *119*, 3–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Bennett, J.W.; Klich, M. Mycotoxins. *Microbiol. Rev.* **2003**, *16*, 497–516. [[CrossRef](#)]
3. Hussein, H.; Brasel, J. Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on human and animals. *Toxicology* **2001**, *167*, 101–134. [[CrossRef](#)]
4. Fallah, A.A. Assessment of aflatoxin M1 contamination in pasteurized and UHT milk marketed in central part of Iran. *Food Chem. Toxicol.* **2010**, *48*, 988–991. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Prandini, A.; Tansini, G.; Sigolo, S.; Filippi, L.; Laporta, M.; Piva, G. On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products. *Food Chem. Toxicol.* **2009**, *47*, 984–991. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Beltrán, E.; Ibáñez, M.; Sancho, J.V.; Cortés, M.Á.; Yus, V.; Hernández, F. UHPLC-MS/MS highly sensitive determination of aflatoxins, the aflatoxin metabolite M1 and ochratoxin A in baby food and milk. *Food Chem.* **2011**, *126*, 737–744. [[CrossRef](#)]
7. Bognanno, M.; La Fauci, L.; Ritieni, A.; Tafuri, A.; De Lorenzo, A.; Micari, P.; Di Renzo, L.; Ciappellano, S.; Sarullo, V.; Galvano, F. Survey of the occurrence of Aflatoxin M1 in ovine milk by HPLC and its confirmation by MS. *Mol. Nutr. Food Res.* **2006**, *50*, 300–305. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Rastogi, S.; Dwivedi, P.D.; Khanna, S.K.; Das, M. Detection of aflatoxin M1 contamination in milk and infant milk products from Indian markets by ELISA. *Food Control* **2004**, *15*, 287–290. [[CrossRef](#)]
9. Tuerk, C.; Gold, L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* **1990**, *249*, 505–510. [[CrossRef](#)]
10. Ellington, A.D.; Szostak, J.W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* **1990**, *346*, 818–822. [[CrossRef](#)]
11. Hianik, T. Affinity biosensors for detection immunoglobulin E and cellular prions. Antibodies vs. DNA aptamers. *Electroanalysis* **2016**, *28*, 1764–1776. [[CrossRef](#)]
12. Micheli, L.; Grecco, R.; Badea, M.; Moscone, D.; Palleschi, G. An electrochemical immunosensor for aflatoxin M1 determination in milk using screen-printed electrodes. *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *21*, 588–596. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Vig, A.; Radoi, A.; Muñoz-Berbel, X.; Gyemant, G.; Marty, J.-L. Impedimetric aflatoxin M1 immunosensor based on colloidal gold and silver electrodeposition. *Sens. Actuators B Chem.* **2009**, *138*, 214–220. [[CrossRef](#)]
14. Parker, C.O.; Tothill, I.E. Development of an electrochemical immunosensor for aflatoxin M1 in milk with focus on matrix interference. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24*, 2452–2457. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Neagu, D.; Perrino, S.; Micheli, L.; Palleschi, G.; Moscone, D. Aflatoxin M1 determination and stability study in milk samples using a screen-printed 96-well electrochemical microplate. *Int. Dairy J.* **2009**, *19*, 753–758. [[CrossRef](#)]
16. Paniel, N.; Radoi, A.; Marty, J.L. Development of an electrochemical biosensor for the detection of aflatoxin M1 in milk. *Sensors* **2010**, *10*, 9439–9448. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Bacher, G.; Pal, S.; Kanungo, L.; Bhand, S. A label-free silver wire based impedimetric immunosensor for detection of aflatoxin M1 in milk. *Sens. Actuators B Chem.* **2012**, *168*, 223–230. [[CrossRef](#)]
18. Zhang, X.; Liu, L.; Chen, X.; Kuang, H.; Song, S.; Xu, C. Immunochromatographic strip development for ultrasensitive analysis of aflatoxin M1. *Anal. Methods* **2013**, *5*, 6567–6571. [[CrossRef](#)]
19. Karczmarczyk, A.; Baeumner, A.J.; Feller, K.H. Rapid and sensitive inhibition-based assay for the electrochemical detection of ochratoxin A and aflatoxin M1 in red wine and milk. *Electrochim. Acta* **2017**, *243*, 82–89. [[CrossRef](#)]

20. Chalyan, T.; Pasquardini, L.; Gandolfi, D.; Guider, R.; Samusenko, A.; Zanetti, M.; Pucker, G.; Pederzoli, C.; Pavesi, L. Aptamer- and Fab'-functionalized microring resonators for aflatoxin M1 detection. *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.* **2017**, *23*, 350–357. [[CrossRef](#)]
21. Sharma, A.; Goud, K.; Hayat, A.; Bhand, S.; Marty, J. Recent advances in electrochemical-based sensing platforms for aflatoxins detection. *Chemosensors* **2016**, *5*, 1. [[CrossRef](#)]
22. Rhouati, A.; Catanante, G.; Nunes, G.; Hayat, A.; Marty, J.L. Label-free aptasensors for the detection of mycotoxins. *Sensors* **2016**, *16*, 2178. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Rapini, R.; Marrazza, G. Electrochemical aptasensors for contaminants detection in food and environment: Recent advances. *Bioelectrochemistry* **2017**, *118*, 47–61. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Gurban, A.M.; Epure, P.; Oancea, F.; Doni, M. Achievements and prospects in electrochemical-based biosensing platforms for aflatoxin M1 detection in milk and dairy products. *Sensors* **2017**, *17*, 2951. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Nguyen, B.H.; Tran, L.D.; Do, Q.P.; Le Nguyen, H.; Tran, N.H.; Nguyen, P.X. Label-free detection of aflatoxin M1 with electrochemical Fe₃O₄/polyaniline-based aptasensor. *Mater. Sci. Eng. C* **2013**, *33*, 2229–2234. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Pandey, A.K.; Rajput, Y.S.; Sharma, R.; Singh, D. Immobilized aptamer on gold electrode senses trace amount of aflatoxin M1. *Appl. Nanosci.* **2017**, *7*, 893–903. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Istamboulié, G.; Paniel, N.; Zara, L.; Granados, L.R.; Barthelmebs, L.; Noguier, T. Development of an impedimetric aptasensor for the determination of aflatoxin M1 in milk. *Talanta* **2016**, *146*, 464–469. [[CrossRef](#)]
28. Smolko, V.; Shurpik, D.; Porfireva, A.; Evtugyn, G.; Stoikov, I.; Hianik, T. Electrochemical aptasensor based on poly (Neutral Red) and carboxylated pillar[5]arene for sensitive determination of aflatoxin M1. *Electroanalysis* **2018**, *30*, 486–496. [[CrossRef](#)]
29. Ghanim Al-Rubaye, A.; Nabok, A.; Catanante, G.; Marty, J.-L.; Takács, E.; Székács, A.; Ghanim Al-Rubaye, A.; Nabok, A.; Catanante, G.; Marty, J.-L.; et al. Label-free optical detection of mycotoxins using specific aptamers immobilized on gold nanostructures. *Toxins* **2018**, *10*, 291. [[CrossRef](#)]
30. Jalalian, S.H.; Ramezani, M.; Danesh, N.M.; Aliboland, M.; Abnous, K.; Taghdisi, S.M. A novel electrochemical aptasensor for detection of aflatoxin M1 based on target-induced immobilization of gold nanoparticles on the surface of electrode. *Biosens. Bioelectron.* **2018**, *117*, 487–492. [[CrossRef](#)]
31. Fojta, M.; Daňhel, A.; Havran, L.; Vyskočil, V. Recent progress in electrochemical sensors and assays for DNA damage and repair. *Trends in Anal. Chem.* **2016**, *79*, 160–167. [[CrossRef](#)]
32. Siontorou, C.G.; Nikolelis, D.P.; Miernik, A.; Krull, U.J. Rapid methods for detection of Aflatoxin M1 based on electrochemical transduction by self-assembled metal-supported bilayer lipid membranes (s-BLMs) and on interferences with transduction of DNA hybridization. *Electrochim. Acta* **1998**, *43*, 3611–3617. [[CrossRef](#)]
33. Hamula, C.L.A.; Guthrie, J.W.; Zhang, H.; Li, X.F.; Le, X.C. Selection and analytical applications of aptamers. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2006**, *25*, 681–691. [[CrossRef](#)]
34. Fischer, L.M.; Tenje, M.; Heiskanen, A.R.; Masuda, N.; Castillo, J.; Bentien, A.; Émneus, J.; Jakobsen, M.H.; Boisen, A. Gold cleaning methods for electrochemical detection applications. *Microelectron. Eng.* **2009**, *86*, 1282–1285. [[CrossRef](#)]
35. Castillo, G.; Spinella, K.; Poturnayová, A.; Šnejdárková, M.; Mosiello, L.; Hianik, T. Detection of aflatoxin B1 by aptamer-based biosensor using PAMAM dendrimers as immobilization platform. *Food Control* **2015**, *52*, 9–18. [[CrossRef](#)]
36. Hianik, T.; Wang, J. Electrochemical aptasensors—Recent achievements and perspectives. *Electroanalysis* **2009**, *21*, 1223–1235. [[CrossRef](#)]
37. Tassew, N.; Thompson, M. Kinetic characterization of TAR RNA-Tat peptide and neomycin interactions by acoustic wave biosensor. *Biophys. Chem.* **2003**, *106*, 241–252. [[CrossRef](#)]
38. Radi, A.-E.; Acero Sánchez, J.L.; Baldrich, E.; O'Sullivan, C.K. Reagentless, reusable, ultrasensitive electrochemical molecular beacon aptasensor. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 117–124. [[CrossRef](#)]
39. Castillo, G.; Lamberti, I.; Mosiello, L.; Hianik, T. Impedimetric DNA aptasensor for sensitive detection of ochratoxin A in food. *Electroanalysis* **2012**, *24*, 512–520. [[CrossRef](#)]
40. Miodek, A.; Castillo, G.; Hianik, T.; Korri-Youssoufi, H. Electrochemical aptasensor of human cellular prion based on multiwalled carbon nanotubes modified with dendrimers: A platform for connecting redox markers and aptamers. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 7704–7712. [[CrossRef](#)]

41. Snejdarkova, M.; Svobodova, L.; Polohova, V.; Hianik, T. The study of surface properties of an IgE-sensitive aptasensor using an acoustic method. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *390*, 1087–1091. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Parker, C.O.; Lanyon, Y.H.; Manning, M.; Arrigan, D.W.M.; Tothill, I.E. Electrochemical immunochip sensor for aflatoxin M1 detection. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 5291–5298. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

V. Βιογραφικά στοιχεία Στέφανου Καραπέτη



Γεννήθηκα στην Αθήνα το 1983. Το 2002 εισήχθη στο Χημικό τμήμα Αθήνας με πανελλήνιες εξετάσεις και ολοκλήρωσα το μεταπτυχιακό μου το 2014 στο τμήμα ανόργανης Χημείας Αθήνας.

Κατά τη διάρκεια της φοίτησης μου στο Χημικό τμήμα Αθήνας πέρα από αρκετές βιβλιογραφικές εργασίες έκανα διπλωματική εργασία στον καθηγητή Νικολέλη με θέμα την φασματομετρική μελέτη με IR σύνδεσης ένζυμα σε συνθετικές λιπιδικές μεμβράνες για την ανίχνευση τοξικών ουσιών, στον τομέα της Χημείας περιβάλλοντος το 2009. Το 2014 ολοκλήρωσα την μεταπτυχιακή μου εργασία με θέμα την κατάλυση της αντίδρασης Stille με νανοσωματίδια Pd σταθεροποιημένα με πολυηλεκτρολύτες παραγόμενους από Αμινοξέα.

Επίσης έχω συμμετάσχει σε πλήθος συνεδρίων όπως στο πρώτο Πανελλήνιο Συνέδριο Ονοματολογίας και Ορολογίας της Χημείας, που διοργάνωσε το τμήμα Παιδείας & Χημικής Εκπαίδευσης της Ένωσης Ελλήνων Χημικών (22 Φεβρουαρίου 2014) και στο 2^ο που διοργανώθηκε στις 9-11 Νοεμβρίου του 2018. Στο 12ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Χημείας, που διοργάνωσε η ΕΕΚΧΒ-ΚΒ (7-8 Νοεμβρίου 2014). Στο Elamb 2017 στην Μπρατισλάβα της Σλοβακίας (24-27 Σεπτεμβρίου του 2014) ενώ είχα συμμετάσχει και στο ίδιο συνέδριο τον Φεβρουάριο του 2017 όπου έγινε και η παρουσίαση του Poster. Στις 5-8 Οκτωβρίου του 2018 συμμετείχα στο συνέδριο HRUS 2018, που έγινε στο χημικό τμήμα του πανεπιστημίου του Μπρνο τη Τσεχικής Δημοκρατίας.

Έχω πτυχίο Αγγλική γλώσσας (Proficiency, C2 level) και ECDL Core ενότητες 1-7 (έτος 2013). Έχω ασχοληθεί ιδιαίτερα με την αρθρογραφία και μάλιστα πέρα από τις δημοσιεύσεις στα ξένα περιοδικά που θα παραθέσω στη συνέχεια έχω και ένα άρθρο στα Χημικά Χρονικά στο τεύχος του Ιουλίου-Αυγούστου 2017 της Ένωσης Ελλήνων Χημικών με τίτλο «Δενδριμερή μια άγνωστη ελληνική λέξη Χαμένη στη μαγεία της Χημείας». Επίσης τόσο κατά τη διάρκεια του μεταπτυχιακού μου όσο και κατά τη διάρκεια του διδακτορικού έχω επικουρικό έργο στην ανόργανη χημεία του Χημικού τμήματος της Αθήνας και του Χημικού μηχανικού αλλά και στην αναλυτική χημεία του Χημικού μηχανικού. Επίσης κατά την παραμονή μου στη Σλοβακία (2016-2018) είχα και διδακτικό έργο σε φοιτητές του πανεπιστημίου, βοηθώντας τους σε πειράματα για την πτυχιακή ή την μεταπτυχιακή τους εργασία.

Οι εργασίες που έγιναν στα πλαίσια του διδακτορικού (2015-2018) ήταν 25 και διατυπώνουν διάφορες εφαρμογές που χρησιμοποιούνται στους βιοαισθητήρες με 8 από αυτές να είναι κεφάλαια σε 7 βιβλία και οι 2 να είναι οι κύριες δημοσιεύσεις που μπήκαν σε αυτό το πόνημα και 2 ακόμα περιέχουν πειράματα που ανήκουν σε υποψήφια διδάκτωρ, που συνεργαστήκαμε. Οι υπόλοιπες 13 είναι άρθρα με βιβλιογραφική ανασκόπηση (review) του ζητήματος των βιοαισθητήρων. Ακολουθούν οι αναλυτικές λίστες των εργασιών αυτών κατά χρονολογική σειρά με πρώτες τις πιο πρόσφατες.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

1. **Karapetis S**, Hianik, T, Nikolelis, D; Label-Free and Redox Markers-Based Electrochemical Aptasensors for Aflatoxin M1 Detection, **Sensors**, **2018**, 18 (12), 4218
2. Nikoleli GP, Nikolelis PD, Siontorou CG, Nikoleli MT, **Karapetis S**; The Application of Lipid Membranes in Biosensing, **Membranes**, **2018**, 8(4), 108

3. Nikoleli GP, Nikolelis PD, Siontorou CG and Nikolelis MT, **Karapetis S**; Lipid Membrane Based Biosensors, **Preprints, 2018**, 2018080069
4. Nikoleli GP, Nikolelis PD, Siontorou CG and Nikolelis MT, **Karapetis S**; Potentiometric Biosensing Applications of Graphene electrodes with Stabilized Polymer Lipid Membranes, **Chemosensors, 2018**, 6(3), 25
5. Nikoleli GP, Nikolelis PD, Siontorou CG and Nikolelis MT, **Karapetis S**; Application of Biosensors Based on Lipid Membranes for the Rapid Detection of Toxins, **Biosensors, 2018**, 8(3), 61
6. Nikoleli GP, Nikolelis PD, Siontorou CG and Nikolelis MT, **Karapetis S**; Potentiometric Biosensing Applications of Graphene Electrode with Stabilized Polymer Lipid Membranes, **Preprints, 2018**, 2018050410
7. Nikoleli GP, **Karapetis S**, Nikolelis PD, Siontorou CG and Nikolelis MT; A Nanosensor for the Rapid Detection of Cholera Toxin Using Graphene Electrodes with Incorporated Polymer Lipid Films, **Nanomedicine & Nanotechnology Open Access, 2018**, 3(2), 000137
8. Georgia-Paraskevi Nikoleli, Dimitrios Nikolelis, Christina G. Siontorou and **Stephanos Karapetis**; Lipid Membrane Nanosensors for Environmental Monitoring: The Art, the Opportunities, and the Challenges, **Sensors, 2018**, 18(1), 284
9. Nikoleli, G.-P.; Siontorou, C.G.; Nikolelis, D.P.; **Karapetis, S.**; Artificial Lipid Membranes: Past, Present, and Future, **Membranes, 2017**, 7(3), 38.
10. Nikoleli, G.-P.; Siontorou, C.G.; Nikolelis, D.P.; Bratakou, S.; **Karapetis, S.**; Tzamtzis, N. Biosensors Based on Lipid Modified Graphene Microelectrodes, **carbon, 2017**, 3(1), 9
11. Christina G. Siontorou, Vasileios Th. Keramidas, Georgia-Paraskevi D. Nikoleli, Dimitrios P. Nikolelis, **Stephanos Karapetis**, Spyridoula Bratakou, Nikolaos Tzamtzis; Nano-enabled medical devices based on biosensing principles: technology basis and new concepts, **AIMS Materials Science, 2017**, 4(1), 250-266
12. Bratakou, S., Nikoleli, G.P., Siontorou, C. G., Nikolelis, D. P., **Karapetis, S.** and Tzamtzis, N; Development of an Electrochemical Biosensor for the Rapid Detection of Saxitoxin Based on Air Stable Lipid Films with Incorporated Anti-STX Using Graphene Electrodes, **Electroanalysis, 2017**, 29(4), 990–997
13. Siontorou, C.G.; Georgopoulos, K.N.; Nikoleli, G.-P.; Nikolelis, D.P.; **Karapetis, S.K.**; Bratakou, S; Protein-Based Graphene Biosensors: Optimizing Artificial Chemoreception in Bilayer Lipid Membranes, **Membranes, 2016**, 6 (3), 43.

14. Bratakou, S., Nikoleli, G.-P., Siontorou, C. G., **Karapetis, S.**, Nikolelis, D. P. and Tzamtzis, N; Electrochemical Biosensor for Naphthalene Acetic Acid in Fruits and Vegetables Based on Lipid Films with Incorporated Auxin-Binding Protein Receptor Using Graphene Electrodes, **Electroanalysis**, **2016**, 28(9): 2171-2177
15. Nikolelis DP, Siontorou CG, Bratakou S, Nikoleli GP, **Karapetis S**; Single domain antibodies in bio-sensing, **Kenkyu Journal of Nanotechnology & Nanoscience**, **2016**
16. **Karapetis, S.**, Nikoleli, G.-P., Siontorou, C. G., Nikolelis, D. P., Tzamtzis, N. and Psaroudakis, N; Development of an Electrochemical Biosensor for the Rapid Detection of Cholera Toxin Based on Air Stable Lipid Films with Incorporated Ganglioside GM1 Using Graphene Electrodes, **Electroanalysis**, **2016**, 28(7):1584-1590
17. Nikoleli GP, Bratakou S, Psychoyios VN, **Karapetis SK**, Nikolelis DP; Some typical examples of graphene and ZnO microelectrode based electroanalytical biosensors, **Kenkyu Journal of Nanotechnology & Nanoscience**, **2015**

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΚΕΦΑΛΑΙΑ ΒΙΒΛΙΩΝ

1. Nikoleli GP, Siontorou CG, Nikolelis PD, **Karapetis S**, Bratakou S; Prototype Biosensing Devices: Design and Microfabrication Based on Nanotechnological Tools for the Rapid in the Field Detection of Food Toxicants and Environmental Pollutants, chapter 1 in book **Nanotechnology and Biosensors**, **2018**, Elsevier, 1-28
2. Georgia-Paraskevi Nikoleli, Dimitrios P. Nikolelis, Christina G. Siontorou, **Stephanos Karapetis**, Theo Varzakas; Novel Biosensors for the Rapid Detection of Toxicants in Foods, chapter 2 in book **Advances in Food and Nutrition Research**, **2018**, 84, 57-102
3. Economou, A., **Karapetis, S. K.**, Nikoleli, G.-P., Nikolelis, D. P., Bratakou, MS., Varzakas, T. H; Enzyme-based Sensors, chapter 9 in book **Advances in Food Diagnostics**, **2017**, **John Wiley & Sons**, 231-250
4. Karapetis SK, Bratakou, MS, Nikoleli, G.P., Siontorou, C.G., Nikolelis, D.P., Tzamtzis, N; Graphene and Carbon Nanotube-Based Biosensors for Food Analysis, chapter 11 in book **Advances in Food Diagnostics**, **2017**, **John Wiley & Sons**, 269-277
5. Christina G. Siontorou, Georgia-Paraskevi D. Nikoleli, Dimitrios P. Nikolelis, **Stephanos Karapetis**, Nikolaos Tzamtzis, Spyridoula Bratakou; Point-of-Care and Implantable Biosensors in Cancer Research and Diagnosis, chapter 5 in book **Next Generation Point-of-care Biomedical Sensors Technologies for Cancer Diagnosis**, **2017**, Springer, 115-132

6. Georgia-Paraskevi Nikoleli, **Stephanos Karapetis**, Spyridoula Bratakou, Dimitrios P. Nikolelis, Nikolaos Tzamtzis and Vasillios N. Psychoyios; Graphene-based Electrochemical Biosensors: New Trends and Applications, chapter 13 in book **Intelligent Nanomaterials, 2017**, 2nd Edition, Willey, 427-448
7. Nikoleli, Georgia-Paraskevi; Nikolelis, Dimitrios P.; Varzakas, Theodoros; Bratakou, Spyridoula; Psychoyios, Vasillios N.; **Karapetis, Stephanos**; Applications of graphene microelectrodes in clinical analysis, chapter 22 in book **Nanobiosensors for Personalized and Onsite Biomedical Diagnosis, 2016**, The Institution of Engineering and Technology, London, United Kingdom, 459-472
8. Georgia-Paraskevi Nikoleli, **Stephanos Karapetis**, Spyridoula Bratakou, Dimitrios P. Nikolelis, Nikolaos Tzamtzis, Vasillios N. Psychoyios, Nikolas Psaroudakis; Biosensors for Security and Bioterrorism: Definitions, History, Types of Agents, New Trends and Applications, introduction in book **Biosensors for Security and Bioterrorism Applications, 2016**, Springer, 1-13