Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο Σχολή Εφαρμοσμένων
Μαθηματικών & Φυσικών Επιστημών ΔΠΜΣ
«Μικροσυστήματα & Νανοδιατάξεις»

Μεταπτυχιακή εργασία:

Ενεργοποίηση βιοαισθητήρων και εκτύπωση βιολογικού υλικού με laser.

Χατζηπέτρου Μαριαννέζα
Επιβλέπουσα Ι. Ζεργιώτη, Επίκουρος Ε.Μ.Π.

2010-2011

Περίληψη 5

Κεφάλαιο 1 7

1.1 Τεχνικές εναπόθεσης μικροσυστοιχιών. 7

1.1.1 Ink jet printing 7

1.1.2 Εναπόθεση μέσω ακίδων (Dip pen Nanolithography) 9

1.1.3 Εναπόθεση μέσω αντλίας (Flow based direct write- pump) 10

1.1.4 Εναπόθεση με laser (MAPLE) 11

1.1.5 Εναπόθεση με laser (LIFT) 11

1.2 Αισθητήρες 18

1.2.1 Αισθητήρες χωρητικότητας 20

1.2.2 Ηλετροχημικοί αισθητήρες 22

Αμπερομετρικοί αισθητήρες 22

Ποτενσιομετρικοί 24

Αγωγιμότητας 24

1.2.3 Μαγνητικοί βιοαισθητήρες 24

1.2.4 Οπτικοί αισθητήρες 24

Αισθητήρες φωταύγειας 25

Αισθητήρες χρωματομετρίας. 26

1.3 Βιομόρια ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται σε αισθητήρες. 29

1.3.1 Ένζυμα 29

1.3.2 Αντισώματα 31

1.3.3 Απτίνες 32

1.3.4 Φωτοσυστήματα I,II 34

1.3.5 Νουκλεικά οξέα 40

Κεφάλαιο 2 43

2.1 Πρωτόκολλα διαμόρφωσης επιφανειών, ακινητοποίησης βιολογικών υλικών και υβριδοποίησης. 43

2.1.1 Πρωτόκολλο ακινητοποίησης ολιγονουκλεοτιδίων σε επιφάνειες χρυσού. 44

2.1.2 Πρωτόκολλο ακινητοποίησης ολιγονουκλεοτιδίων στην επιφάνεια GOPTS/LTO 45

2.2 Πειραματική διαδικασία 46

2.3 Εναπόθεση ολιγονουκλεοτιδίων σε υποστρώματα LTO/Si, στα οποία έχει γίνει επίστρωση σιλανίου GOPTS. 51

2.4 Εναπόθεση ολιγονουκλεοτιδίων σε υποστρώματα Au/LTO/Si 56

2.5 Υβριδοποίηση εναποτιθέμενων ολιγομερών- ανιχνευτών με τα συμπληρωματικά ολιγομερή- στόχους. 59

2.6 Εναπόθεση ολιγονουκλεοτιδίων σε αισθητήρες χωρητικότητας και ανίχνευση της υβριδοποίησής τους με τα συμπληρωματικά ολιγομερή..... 62

Κεφάλαιο 3..... 75

3.1 Πρωτόκολλο απομόνωσης θυλακοειδών μεμβρανών 75

3.2 Πειραματική διαδικασία: Εναπόθεση και ακινητοποίηση θυλακοειδών σε αμπερομετρικούς αισθητήρες 76

3.3 Αποτελέσματα αμπερομετρικής μέτρησης αισθητήρων..... 80

Κεφάλαιο 4..... 88

4.1 Σύνοψη αποτελεσμάτων 88

Περίληψη

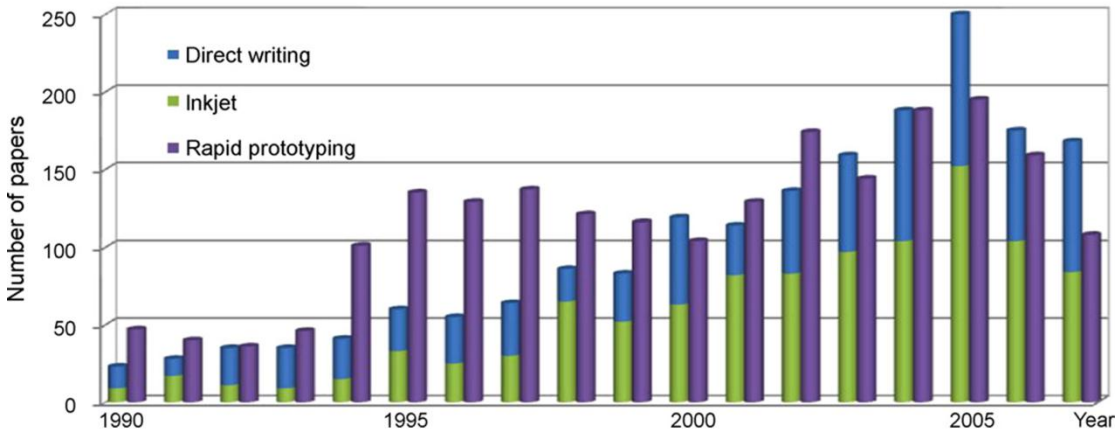
Η μεταφορά βιοϋλικών όπως οι πρωτεΐνες, τα νουκλεϊκά οξέα και τα ολιγονουκλεοτίδια έχει κυρίαρχο ρόλο στην ανάπτυξη μικροσυστοιχιών, βιοαισθητήρων και lab-on-chip διατάξεων. Αυτού του είδους οι διατάξεις παρουσιάζουν συνεχώς αυξανόμενο ενδιαφέρον μιας και χρησιμοποιούνται σε κλινικές και περιβαλλοντολογικές εφαρμογές.
Σε αυτή την εργασία γίνεται χρήση της τεχνικής απευθείας μεταφοράς με LASER (Laser Induced Forward Transfer) για την εναπόθεση μικροσυστοιχιών διαλύματος ολιγομερών και θυλακοειδών μεμβρανών. Τα πειράματα διεξήχθησαν με την τέταρτη αρμονική ενός Nd:YAG LASER (λ=266nm, τ=4ns).
Σαν υποστρώματα για την εναπόθεση ολιγονουκλεοτιδίων χρησιμοποιήθηκαν τροποποιημένες επιφάνειες LTO/Si με σιλάνιο GOPTS και χρυσό αλλά και αισθητήρες χωρητικότητας. Η επιλογή των πρωτοκόλλων που εφαρμόστηκαν για την τροποποίηση των επιφανειών έγινε σε συνδυασμό με βιβλιογραφικές μελέτες και πειράματα στα οποία μελετήθηκαν οι βέλτιστες συνθήκες ακινητοποίησης. Τα πειράματα εναπόθεσης σε επίπεδες επιφάνειες GOPTS/LTO/Si και Au/LTO/Si έγιναν με σκοπό την επιλογή των κατάλληλων συνθηκών εναπόθεσης και ακινητοποίησης έτσι ώστε να ακολουθήσει στη συνέχεια η εναπόθεση σε αισθητήρες. Οι βιοαισθητήρες, στους οποίους έγινε εναπόθεση ολιγονουκλεοτιδίων, ως στόχο είχαν την ανίχνευση ασθενειών και γενετικών ανωμαλιών.
Ως υποστρώματα για την εναπόθεση του διαλύματος θυλακοειδών μεμβρανών, χρησιμοποιήθηκαν εξ αρχής αμπερομετρικοί αισθητήρες. Ο λόγος που επιλέχθηκαν αμπερομετρικοί αισθητήρες, είναι η ιδιότητα που έχουν οι θυλακοειδής μεμβράνες να διεξάγουν την διαδικασία της φωτοσύνθεσης, μια διαδικασία μεταφοράς ρεύματος.
Οι αισθητήρες στους οποίους έγινε εναπόθεση θυλακοειδών χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση φυτοφαρμάκων ευρέως γνωστών στη γεωργική παραγωγή.
Βάση της ποιότητας των εναποτιθέμενων μικροσυστοιχιών βιουλικών αναδείχτηκε η δυνατότητα χρήσης του laser για εναπόθεση και ακινητοποίηση βιολογικών διαλυμάτων σε αισθητήρες. Η χρήση του laser εξασφάλισε την εναπόθεση των βιολογικών υλικών, τα οποία παρέμειναν βιοενεργά κατά τη διάρκεια της διαδικασίας εναπόθεσης.

Κεφάλαιο 1

1.1 Τεχνικές εναπόθεσης μικροσυστοιχιών.

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται η τάση μείωσης των διαστάσεων των προηγμένων υλικών, όπως αυτών της μικροηλεκτρονικής, ενώ ταυτόχρονα διατηρείται η πολυλειτουργικότητα, η ποιότητα και η αξιοπιστία τους. Οι απαιτήσεις αυτές της τεχνολογίας, οδήγησαν στην ανάπτυξη τεχνικών, με τις οποίες μπορεί να γίνει εναπόθεση υλικών μεγάλου εύρους σε διαφορετικούς τύπους επιφανειών μετά από προκαθορισμένο σχέδιο.

Το ερευνητικό ενδιαφέρον για τέτοιου είδους τεχνικές αποτυπώνεται στο παρακάτω ιστόγραμμα, όπου παρουσιάζεται ο αριθμός των δημοσιεύσεων, στις οποίες παραθέτονται direct write τεχνικές, από το 1990 έως το 2007.



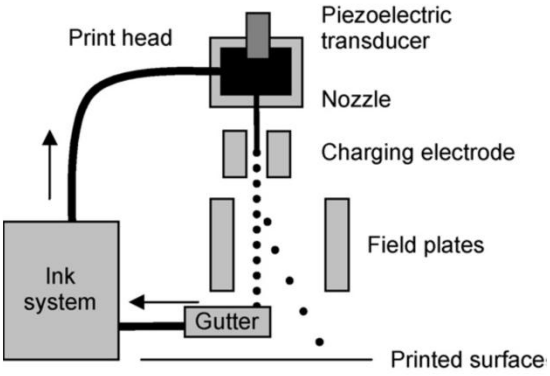
Εικόνα 1: Δημοσιεύσεις, στις οποίες περιέχονται οι όροι "direct writing" , "inkjet" και "rapid prototyping" στον τίτλο τους, σύμφωνα με το ISI Compendex database.

1.1.1 Ink jet printing

Η τεχνική εναπόθεσης ψεκασμού μελάνης (ink jet), είναι αρκετά απλή και γρήγορη, με τη δυνατότητα ελέγχου και διαχείρισης της εκτυπωμένης ποσότητας στο υπόστρωμα, με υψηλή επαναληψιμότητα και με τη δυνατότητα εκτύπωσης δομών σε διαφορετικές κλίμακες. Υπάρχουν δύο διαφορετικές μέθοδοι ψεκασμού μελάνης που χρησιμοποιούνται ευρέως για την εκτύπωση υγρών δειγμάτων. Ο συνεχής (continues inkjet-CIJ) και ο βηματικός (drop-on-demand-DOD) ψεκασμός μελάνης.

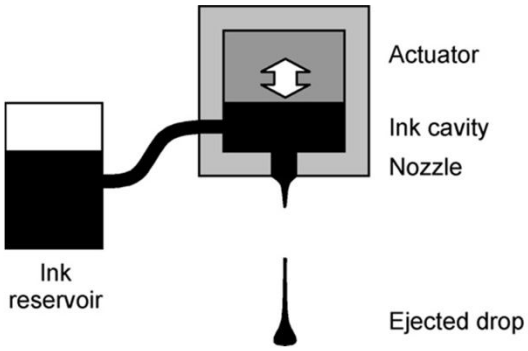
Σύμφωνα με το συνεχή ψεκασμό μελάνης (CIJ-Εικόνα 2), μια αντλία υψηλού κενού κατευθύνει το υγρό από ένα θάλαμο, στο ακροφύσιο, παράγοντας συνεχή ροή

μελανιού. Ένας πιεζοηλεκτρικός κρύσταλλος, προκαλεί το σπάσιμο της συνεχής ροής σε σταγόνες, μέσω ενός ακουστικού κύματος. Αφού εξέλθουν οι σταγόνες από το ακροφύσιο, περνάνε από ηλεκτρικό πεδίο, το οποίο είναι υπεύθυνο για την απόκλιση κάθε φορτισμένης σταγόνας. Το υπόστρωμα στο οποίο είναι επιθυμητή η εναπόθεση, τοποθετείται υπό γωνία, έτσι ώστε να γίνεται επιλογή των εναποτιθέμενων σταγόνων. Οι υπόλοιπες σταγόνες κατευθύνονται σε ένα διάκενο και ανακυκλώνονται.



Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση της αρχής λειτουργίας του συνεχούς ψεκασμού μελάνης (CIJ)[1].

Σύμφωνα με το βηματικό ψεκασμό μελάνης (DOD-Εικόνα 3), η εναπόθεση γίνεται είτε μέσω θερμικών θαλάμων (Thermal DOD inkjet), είτε μέσω πιεζοηλεκτρικού κρύσταλλου (piezoelectric DOD inkjet). Οι θερμαινόμενοι θάλαμοι είναι υπεύθυνοι για τη δημιουργία φυσαλίδας. Λόγω της αύξησης της πίεσης από τη φυσαλίδα, κατευθύνεται μια σταγόνα μελάνης στο υπόστρωμα. Στην περίπτωση που γίνεται χρήση πιεζοηλεκτρικών κρυστάλλων, εφαρμόζεται τάση στο κρύσταλλο με αποτέλεσμα να αλλάζει σχήμα αναγκάζοντας την εκτύπωση σταγόνας. Η χρήση πιεζοηλεκτρικών κρυστάλλων επιτρέπει την εκτύπωση μεγαλύτερου εύρους υλικών, από αυτά που εκτυπώνονται μέσω θερμικών θαλάμων.



Εικόνα 3: Σχηματική απεικόνιση αρχής λειτουργίας βηματικού ψεκασμού μελάνης (DOD)[1].

Parameters	CIJ	DOD
Drop velocity (m/s)	10–20	5–10
Drop diameter (μm)	10–150, typically 120	10–150, typically 50
Drop volume (pL)	0.5–2000	0.5–2000
Fluid viscosity (mPa s)	2–10	10–100
Reynolds no. (*Re*)	100–1000	2–50
Weber no. (*We*)	500–1500	50–150
Ohnesorge no. (*Oh*)	0.03–0.2	0.1–1

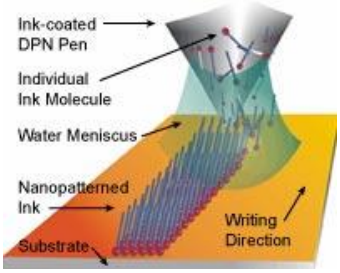
Πίνακας 1: Σύγκριση χαρακτηριστικών των δύο διαφορετικών μεθόδων ψεκασμού μελάνης (CIJ-DOD)[1].

1.1.2 Εναπόθεση μέσω ακίδων (Dip pen Nanolithography)

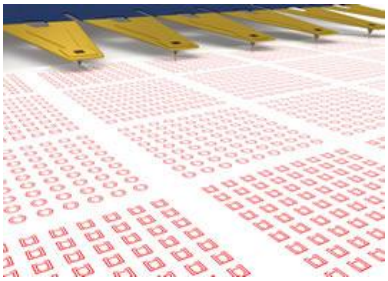
Η τεχνική Dip pen Nanolithography παρουσιάστηκε για πρώτη φορά το 1999 από την ομάδα του Mirkins και αποτελεί σήμα κατατεθέν της Nanoink. Η εναπόθεση σύμφωνα με την τεχνική αυτή γίνεται είτε με εμβάπτιση μιας ακίδας AFM (Εικόνα 4) στο υγρό προς εναπόθεση είτε μέσω μιας νανο-πιπέττας (nanopipette) (Εικόνα 5).

Και στις δύο περιπτώσεις, η ακίδα και η nanopipette έρχονται σε επαφή με το υπόστρωμα, εκτυπώνοντας σταγονίδια του υγρού. Τυπική δύναμη επαφής του προβόλου με το υπόστρωμα είναι 1nN. Η τεχνική DPN είναι υψηλής απόδοσης, ευέλικτη και ευπροσάρμοστη για την κατασκευή συστοιχιών σε νανομετρική κλίμακα. Η χρήση της ακίδας μειονεκτεί έναντι της nanopipette, εφόσον με την εμβάπτιση της ακίδας δεν υπάρχει έλεγχος της ροής του υγρού.

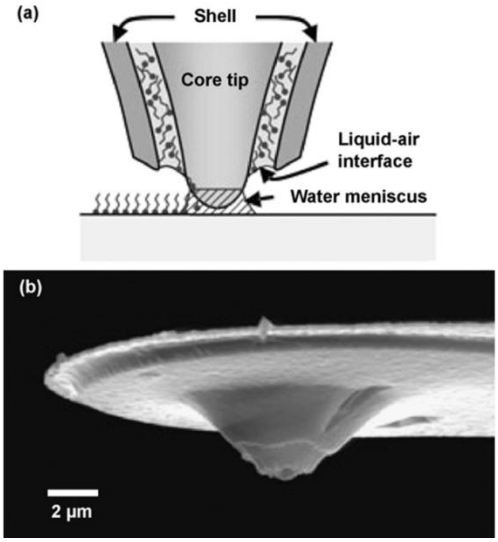
(a)



(b)



Εικόνα 4: (a) Σχηματική απεικόνιση εναπόθεσης με ακίδα, (b) συστοιχίες κατασκευασμένες με τη μέθοδο Dip pen nanolithography [2].

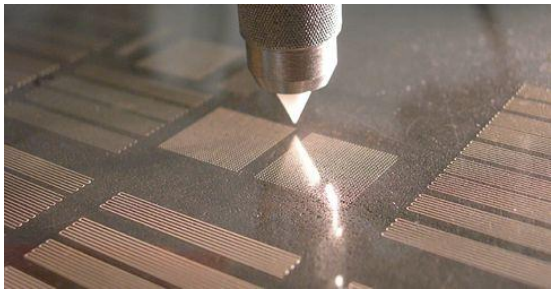


Εικόνα 5: (a) Σχηματική απεικόνιση εναπόθεσης με nanopipette, (b) εικόνα SEM της nanopipette[3].

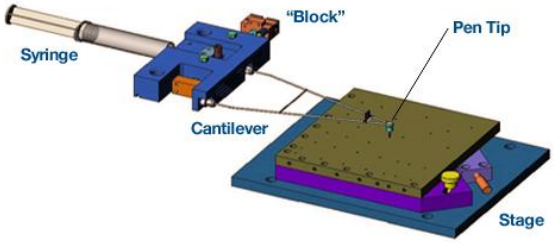
Σημαντικότερος παράγοντας για τα χαρακτηριστικά των εναποτιθέμενων σταγόνων είναι το μέγεθος της ακίδας ή της nanopipette. Η μικρότερη δυνατή διάμετρος ακίδας του DPN ή της nanopipette είναι 10nm. Με τη χρήση της ακίδας εναποτίθεται σταγόνα ίδιας διαμέτρου [4],ενώ με τη χρήση nanopipette διαμέτρου 10nm η εναποτιθέμενη σταγόνα είναι της τάξεως των 40nm.

1.1.3 Εναπόθεση μέσω αντλίας (Flow based direct write- pump)

Σε αντίθεση με τις τεχνικές που περιγράφηκαν ανωτέρω, η χρήση αντλίας ως μέθοδο εναπόθεσης προϋποθέτει τη συνεχή ροή μελάνης στο υπόστρωμα. Βασικότερα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι ότι δεν χρειάζεται αύξηση της θερμοκρασίας του υγρού και ο πολύ μικρός όγκος που μπορεί να εναποτεθεί. Οι δυο πιο γνωστές αντλίες εναπόθεσης ονομάζονται nScrypt και MicroPen, οι οποίες είναι κατοχυρωμένες με διπλώματα ευρεσιτεχνίας.



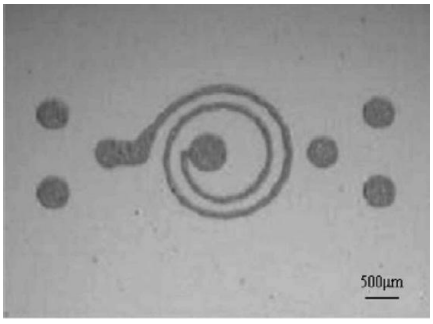
Εικόνα 6: εικόνα από την αντλία εναπόθεσης smart pump[5].



Εικόνα 7: σχηματική απεικόνιση του MicroPen[6].

1.1.4 Εναπόθεση με laser (MAPLE)

Η τεχνική MAPLE παρουσιάστηκε για πρώτη φορά το 1999 από την ομάδα Pique et al. Στην τεχνική αυτή χρησιμοποιείται ένας στόχος, ο οποίος αποτελείται από ένα λεπτό στρώμα quartz και ένα στρώμα φωτοευαίσθητου πολυμερούς. Πάνω στο στόχο αυτό γίνεται επίστρωση του υλικού προς εναπόθεση, ενώ το υπόστρωμα τοποθετείται σε μικρή απόσταση από το στόχο. Όταν η δέσμη του laser εστιάζεται στο στόχο, ένα μέρος του πολυμερούς αποσυντίθεται, εναποθέτοντας το υλικό στο υπόστρωμα. Το υλικό που εναποτίθεται δεν εξαερώνεται, εφόσον η ενέργεια του laser που χρειάζεται για την αποσύνθεση του πολυμερούς είναι πολύ μικρότερη της ενέργειας που μπορεί να εξαερώσει το υγρό.



Εικόνα 8: Πηνίο, κατασκευασμένο με τη τεχνική MAPLE[7].

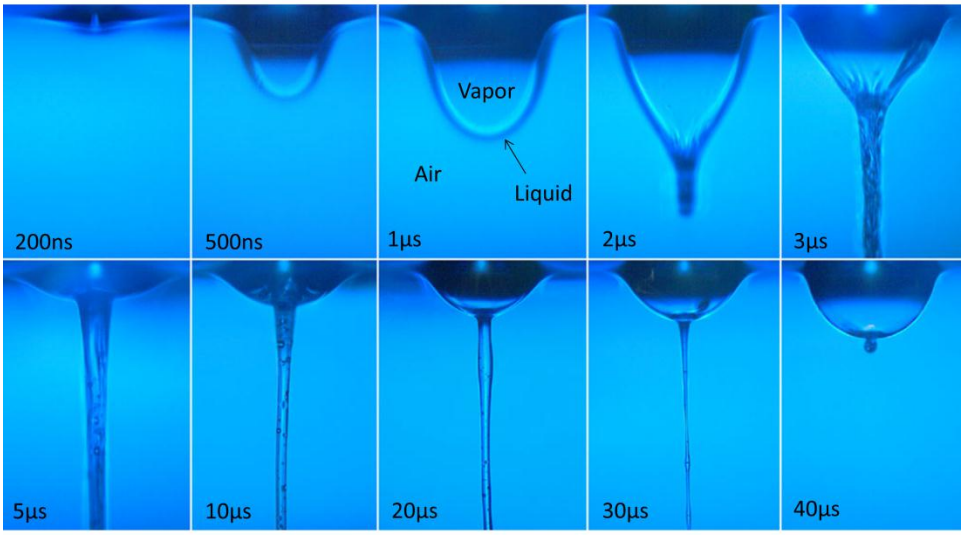
1.1.5 Εναπόθεση με laser (LIFT)

Η τεχνική εκτύπωσης με laser (laser induced forward transfer -LIFT) είναι μία direct write τεχνική που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκτύπωση στερεών και υγρών δειγμάτων. Με τη τεχνική αυτή, τα υλικά εκτυπώνονται ελεγχόμενα σε ένα υπόστρωμα υποδοχής από ένα laser.

Το υπόστρωμα υποδοχής τοποθετείται παράλληλα από ένα στόχο, στον οποίο έχει πρώτα γίνει επίστρωση του υλικού που θα εναποτεθεί.

Ένας τυπικός στόχος υγρών δειγμάτων αποτελείται από μια σταθερή πλάκα (quartz) η οποία πρέπει να είναι διαφανής για το μήκος κύματος laser που θα χρησιμοποιηθεί, ένα στρώμα απορρόφησης της ενέργειας του laser (χρυσό, τιτάνιο, ασήμι,...) που θα φέρει πάνω του, και το λεπτό στρώμα του προς εναπόθεση υλικού. Όταν το laser εστιάζεται στο στόχο, το απορροφητικό στρώμα, δηλαδή το τιτάνιο ή ο χρυσός θερμαίνεται. Αποτέλεσμα αυτού είναι η τοπική αύξηση της θερμοκρασίας του υγρού και κατά συνέπεια η δημιουργία θύλακα υψηλής πίεσης. Καθώς ο θύλακας αυτός επεκτείνεται η εσωτερική πίεση μειώνεται οδηγώντας στην εκτόνωσή του. Όταν η εσωτερική πίεση του θύλακα σταματήσει να είναι μεγαλύτερη από την εξωτερική ατμοσφαιρική πίεση και την επιφανειακή τάση του υγρού, ο θύλακας καταρρέει. Το στρώμα υγρού που βρίσκεται κάτω από το θύλακα απομακρύνεται από το στόχο με τη μορφή ενός jet. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι το υλικό που τελικά εναποτίθεται στο υπόστρωμα, δεν επηρεάζεται από την αύξηση της θερμοκρασίας, γεγονός που επιβεβαιώνεται από πολλές μελέτες [8,9,10,11,12].

Η τεχνική παρουσιάστηκε αρχικά από τους Bohandy et. al.[13] το 1986 με την εναπόθεση μετάλλων. Στη συνέχεια η χρήση της τεχνικής επεκτάθηκε στην εναπόθεση μεγάλου εύρους υλικών[14] που περιλαμβάνουν οξείδια[15], υπεραγωγούς[16] και πολυμερή[17]. Το πεδίο όμως στο οποίο η τεχνική βρήκε πλήθος εφαρμογών είναι η εναπόθεση βιολογικών υλικών (πρωτεϊνών, DNA, βλαστοκυττάρων κ.α) λόγω της δυνατότητας παραγωγής μικροσυστοιχιών.



Εικόνα 9: Φωτογραφική απεικόνιση του jet συναρτήσει του χρόνου, κατά τη διαδικασία εναπόθεσης με την τεχνική LIFT[18].

Η τεχνική LIFT έχει χρησιμοποιηθεί για την εναπόθεση πληθώρας βιολογικών δειγμάτων, στα οποία αποδεικνύεται η βιοενεργότητά τους είτε με το μετέπειτα

στάδιο της υβριδοποίησης είτε με τη χρήση μικροσκοπίων φθορισμού. Συνηθέστερα βιουλικά που εκτυπώνονται σε επιφάνειες με laser είναι τα κύτταρα, νουκλεικά οξέα και ιστοί. Από τις πρώτες δημοσιεύσεις εναπόθεσης βιολογικών υλικών είναι αυτή των οι Barron et al [19] με την εναπόθεση κυττάρων οστεοσαρκώματος. Για την εναπόθεση χρησιμοποίησαν ένα Nd:YAG laser και στόχο στον οποίο εκτός από το quartz και το βιολογικό διάλυμα υπήρχε και απορροφητικό στρώμα τιτανίου. Την τεχνική εναπόθεσης των βιουλικών ονόμασαν BioLP και επικεντρώθηκαν στην εκτύπωση μεμονωμένων αριθμών κυττάρων, σε Petri dish, στα οποία εξετάστηκε η βιοενεργότητά και ο ρυθμός ανάπτυξής τους δείχνοντας πως η τεχνική LIFT δεν επηρεάζει τα βιουλικά κατά την διαδικασία εκτύπωσης. Η ομάδα Othon et al [20] χρησιμοποίησε την τεχνική LIFT για την εκτύπωση οσφρητικών κυττάρων σε τρισδιάστατες δομές. Η εκτύπωση των κυττάρων έγινε σε γραμμές μήκους 8mm και πάχους 20μm (όσο το πάχος κάθε κύτταρου), ενώ η τελική δομή ήταν πολυστρωματική. Τα κύτταρα εξετάστηκαν μέσω της διαδικασίας φθορισμού, ενώ οι δομές απεικονίστηκαν από φωτογραφίες μέσω συνεστιακού μικροσκοπίου φθορισμού. Χρησιμοποιήθηκε Nd:YAG laser, ενώ στο στόχο που απλώνεται το βιολογικό υλικό υπήρχε λεπτό φιλμ τιτανίου.

Σημαντικές κλινικές έρευνες έχουν γίνει από την ομάδα των Schiele et al [] με τη χρήση της τεχνικής LIFT. Σύμφωνα με πρόσφατη δημοσίευση (2009) χρησιμοποίησαν ένα ArF excimer laser για τη μεταφορά κυττάρων ινοβλαστών και καρκινικών κυττάρων του μαστού, με σκοπό τη μελέτη της εγγύτητά τους και του τρόπου λειτουργίας τους. Στη δημοσίευση αυτή μικροσυστοιχίες κυττάρων ινοβλαστών εναποτέθηκαν για διερεύνηση της χρήσης τους στη παραγωγή κολλαγόνου ενώ καρκινικά κύτταρα εναποτέθηκαν σε μικροσυστοιχίες για εξέταση των διαδικασιών μετάστασης καθώς επίσης, έγινε και συνδυασμός εναπόθεσης των δυο παραπάνω κυττάρων για περεταίρω μελέτες διακυταρικών συμφύσεων και το ρόλο τους στις διαδικασίες μετάστασης. Τέλος έγινε εναπόθεση νευρικών βλαστικών κυττάρων και ενδοθηλιακών κυττάρων για την μελέτη πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης τους με απώτερο στόχο τη χρήση τους σε επούλωση τραυμάτων.

Εκτός από την χρήση μεταλλικού στρώματος ως στρώμα απορρόφησης της ενέργειας του laser, είναι δυνατή και η χρήση πολυμερούς. Με χρήση πολυαμιδίου, οι ομάδα των Kattamis et al [21] εκτύπωσαν εμβρυικά βλαστικά κύτταρα, σε Petri dish, με σκοπό τη χρήση τους στη μηχανική ιστών και σε θεραπευτικές μελέτες. Η εκτύπωση των βλαστοκυττάρων έγινε με Nd:YVO_4 laser.

Τη χρήση της τεχνικής LIFT στη μηχανική ιστών, πρότεινε η ομάδα Hopp et al. [22] Με ένα KrF laser εκτύπωσαν κύτταρα Schwann και astrogial που απομονώθηκαν από αρουραίους, καθώς και κύτταρα από επιθηλιακό ιστό χοίρου. Τα κύτταρα εν συνεχεία καλλιεργήθηκαν για δύο βδομάδες δείχνοντας αναμενόμενη πολλαπλασιασμό και διαίρεση. Σύμφωνα με τα συμπεράσματα της ομάδας, το laser δεν επιδρά ανασταλτικά στη βιωσιμότητα των κυττάρων, ιδιότητα που καθιστά την τεχνική LIFT κατάλληλη για τη χρήση της στην κατασκευή ιστών.

Εκτός από την εναπόθεση κυττάρων, πλήθος άλλων βιομορίων έχουν εκτυπωθεί με laser για διάφορες εφαρμογές. Εναπόθεση μικροσυστοιχειών βιοτίνης έγινε το 2008 από την ομάδα Boutopoulos et al. [23] Με τη χρήση Nd:YAG laser σε επιφάνειες LTO/Si στις οποίες πρώτα είχε γίνει επίστρωση σιλανίου. Οι μικροσυστοιχείες βιοτίνης υβριδοποιήθηκαν με φθορίζοντα μόρια στρεπταβιδίνης, δείχνοντας την βιοσιμότητα των εναποτιθέμενων κυττάρων. Εναπόθεση βιοτίνης παρουσιάστηκε την ίδια χρονιά και από τους Dinca et al. [24] με τη χρήση femtosecond και nanosecond laser, ενώ η βιονεργότητα των μορίων εξετάστηκε με τον ίδιο τρόπο.

Το 2003 εφαρμόστηκε η τεχνική LIFT στην εκτύπωση DNA λάμδα βακτηριοφάγου σε γυάλινα υποστρώματα από ένα KrF laser από την ομάδα Zergioti et al. [25]. Η βιοσιμότητα του DNA επιβεβαιώθηκε μέσω συνεστιακού μικροσκοπίου φθρισμού. Ένα χρόνο μετά έγινε εναπόθεση ανθρώπινου cDNA σε υποστρώματα γυαλιού, επικαλυμμένου με poly-L-lysine, από την ομάδα Serra et al. [26]. Για τν εναπόθεση χρησιμοποιήθηκε ένα Nd:YAG laser, ενώ στο στόχο υπήρχε λεπτό στρώμα τιτανίου (40nm) για την απορρόφηση της ενέργειας του laser. Τα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού μετά την υβριδοποίηση με το συμπληρωματικό DNA, στο οποίο είχε γίνει επισήμανση με δείκτη φθορισμού.

Την ίδια χρονιά έγινε εναπόθεση cDNA και από την ομάδα των Barron et al [27]. Σε αυτό το άρθρο, εκτός από την εναπόθεση DNA γίνεται αναφορά και για εναπόθεση πρωτεΐνης BSA με τη χρήση excimer laser. Στη δημοσίευση αναφέρεται η εναπόθεση 2000 spot, δικαιολογώντας τη χρήση της τεχνικής LIFT για την παραγωγή μικροσυστοιχειών σε πολύ μικρό χρόνο. η βιοενεργότητα της πρωτεΐνης BSA εξετάστηκε μετά την υβριδοποίηση σε την συμπληρωματική anti-BSA, στην οποία υπήρχαν δείκτες φθορισμού.

Το 2004 η ομάδα των Serra et al [28] έκανε εναπόθεση αντιγόνου Treponema pallidum σε νάιλον υποστρώματα, τα οποία έχουν την ιδιότητα να απορροφούν τα υγρά. Στη συνέχεια τα υποστρώματα επωάστηκαν με ανθρώπινο ορό θετικό σε σύφιλη έτσι ώστε να γίνει πρόσδεση του αντιγόνου με το συμπληρωματικό αντίσωμα. Χρησιμοποιήθηκε ένα Nd:YAG laser και στόχος με 40nm απορροφητικό υπόστρωμα τιτανίου.

Την εκτύπωση *E. coli*, παρουσίασαν οι Ringeisen et al. [29] το 2002 με τη χρήση ενός ArF excimer laser. Αξιοσημείωτο στο συγκεκριμένο άρθρο είναι ότι φρόντισαν το διάλυμα στο οποίο βρίσκονταν το βακτήριο να είναι παγωμένο πριν την εναπόθεση. Παρατηρώντας τα εναποτιθέμενα βακτήρια με εικόνες SEM, φαίνεται ότι όχι μόνο δεν έχουν καταστραφεί οι μεμβράνες των βακτηρίων αλλά παραμένουν παγωμένα, αποδεικνύοντας ότι η τοπική αύξηση θερμοκρασίας λόγω του laser δεν επηρεάζει το υλικό. Δύο χρόνια μετά η ομάδα Barron et al. [30], με τη χρήση ενός KrF (2,5ns) laser εκτύπωσε το ίδιο βακτήριο σε γυάλινα πλακίδια, με σκοπό την μετέπειτα εφαρμογή του σε βιοαοσθητήρες. Στο βακτήριο είχε γίνει επισήμανση με δείκτες φθορισμού για την ανίχνευσή της εναπόθεσης και της επιβίωσης του.

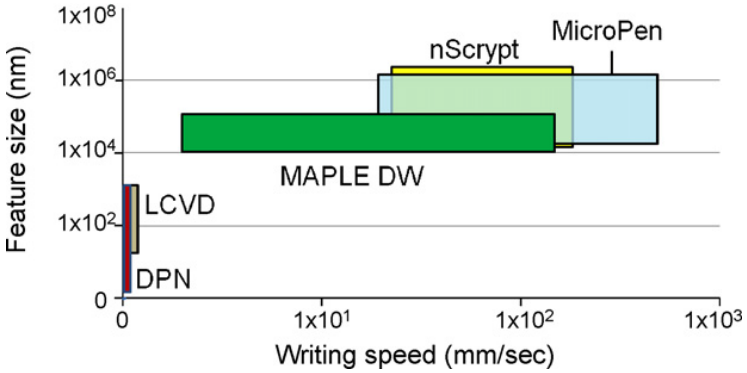
Ολοκληρώνοντας την αναφορά στο εύρος των βιουλικών στα οποία έχει γίνει εναπόθεση με laser, παρουσιάζεται η εναπόθεση ιστού προστάτη από την ομάδα των Chrisey et al το [31] 2003, με σκοπό την βιοψία των ιστών για καρκίνο του προστάτη.

Η τεχνική LIFT, έχει περιγραφεί σε πολλά άρθρα ως ιδανική τεχνική για την εναπόθεση βιολογικών δειγμάτων για διάφορες εφαρμογές. Δίνει τη δυνατότητα εφαρμογής στη μηχανική ιστών εφόσον, το υλικό που εναποτίθεται μπορεί να έχει τόσο μικρές διατάσεις όσο ένα κύτταρο. Δίνει τη δυνατότητα εναπόθεσης βιουλικών σε αισθητήρες εφόσον είναι τεχνική μη επαφής και δεν επηρεάζει το υπόστρωμα του αισθητήρα και τέλος δίνει τη δυνατότητα εναπόθεσης πολύ μικρού όγκου υλικού προσφέροντας έτσι χρήσιμο βιολογικό δείγμα για κλινικές διεργασίες, όπως βιοψία ιστών. Σε όλα τα παραπάνω άρθρα επισημαίνεται ότι τα υλικά παραμένουν ζωντανά μετά την εναπόθεσή ους με laser. Εκτός από το ερευνητικό ενδιαφέρον της τεχνικής, παρουσιάστηκε για πρώτη φορά το βιομηχανικό ενδιαφέρον από την ομάδα Guillemot et al [32,33], το 2009. Η ομάδα αυτή κατασκεύασε ένα LIFT εκτυπωτή, με τον οποίο μπορεί να γίνει εκτύπωση μεγάλου εύρους υλικών (*Πίνακας 2*) , ανάλογα με το laser που χρησιμοποιείται σε κάθε εκτυπωτή.

	Standard characteristics	*Effect*	*Materials*
YAG nanosecond laser	*1064 nm*	*Thermal plasma*	*Materials absorbent at this wavelength*
YAG UV laser	*355 nm*	*Photo Ablation*	*Polymers, Metals*
Picosecond laser	*1 064 nm*	*Ablation burning*	
Femtosecond laser	*800 nm or 1030 nm*	*Pure ablation*	*All types of glass, crystals, hard and fragile materials. Work demanding very high accuracy.*

Πίνακας 2

Όλες οι παραπάνω τεχνικές, παρουσιάζουν πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα ανάλογα με το είδος της εναπόθεσης. Βασικές διαφορές τους είναι η ταχύτητα και η ποσότητα εναπόθεσης καθώς και το γεγονός ότι κάποιες από τις παραπάνω τεχνικές έρχονται σε επαφή με το υπόστρωμα και κάποιες άλλες όχι. Παρακάτω παρατίθενται ιστόγραμμα, στο οποία φαίνονται οι βασικές διαφορές στην ταχύτητα και ποσότητα εναπόθεσης των τεχνικών που παρουσιάστηκαν σε αυτό το κεφάλαιο.



Εικόνα 10: Σύνοψη τεχνικών χαρακτηριστικών των τεχνικών εναπόθεσης.

1.2 Αισθητήρες

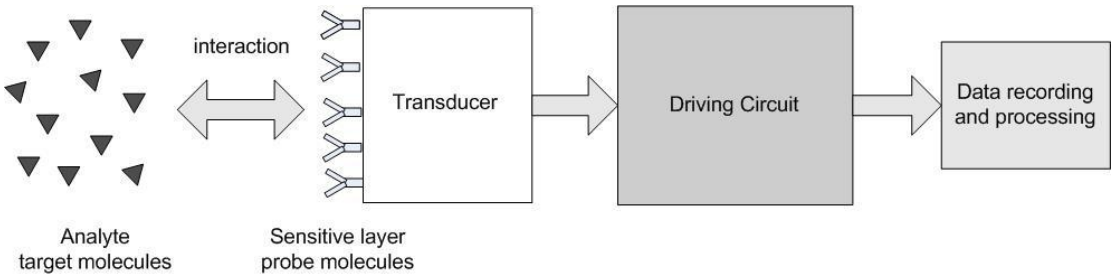
Εισαγωγή

Μικροσυστήματα εμφανίστηκαν για πρώτη φορά στις αρχές της δεκαετίας του 1960, αποσκοπώντας στον σχηματισμό αισθητήρων. Κίνητρο για την ανάπτυξή τους ήταν η ανάγκη για μείωση του κόστους των αισθητήρων. Αυτό θα μπορούσε να επιτευχθεί, αν υπήρχε τρόπος να τοποθετηθεί, ο αισθητήρας και το ολοκληρωμένο κύκλωμα ανάγνωσης του αισθητήρα στο ίδιο τσιπ. Έτσι ο όρος μικροσυστήματα έγινε γνωστός, παραπέμποντας στην ενσωμάτωση των αισθητήρων, των ενεργοποιητών και των ηλεκτρονικών επεξεργασίας σήματος σε ένα κοινό υπόστρωμα.

Η ανάπτυξη της μικροηλεκτρονικής και της μικρομηχανικής οδήγησε το παγκόσμιο ενδιαφέρον στον τομέα των μικροσυστημάτων, γνωστό ως MEMS (Micro Electro Mechanical Systems), καθώς και στην εφαρμογή τους σε διάφορες πτυχές της καθημερινής ζωής.

Οι αισθητήρες αποτελούν το 40% της αγοράς των MEMS και τα πλεονεκτήματα που παρουσιάζουν επεκτείνονται σε οικονομικές και τεχνολογικές ενότητες .

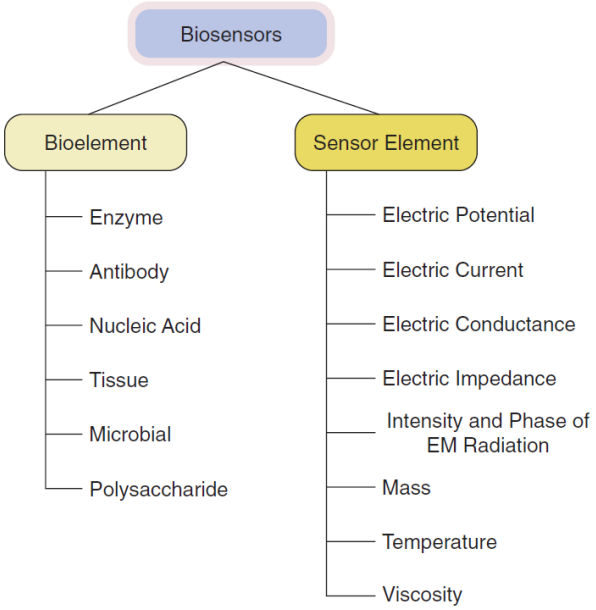
Αισθητήρας είναι μια συσκευή που ανιχνεύει ένα σήμα και το μετατρέπει σε μετρήσιμη ποσότητα. Ο τύπος των αισθητήρων που ανιχνεύουν συγκεκριμένες βιολογικές αντιδράσεις ονομάζονται βιοαισθητήρες. Οι βιοαισθητήρες αποτελούνται από τρία μέρη: το βιολογικό υλικό, το αισθητήριο όργανο και το κύκλωμα για την ανάγνωση του σήματος. Το βιολογικό υλικό στις περισσότερες περιπτώσεις είναι ακινητοποιημένα μόρια ανιχνευτές, τα οποία είναι επιλεκτικά στη σύνδεσή τους με μια συγκεκριμένη προς ανάλυση ουσία. Το αισθητήριο όργανο, μετατρέπει το σήμα που προκαλείται από την αντίδραση του ανιχνευτή και του μορίου στόχου, σε μετρήσιμο σήμα. Το σήμα αυτό μετατρέπεται τελικά σε πιο σταθερό και ενισχυμένο ηλεκτρικά σήμα μέσω του ηλεκτρικού κυκλώματος (Σχήμα 1**Σφάλμα! Το αρχείο προέλευσης της αναφοράς δεν βρέθηκε.**).



Σχήμα 1: Σχηματική απεικόνιση βιοαισθητήρα.

Οι βιοαισθητήρες κατηγοριοποιούνται είτε με βάση το είδος των βιομορίων, είτε με βάση τον μηχανισμό μετάδοσης της πληροφορίας όπως φαίνεται στο Σχήμα 2 **Σφάλμα! Το αρχείο προέλευσης της αναφοράς δεν βρέθηκε.**. Με βάση τον ηχανισμό μετάδοσης οι βιοαισθητήρες ταξινομούνται σε οπτικούς, ηλεκτροχημικούς,

μικρομηχανικούς και μαγνητικούς αισθητήρες. Επίσης, κατηγοριοποιούνται ως άμεσοι ή έμμεσοι και ως βιοκαταλυτικοί ή βιοσυγγένειας.



Σχήμα 2: Κατηγοριοποίηση των βιοαισθητήρων

Οι έμμεσοι αισθητήρες χρησιμοποιούν ετικέτες συνδεδεμένες με τις ουσίες προς ανίχνευση και μέσω αυτών των ετικετών εικονίζεται το γεγονός της αλληλεπίδρασης. Συνήθεις ετικέτες είναι οι δείκτες φθορισμού, ενεργά ένζυμα, μαγνητικά σφαιρίδια, ραδιενεργά υλικά ή κβαντικές τελείες. Η επισήμανση γίνεται συνήθως έμμεσα από τα μόρια στόχους, πριν την αλληλεπίδραση. Όταν απαιτείται έμμεση ανίχνευση, είναι πιθανό να ενσωματώνονται μερικά από τα απαραίτητα αντιδραστήρια μέσα στο αισθητήριο σύστημα έτσι ώστε να ελαχιστοποιείται το πλήθος των αντιδράσεων στο χώρο του αισθητήρα. Ωστόσο, η ανίχνευση μέσω ετικετών, παρουσιάζει κάποια μειονεκτήματα όπως το κόστος των ετικετών και τη σπατάλη χρόνου για τη διαδικασία της επισήμανσης. Επίσης σε πολλές περιπτώσεις, δεν είναι δυνατόν να παρακολουθείται η διαδικασία ανίχνευσης κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Τέλος, ειδικά στους αισθητήρες φθορισμού, χρειάζονται ογκώδη όργανα, με μεγάλο κόστος για την ανίχνευση του φθορισμού.

Στην προσπάθεια αποφυγής της χρήσης ετικετών στους αισθητήρες, η τεχνολογία οδηγήθηκε στους άμεσους αισθητήρες. Οι άμεσοι αισθητήρες σχεδιάζονται έτσι ώστε η βιολογική αλληλεπίδραση να δημιουργεί μία φυσική αλλαγή στο σήμα, αποφεύγοντας την προσθήκη διαφόρων αντιδραστηρίων, τα οποία απαιτούν ειδικό χειρισμό, αυξάνοντας το κόστος και μεγαλώνοντας την διάρκεια της διαδικασίας. Η ικανότητα να καταγράφονται άμεσα αναλύτες οδηγεί σε μία γρήγορη χρονικά απόκριση και σε μία σύντομη συνολικά μέθοδο. Ηλεκτρόδια, μεμβράνες, πιεζοηλεκτρικά υλικά, ή οπτικά ενεργά υλικά επιφανίων είναι αρκετά ευαίσθητα ώστε να συντάξουν ένα άμεσο βιοαισθητήρα. Ο αναλύτης αλληλεπιδρά με τον βιοαποδοχέα μεταβάλλοντας τις φυσικές ιδιότητες της επιφάνειας, όπως το ηλεκτρικό

δυναμικό, το δυναμικό μιας μεμβράνης, την ενδογενή πιεζοσυχνότητα, ή τις οπτικές ιδιότητες επιτρέποντας της μέτρηση της ουσίας – στόχου.

Οι βιοκαταλυτικοί αισθητήρες περιλαμβάνουν ένζυμα, μικροοργανισμούς, και στοιχεία ιστών τα οποία εμπλέκονται μέσω της καταλυτικής τους δραστηριότητα σε μία ειδική βιολογική αντίδραση. Οι βιοσυγγενείς αισθητήρες σχετίζονται με τη μοριακή αναγνώριση-ταυτοποίηση από αντισώματα, αποδοχείς ή προσδεμένες πρωτεΐνες.

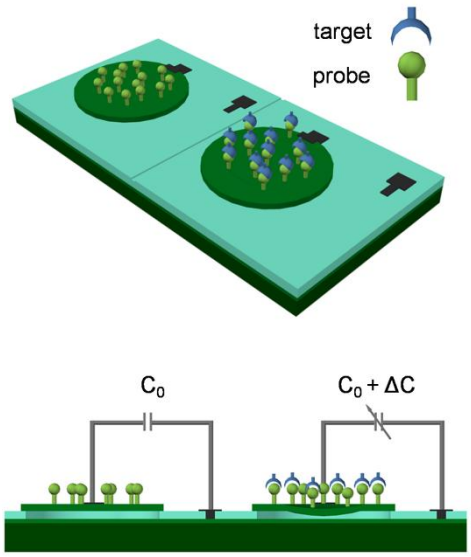
1.2.1 Αισθητήρες χωρητικότητας

Οι αισθητήρες χωρητικότητας αποτελούνται από δύο παράλληλους οπλισμούς και η χωρητικότητα δύνεται από τη σχέση:

$$\boldsymbol{C = \varepsilon_r \varepsilon_0 \frac{A}{d}} \qquad \textbf{\textit{Εξίσωση 1}}$$

Όπου ε_r, ε_0 είναι η σχετική διηλεκτρική σταθερά του μέσου μεταξύ των οπλισμών και η διηλεκτρική σταθερά του κενού αντίστοιχα. A είναι η επιφάνεια των οπλισμών και d η μεταξύ τους απόσταση. Είναι προφανές ότι μόνο με τρεις τρόπους, μπορεί να αλλάξει η χωρητικότητα μιας τέτοιας διάταξης: α) αλλάζοντας το εμβαδόν A της επιφάνειας των οπλισμών, β) αλλάζοντας την απόσταση d μεταξύ των οπλισμών, και γ) μεταβάλλοντας τη διηλεκτρική σταθερά εr του υλικού μεταξύ των οπλισμών.

Ως τώρα, οι βιολογικοί αισθητήρες τύπου χωρητικότητας βασίζονται είτε σε μεταβολές της απόστασης των οπλισμών είτε της διηλεκτρικής σταθεράς του υλικού. Στην πρώτη περίπτωση ανήκουν δομές όπου ένας από τους δύο οπλισμούς έχει τη δυνατότητα να κινείται, είναι δηλαδή εύκαμπτος. Συνήθως ο οπλισμούς αυτός είναι κάποια μικροδοκός ή μεμβράνη (Σχήμα 3) επικαλυμμένη με το χημικά ευαίσθητο στρώμα και λειτουργεί σε δυναμική ή στατική παραμόρφωση. Αυτοί οι αισθητήρες, γνωστοί και ως διστρωματικοί, είτε συντονίζονται στην ιδιοσυχνότητά τους και, επειδή μεταβάλλεται η μάζα τους, όταν αντιδράσουν με τον αναλύτη αλλάζει η ιδιοσυχνότητά τους είτε αλλάζει η χωρητικότητά τους λόγω της στατικής παραμόρφωσης του εύκαμπτου οπλισμού που οφείλεται σε αλλαγές στην επιφανειακή τους τάση. Η αιτία των μεταβολών της επιφανειακής τάσης για τους χημικούς αισθητήρες είναι συνήθως η διόγκωση του πολυμερούς όταν απορροφά έναν αναλύτη ενώ για τους βιοαισθητήρες η κατάσταση είναι αρκετά πιο πολύπλοκη και σχετίζεται με τις δυνάμεις που ασκούνται μεταξύ των βιομορίων.



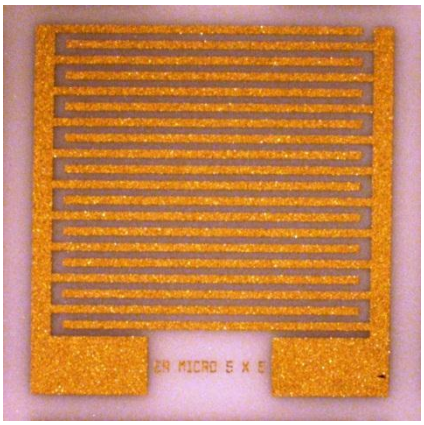
Σχήμα 3: Απεικόνιση αισθητήρα χωρητικότητας με μεμβράνες[34]

Σε κάθε περίπτωση, οι μεταβολές των αποστάσεων μεταξύ των οπλισμών μπορούν να μετρηθούν μέσω της μεταξύ τους χωρητικότητας με βάση τη σχέση:

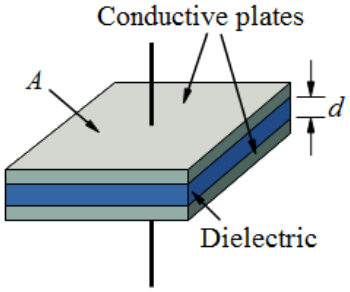
$$\boldsymbol{C = \varepsilon_r \varepsilon_0 \iint \left(\frac{ds}{d-w(x,y)}\right)} \qquad \textbf{\textit{Εξίσωση 2}}$$

Όπου w(x,y) είναι η μετατόπιση του εύκαμπτου οπλισμού.

Στη δεύτερη περίπτωση αισθητήρων τύπου χωρητικότητας ανήκουν οι ηλεκτροχημικοί αισθητήρες. Η αρχή λειτουργίας τους βασίζεται στο γεγονός ότι όταν γίνει η βιολογική αντίδραση , αλλάζουν οι ηλεκτρικές ιδιότητες του ευαίσθητου στρώματος ή το πάχος του, με αποτέλεσμα να μεταβάλλεται και η χωρητικότητα μεταξύ των οπλισμών. Σε αυτή τη κατηγορία ανήκουν τα εμπλεκόμενα ηλεκτρόδια (Σχήμα 4) και οι αισθητήρες παράλληλων πλακών (Σχήμα 5).



Σχήμα 4: Απεικόνιση αισθητήρα χωρητικότητας με εμπλεκόμενα ηλεκτρόδια [35].



Σχήμα 5: Απεικόνιση αισθητήρα χωρητικότητας παράλληλων πλακών [36].

1.2.2 Ηλετροχημικοί αισθητήρες

Στις περισσότερες κατηγορίες αισθητήρων χρησιμοποιείται μεγάλη ποικιλία στοιχείων αναγνώρισης. Στους ηλεκτροχημικούς αισθητήρες, χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο ένζυμα, λόγω των βιοκαταλυτικών ικανοτήτων τους. Οι ηλεκτροχημικοί αισθητήρες μπορούν να ανιχνεύσουν μια βιολογική αντίδραση μετρώντας σήματα ρεύματος (αμπερομετρικοί), τάσης (ποτενσιομετρικοί), αγωγιμότητας και εμπέδησης.

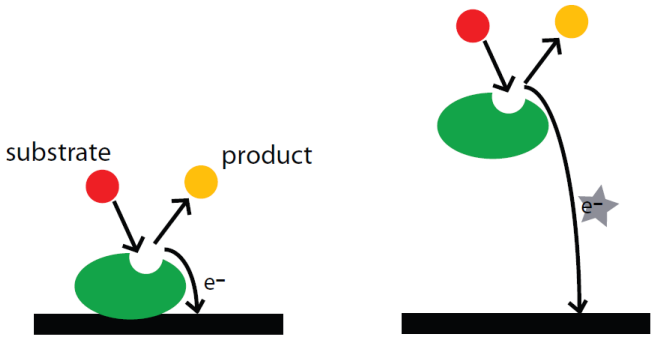
Δεδομένου ότι οι αντιδράσεις που ανιχνεύονται από ηλεκτροχημικούς αισθητήρες γίνονται πάνω σε ηλεκτρόδια, είναι λογικό τα ηλεκτρόδια να παίζουν σημαντικό ρόλο στο σήμα που καταγράφει ο αισθητήρας. Σύμφωνα με τη λειτουργία του κάθε ηλεκτροδίου, πρέπει να γίνει επιλογή σε κατάλληλο υλικό και διαστάσεις, παράγοντες που επηρεάζουν την ικανότητα ανίχνευσης του ηλεκτροδίου. Συνήθως χρησιμοποιούνται: ένα ηλεκτρόδιο αναφοράς, ένα βοηθητικό και ένα ηλεκτρόδιο εργασίας. Το ηλεκτρόδιο αναφοράς, βρίσκεται μακριά από το μέρος που πραγματοποιείται η αντίδραση, έτσι ώστε να διατηρεί ένα σταθερό δυναμικό. Το ηλεκτρόδιο εργασίας χρησιμεύει για τη μέτρηση του σήματος από την βιολογική αντίδραση, ενώ το βοηθητικό ηλεκτρόδιο χρησιμεύει για την εφαρμογή ρεύματος στο ηλεκτρόδιο εργασίας. Για την κατασκευή ηλεκτροδίων, χρησιμοποιούνται συνήθως υλικά όπως πλατίνα, χρυσός, άνθρακας και πυρίτιο.

Αμπερομετρικοί αισθητήρες

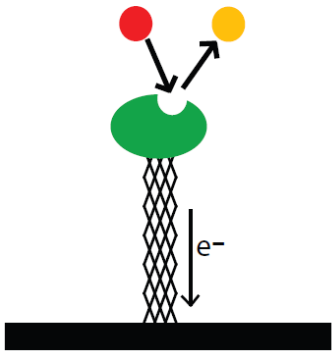
Οι αμπερομετρικοί αισθητήρες καταγράφουν δεδομένα συνεχών μετρήσεων που προκύπτουν από την οξείδωση ή τη μείωση ηλεκτροενεργών ειδών σε βιοχημικές αντιδράσεις. Το ρεύμα που καταγράφεται χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση των ειδών που συμμετέχουν στην αντίδραση. Συνήθως οι μετρήσεις των αμπερομετρικών αισθητήρων, καταγράφονται σε σταθερό δυναμικό. Οι αισθητήρες στους οποίους γίνεται καταμέτρηση ρεύματος κατά τη διάρκεια ελεγχόμενων διακυμάνσεων του δυναμικού, αναφέρονται ως βολτομετρικοί.

Η απόκριση ενός αμπερομετρικού αισθητήρα εξαρτάται , εκτός από τις προδιαγραφές του αισθητήρα και από τη συγκέντρωση των βιομορίων-στόχων. Επιπλέον σε πολλές περιπτώσεις για την ανίχνευση οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων χρειάζεται η μεσολάβηση επιπλέον διαλυμάτων, εφόσον πολλά βιομόρια-στόχοι δεν είναι ικανά να κάνουν οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις.

Στη πλειοψηφία των περιπτώσεων οι αμπερομετρικοί αισθητήρες ανιχνεύουν ενζυμικές αντιδράσεις, όπου το ένζυμο λειτουργεί ως ηλεκτροκαταλύτης. Ηλεκτρόνια μεταφέρονται άμμεσα από το ηλεκτρόδιο, στο ακινητοποιημένο μόριο και αντίστροφα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να επιβραδύνεται η μεταφορά ηλεκτρονίων όσο μεγαλώνει η απόσταση του ενζύμου από την επιφάνια του ηλεκτροδίου (Σχήμα 6), άρα να μειώνεται και η ευαισθησία του αισθητήρα. Η λύση για το πρόβλημα αυτό δόθηκε με τη χρήση μεσολαβητών. Οι μεσολαβητές είναι αγώγιμα μόρια, τα οποία σκοπό έχουν τη μείωση της απόστασης του ενζύμου από το ηλεκτρόδιο. Ως μεσολαβητές, χρησιμοποιούνται ευρέως τα τελευταία χρόνια CNTs, τα οποία μεταφέρουν ηλεκτρόνια μεταξύ ενζύμου και ηλεκτροδίου (Σχήμα 7).



Σχήμα 6: Απεικόνιση μεταφοράς ηλεκτρονίων σε αμπερομετρικούς αισθητήρες χωρίς τη χρήση μεσολαβητών[37].



Σχήμα 7: Απεικόνιση μεταφοράς ηλεκτρονίων σε αμπερομετρικούς αισθητήρες με τη χρήση CNTS ως μεσολαβητές[37].

Ποτενσιομετρικοί

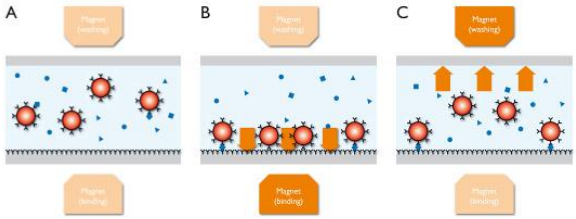
Οι ποτενσιομετρικοί αισθητήρες, μετρούν την συσσώρευση δυναμικού στο ηλεκτρόδιο εργασίας σε σύγκριση με το ηλεκτρόδιο αναφοράς, όταν δεν υπάρχει ροή ρεύματος. Ουσιαστικά με τους ποτενσιομετρικούς αισθητήρες γίνεται καταμέτρηση των ιόντων σε ηλεκτροχημικές αντιδράσεις.

Αγωγιμότητας

Οι αισθητήρες αγωγιμότητας μετρούν την ικανότητα μιας ουσίας (πχ: διαλύματα ηλεκτρολυτών) ή ενός μέσου (πχ: νανοδομές) να επιτρέπει την διέλευση ηλεκτρικού ρεύματος μεταξύ ηλεκτροδίων ή κόμβων αναφοράς.

1.2.3 Μαγνητικοί βιοαισθητήρες

Το 1856 ανακαλύφθηκε από τον William Thomson η ιδιότητα των υλικών να αλλάζουν την ηλεκτρική αντίστασή τους παρουσία εξωτερικού μαγνητικού πεδίου. Η ιδιότητα αυτή των υλικών χρησιμοποιείται ως μέθοδος ανίχνευσης στους μαγνητικούς βιοαισθητήρες. Παρουσία εξωτερικού μαγνητικού πεδίου, οι αλλαγές της ηλεκτρικής αντίστασης μπορούν να ανιχνευτούν ως αλλαγές τάσης εφόσον διατηρείται σταθερό ρεύμα (Σχήμα 8). Για την ανίχνευση μέσω των μαγνητικών αισθητήρων είναι απαραίτητη η χρήση μαγνητικών δεικτών, οι οποίοι τοποθετούνται στο βιομόριο-στόχο. Όταν γίνεται η αντίδραση του βιομορίου –στόχου με το βιομόριο-ανιχνευτή μεταφέρονται και οι μαγνητικοί δείκτες στον αισθητήρα. Εφαρμόζοντας εξωτερικό πεδίο στον αισθητήρα, παράγεται ένα μαγνητικό πεδίο από τους μαγνητικούς δείκτες, το οποίο όταν ανιχνεύεται προσδιορίζεται ο αριθμός των μαγνητικών δεικτών και κατά συνέπεια των βιομορίων που έχουν αντιδράσει.



Σχήμα 8: Απεικόνιση ανίχνευσης μαγνητικών αισθητήρων, με δείκτες που έχουν τοποθετηθεί στο συμπληρωματικό βιομόριο- στόχο [38].

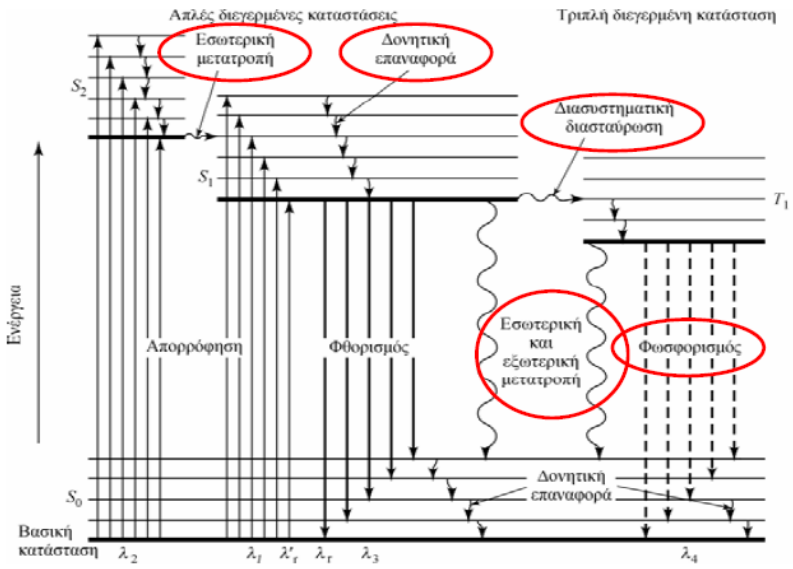
1.2.4 Οπτικοί αισθητήρες

Οι οπτικοί αισθητήρες μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε ένα εύρη φάσμα εφαρμογών, από ανίχνευση στη διάπλαση των βιομορίων μέχρι ανίχνευση μόλυνσης σε ύδατα. Οι

οπτικοί αισθητήρες μπορούν να χωριστούν σε δυο κατηγορίες. Σε αυτούς που ανιχνεύουν άμεσα ένα βιομόριο-στόχο μέσω κάποιας ιδιότητάς του όπως η απορρόφηση, και σε αυτούς που ανιχνεύουν έμμεσα έναν βιομόριο-στόχο λόγω της αλλαγής στις οπτικές ιδιότητες κάποιου ενδιάμεσου φορέα, όπως μιας χρωστικής ουσίας. Η δεύτερη κατηγορία οπτικών αισθητήρων είναι ιδιαίτερα χρήσιμη, αν ληφθεί υπόψη ότι τα περισσότερα βιομόρια-στόχοι δεν έχουν ανιχνεύσιμες οπτικές ιδιότητες.

Αισθητήρες φωταύγειας

Φωταύγεια είναι η διαδικασία κατά την οποία ένα μόριο εκπέμπει φώς ή αντιδρά σε φωτεινό ερέθισμα. Οι αντιδράσεις στις οποίες τα βιομόρια εκπέμπουν φως μετά από απορρόφηση, ανήκουν στην κατηγορία φθορισμού ή φωσφορισμού. Μέχρι σήμερα, ο φθορισμός είναι το κυριότερο μέσο φωταύγειας που χρησιμοποιείται σε βιοαισθητήρες, εφόσον εύκολα ανιχνεύονται αντιδράσεις στις οποίες εκπέμπεται μετρήσιμο φως. Η διαχωριστική γραμμή μεταξύ φθορισμού και φωσφορισμού βρίσκεται στο χρόνο ζωής των φωτονίων που εκπέμπονται, εφόσον στο φθορισμό είναι της τάξης των nanosecond ενώ του φωσφορισμού είναι πολύ μεγαλύτερος.



Σχήμα 9: Ενεργειακά διαγράμματα μορίων που εμφανίζουν φωταύγεια.

Για το φθορισμό των βιομορίων σε ορισμένες περιπτώσεις είναι απαραίτητη η χρήση εξωγενών παραγόντων φθορισμού (δείκτες φθορισμού), εφόσον πολλά βιομόρια δεν φθορίζουν από τη φύση τους. Η χρήση δεικτών παρέχει μεγαλύτερη ευαισθησία στο φθορισμό, μειώνοντας όμως την αξιοπιστία εφόσον είναι πιθανή η αλλαγή των ιδιοτήτων των φθορίζουσων πρωτεϊνών ανεξάρτητα με το μόριο που επισυνάπτονται.

Ο φθορισμός είναι σύνηθες μέσω ανίχνευσης βιολογικών αντιδράσεων. Απαραίτητα όργανα για ανίχνευση φθορισμού είναι τα φασματοφωτόμετρα και τα μικροσκόπια φθορισμού. Όλα τα όργανα στα οποία ανιχνεύεται φθορισμός, αποτελούνται από μια πηγή φωτός η οποία διεγείρει τους δείκτες, έτσι ώστε να υπάρχει εκπομπή. Στη συνέχεια το φώς αυτό συλλέγεται και φιλτράρεται από κατάλληλα οπτικά, έτσι ώστε να απομονωθεί από μη επιθυμητή φωτεινή ακτινοβολία.

Επισήμανση με δείκτες φθορισμού

Κατά την διαδικασία επισήμανσης μορίων με δείκτες φθορισμού, αναπτύσσονται ομοιοπολικοί δεσμοί μεταξύ φθορίζουσον πρωτεϊνών με τα βιολογικά μόρια. Αυτό επιτυγχάνεται με τη σύνδεση της πρωτείνης φθορισμού σε μια λειτουργική ομάδα του βιομορίου. Τα συνηθέστερα μόρια στα οποία γίνεται επισήμανση φθορισμού είναι αντισώματα, πρωτείνες, πεπτίδια και αμινοξέα.

Συνηθέστεροι δείκτες φθορισμού είναι οι: Fluorescein, Rhodamine, Alexa Fluors, Dyilight Fluors, ATTO dyes. Η Fluorescein είναι μια συνθετική οργανική ένωση η οποία διαλύεται σε νερό ή σε κάποια αλκοόλη. Απορροφά φως στα 494nm (min), ενώ εκπέμπει φώς στα 521nm (max). Οι Rhodamine είναι οικογένεια χημικών ουσιών που χρησιμεύουν ως ιχνηθέτες φθορισμού. Υπάρχουν τρείς ιχνηθέτες-Rhodamine, οι Rhodamine B, Rhodamine 6G, Rhodamine 123. Διαλύονται στο νερό, τη μεθανόλη και την αιθανόλη και είναι τοξικές. Απορροφούν φώς στα 510nm (max), 480 nm (max), 480 nm (max) αντίστοιχα, ενώ εκπέμπουν από 500 έως 600 nm. Η οικογένεια ιχνηθετών φθορισμού Alexa Fluors έχουν φάσματα διέγερσης και εκπομπής που καλύπτουν το ορατό και ένα μέρος από το υπέρυθρυθρο, όπως ακριβώς και οι οικογένειες ιχνηθετών Dyilight Fluors και ATTO dyes.

Αισθητήρες χρωματομετρίας.

Ενώ οι αισθητήρες φωταύγειας ανιχνεύουν την εκπομπή φωτός, οι αισθητήρες χρωματομετρίας ανιχνεύουν τις αλλαγές στο φάσμα απορρόφησης. Κατά την αντίδραση ενός δείκτη με ένα βιομόριο, μετατοπίζεται το φάσμα απορρόφησής του. Η μετατόπιση υπολογίζεται μετρώντας είτε την απορρόφηση είτε την ανελαστικότητα της μήτρας στην οποία περιέχεται ο δείκτης. Για να γίνει ανίχνευση από αισθητήρες χρωματομετρίας, είναι απαραίτητο να γίνονται παράλληλα μετρήσεις σε διαλύματα αναφοράς με γνωστή συγκέντρωση δεικτών.

1.3 Βιομόρια ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται σε αισθητήρες.

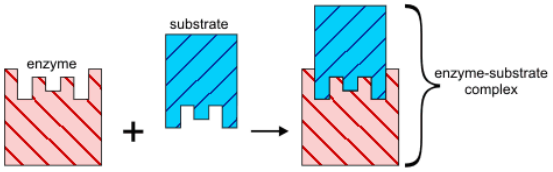
Υπάρχει ευρύ φάσμα μορίων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιομόρια-ανιχνευτές στη φύση. Τα μόρια αυτά μπορούν να χωριστούν σε δυο κατηγορίες, ανάλογα αν γίνονται βιοκαταλυτικές αντιδράσεις ή αντιδράσεις συγγένιας. Για βιοκαταλυτικές αντιδράσεις χρησιμοποιούνται ένζυμα, κύτταρα, τμήματα ιστών και στις αντιδράσεις συγγένιας χρησιμοποιούνται μόρια όπως νουκλεικά οξέα, αντισώματα κ.τ.λ.. Σε κάθε περίπτωση είναι απαραίτητο να χρησιμοποιούνται μόρια σε βιοαισθητήρες, στα οποία να εξασφαλίζεται επιλεκτική σύνδεσή τους με τα βιομόρια- στόχους. Παρακάτω παρατίθενται ορισμένα ευρέως χρησιμοποιημένα βιομόρια-ανιχνευτές, με τα αντίστοιχα βιομόρια-στόχους.

1.3.1 Ένζυμα

Τα ένζυμα είναι από τα σημαντικότερα μόρια στη βιολογία. Είναι πρωτεΐνες που δρουν ως καταλύτες, βοηθώντας την διεξαγωγή χημικών αντιδράσεων. Κάθε ένζυμο εξειδικεύεται στην κατάλυση μιας μόνο αντίδρασης, ενώ μπορεί να χρησιμοποιηθεί παραπάνω από μια φορά. Όπως και σε όλες τις πρωτεΐνες, το σχήμα των ενζύμων καθορίζει τη λειτουργία τους και είναι υπεύθυνο για την επιλεκτικότητά τους. Τα περισσότερα ένζυμα αποτελούνται από πρωτεΐνες και συμπαράγοντες. Συνήθως οι πρωτεΐνες είναι σφαιρικές και συνδέονται με τους συμπαράγοντες με ομοιοπολικούς δεσμούς, φτιάχνοντας έτσι τις δευτεροταγείς και τριτοταγείς δομές των ενζύμων.

Συμπαράγοντες των ενζύμων μπορούν να είναι είτε οργανικές ομάδες (προσθετικές ομάδες), είτε κατιόντα (ενεργοποιητές) τα οποία προσδένονται με το ενεργό κέντρο του ενζύμου δίνοντάς του θετικό φορτίο, είτε οργανικά μόρια όπως οι βιταμίνες και τα συνένζυμα που δεν είναι μόνιμα συνδεδεμένα με τα ένζυμα.

Για να κατανοηθεί ο σημαντικός ρόλος των ενζύμων, πρέπει να επισημανθεί πως ο τρόπος αντίδρασης δυο μορίων στη βιολογία είναι η σύγκρουση. Τα μόρια πρέπει να συγκρουστούν με συγκεκριμένο προσανατολισμό, έχοντας ενέργεια μεγαλύτερη της ενέργειας ενεργοποίησης της αντίδρασης. Με τη χρήση ενζύμων, γίνεται μια ενδιάμεση αντίδραση, πολύ μικρότερης ενέργειας από την ενέργεια ενεργοποίησης, κατά την οποία τα μόρια προσανατολίζονται απευθείας (*Σχήμα 10*). Οι ομοιοπολικοί δεσμοί μεταξύ των πρωτεϊνών και των συμπαραγόντων σε ένα ένζυμο, καθιστούν το ένζυμο ελευθέριο να περιστρέφεται και να παίρνει το σχήμα του βιομορίου που πρόκειται να αντιδράσει. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την άμεση αντίδραση του ενζύμου με το βιομόριο και την ταχύτατη παραγωγή του τελικού προϊόντος.



Σχήμα 10: Μοντέλο αναπαράστασης της λειτουργίας των ενζύμων. Ως υπόστρωμα ορίζεται το βιομόριο που αντιδρά με το ένζυμο[39].

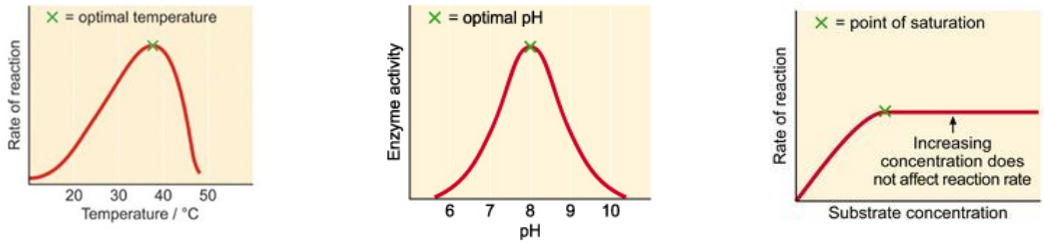
Ένα από τα σημαντικότερα ζητήματα στη χρήση των ενζύμων σε βιοαισθητήρες, είναι η σταθερότητά τους. Αυτό περιλαμβάνει τόσο τη διάρκεια ζωής τους, όσο και τη λειτουργική σταθερότητά τους. Τα ένζυμα είναι πολύ ευαίσθητα στις αλλαγές τους περιβάλλοντος. Απενεργοποίηση ενζύμων ή αναστολή συναντάται συχνά λόγω παρουσίας χημικών ή λόγω μεταβολών στη θερμοκρασία και το pH. Ο χρόνος ζωής αισθητήρων που χρησιμοποιούν ένζυμα περιορίζεται στις 2-8 εβδομάδες, λόγω απώλειας της δραστικότητας των ενζύμων.

Οι παράγοντες που επηρεάζουν τη δραστικότητα των ενζύμων είναι: Η θερμοκρασία, το pH και η πυκνότητά τους υποστρώματος.

Καθώς αυξάνεται η θερμοκρασία, τα αντιδρώντα μόρια έχουν περισσότερη κινητική ενέργεια. Αυτό αυξάνει τις πιθανότητες επιτυχούς σύγκρουσης. Υπάρχει όμως μια κρίσιμη θερμοκρασία στην οποία η καταλυτική δράση του ενζύμου παίρνει τη μέγιστη τιμή της (*Εικόνα 11*). Μετά από τη θερμοκρασία αυτή, η δομή του ενζύμου αρχίζει να καταρρέει, εφόσον σπάνε οι ομοιοπολικοί δεσμοί των ενζύμων.

Η κατάρρευση της δομής του ενζύμου, εξηγεί και την εξάρτηση της λειτουργικότητας του ενζύμου από το pH. Κάθε ένζυμο παρουσιάζει τη μέγιστη δραστικότητά του σε μια στενή περιοχή του pH, εφόσον οι απότομες μεταβολές του, μπορούν να καταστρέψουν τους ομοιοπολικούς δεσμούς του ενζύμου (*Εικόνα 11*).

Τέλος είναι λογικό για μια συγκεκριμένη συγκέντρωση ενζύμου, να αυξάνεται το ποσοστό ταχύτητας παραγωγής προϊόντων, όσο αυξάνεται το υπόστρωμα. Αυτή η αύξηση, κάποια στιγμή σταματάει και επέρχεται κορεσμός. Αυτό συμβαίνει γιατί κάθε φορά πρέπει να απελευθερώνεται το ένζυμο για να φιλοξενήσει καινούρια βιομόρια (*Εικόνα 11*).



Εικόνα 11 : Παρουσία εξάρτησης λειτουργικότητας του ενζύμου από τη θερμοκρασία, το pH και την πυκνότητα των βιομορίων- υποστρώματος[39].

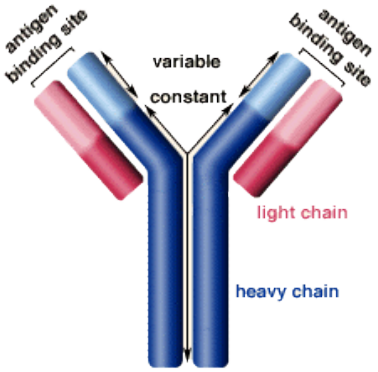
Η πλειοψηφία των ενζύμων χρησιμοποιείται σε ηλεκτροχημικούς αισθητήρες όπου από την πυκνότητα του ρεύματος υπολογίζεται η συγκέντρωση και η δραστηριότητα των ενζύμων. Στη πλειοψηφία των αισθητήρων χρησιμοποιείται το ένζυμο της οξειδάσης της γλυκόζης. Το ένζυμο αυτό καταλύεται σύμφωνα με την αντίδραση:

$$O_2 + glucose \xrightarrow{GOx} H_2O_2 + gluconic\ acid$$

Στις αντιδράσεις κατάλυσης, γίνεται μεταφορά ηλεκτρονίων. Αυτός είναι ο κυριότερος λόγος που τα ένζυμα χρησιμοποιούνται συνήθως σε ηλεκτροχημικούς αισθητήρες.

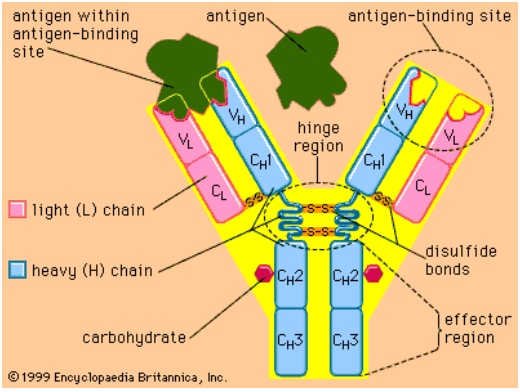
1.3.2 Αντισώματα

Τα αντισώματα είναι πρωτεΐνες που σχετίζονται με το ανοσοποιητικό σύστημα και ονομάζονται ανοσοσφαιρίνες. Κάθε αντίσωμα αποτελείται από τέσσερα είδη πολυπεπτιδίων τα οποία ενώνονται και φτιάχνουν τη χαρακτηριστική μορφή του αντισώματος (*Σχήμα 11*).



Σχήμα 11: Χαρακτηριστική δομή αντισώματος [40].

Η αλληλουχία αμινοξέων στις άκρες του «Y» ποικίλλει σημαντικά μεταξύ των διάφορων αντισωμάτων. Η περιοχή αυτή αποτελείται από 110-130 αμινοξέα τα οποία δίνουν στο αντίσωμα την ιδιαιτερότητά του έτσι ώστε να δεσμεύεται με ένα μόνο αντιγόνο. Η περιοχή αυτή βρίσκεται στα άκρα των πολυπεπτιδικών αλυσίδων . Κατά την πρόσδεση του αντιγόνου με το αντίσωμα, η αλυσίδα του αντισώματος ανοίγει για να μπει το αντιγόνο, ενώ δημιουργούνται δεσμοί υδρογόνου, δυνάμεις Van der Waals και ηλεκτροστατικές δυνάμεις για να πραγματοποιηθεί η πρόσδεση (*Σχήμα 12*). Αυτές οι αλληλεπιδράσεις συχνά δημιουργούν μεγάλες και ασυνεχείς περιοχές στα μόρια, βελτιώνοντας την επιλεκτικότητα των αντισωμάτων.



Σχήμα 12: Αναπαράσταση πρόσδεσης αντιγόνου-αντισώματος [41].

Τα αντισώματα χρησιμεύουν στους αισθητήρες, λόγω της υψηλής εξειδίκευσης στη δέσμευσή τους. Για την ανίχνευση ενός αντιγόνου ακινητοποιείται στην επιφάνεια του αισθητήρα, ένα αντίσωμα. Είναι σημαντικός ο τρόπος ακινητοποίησης του αντισώματος, εφόσον η πρόσδεσή του με το αντιγόνο εξαρτάται από τον προσανατολισμό του. Απαραίτητη είναι και η προσοχή στη συγκέντρωση των αντισωμάτων, η οποία δεν πρέπει να είναι πολύ μεγάλη. Συχνά τα αντισώματα χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση ασθενειών, πρωτεϊνών, λιπιδίων και ναρκωτικών ουσιών.

1.3.3 Απτίνες

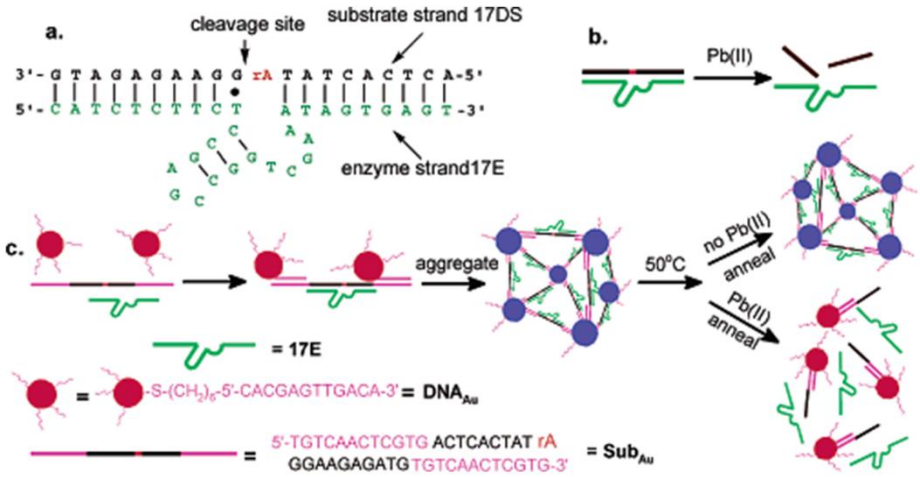
Οι απτίνες είναι ολιγονουκλεοτίδια ή πεπτίδια που συνδέονται με ένα συγκεκριμένο βιομόριο-στόχο. δημιουργούνται από την επιλογή τυχαίων βάσεων, όμως συναντώνται και στη φύση σε riboswitches. Ταξινομούνται ως DNA ή RNA απτίνες ή απτίνες πεπτιδίων.

Οι απτίνες νουκλεικών οξέων κατασκευάζονται μέσω της μεθόδου SELEX, έτσι ώστε να συνδέονται με πρωτεΐνες, άλλα νουκλεικά οξέα, κύτταρα, ιστούς ή και οργανισμούς. Είναι χρήσιμες σε βιοτεχνολογικές και θεραπευτικές εφαρμογές δεδομένου ότι προσφέρουν ιδιότητες αναγνώρισης, αντίστοιχες των αντισωμάτων. Σε σχέση με τα αντισώματα πλεονεκτούν εφόσον παράγονται με χημική σύνθεση, έχουν επιθυμητές ιδιότητες και δεν προκαλούν το ανοσολογικό σύστημα. Κατασκευάστηκαν για πρώτη φορά σε δύο εργαστήρια, το 1990. Στο πρώτο χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος SELEX και στο δεύτερο έγινε in vitro κατασκευή. Το όνομα των απτινών δόθηκε από το δεύτερο εργαστήριο (Szostak lab) από τη λατινική λέξη Aptus που σημαίνει «κάτι να ταιριάζει». Από το εργαστήριο αυτό επισημάνθηκε δύο χρόνια αργότερα ότι δεν υπάρχουν διαφορές ανάμεσα στις DNA και στις RNA απτίνες. Ενώ η κατασκευή των απτινών είχε ξεκινήσει πολύ νωρίτερα, η εφαρμογή τους προτάθηκε για πρώτη φορά το 2002 από τις ομάδες των Ronald Breaker και

Evgeny Nudler, όταν ανακαλύφθηκε το riboswitch, το οποίο παρουσιάζει παρόμοια χαρακτηριστικά αναγνώρισης με αυτά των απτινών.

Τα περισσότερα από τα ερευνητικά άρθρα τα οποία έχουν δημοσιευθεί αναφέρονται στην πειραματική αναγνώριση απτινών, οι οποίες προσδένονται στις συγκεκριμένες ουσίες και δεν προχωρούν στην πρακτική εφαρμογή των ευρεθέντων αλληλουχιών. Ένα από τα πρώτα άρθρα που δημοσιεύθηκαν, αναφερόταν στην ταυτοποίηση απτινών που προσδένονται σε χλωριωμένους αρωματικούς υδρογονάνθρακες η οποίοι ήταν ακινητοποιημένοι σε μαγνητικά σωματίδια[42]. Έχουν επίσης βρεθεί RNA απτίνες που προσδένονται σε υδρόφοβους αρωματικούς υδρογονάνθρακες που βρίσκονται σε κόλλες και χρωστικές ουσίες και είναι καρκινογόνοι[0]. Τέλος, έχουν ταυτοποιηθεί RNA απτίνες για την ανίχνευση της μικροκυστίνης LR, ενός πεπτιδίου που παράγεται από τα κυανοβακτήρια και είναι ηπατο-τοξικό [43].

Εξαιρετικό ενδιαφέρον επίσης παρουσιάζει και η χρήση DNA ή RNA ενζύμων (DNAzyme, RNAzyme) για την ανίχνευση μετάλλων, τα οποία παρουσιάζουν μια ρυθμιζόμενη από ιόντα μετάλλου δραστικότητα[44]. Ένα πολύ χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η ανίχνευση μολύβδου με την χρήση DNA ενζύμων[45] (*Σχήμα 13*).



Σχήμα 13: Ανίχνευση μολύβδου με την χρήση DNA ενζύμων. (a, b). (c): Για την μέτρηση χρησιμοποιήθηκαν νανοσωματίδια χρυσού τροποποιημένα με ένα 12μερές συμπληρωματικό των επιμηκύνσεων στο 3' και 5΄άκρο της αλληλουχίας 17DS. Εν τη απουσία του μολύβδου τα νανοσωματίδια δημιουργούν συμπλέγματα μπλε χρώματος, εν αντιθέσει με το κόκκινο χρώμα που εμφανίζεται όταν ο μόλυβδος είναι παρών.

Επιπλέον, οι διατάξεις αισθητήρων απτινών έχουν χρησιμοποιηθεί και για την ανίχνευση παραγόντων βιολογικού-τρομοκρατικού πολέμου, όπως βακτηρίων, τοξινών, ιών κ.α. Για παράδειγμα, έγινε χρήση μαγνητικών σφαιριδίων τόσο για την επιλογή όσο και για την αναγνώριση απτινών ενάντια σε σπόρους του βακίλου του άνθρακα[46], της τοξίνης της χολέρας και της εντεροτοξίνης β του σταφυλόκοκκου,

οι δε προαναφερθέντες αναλύτες ανιχνεύθηκαν σε συγκεντρώσεις της κλίμακας των pM[47].

Στην κατηγορία των φυτικών τοξίνων, έχουν δημοσιευθεί δύο ερευνητικές εργασίες, οι οποίες αφορούν την ρικίνη[48] και την αβρίνη[49]. Μετά από την εισπνοή τους μπορεί να εμφανιστεί τοπικός ερεθισμός του αναπνευστικού μέσα σε μερικές ώρες, ακολουθούμενος από πιο σοβαρές πνευμονικές βλάβες με ανεπάρκεια, αιμόπτυση έως και θάνατο. Για την μεν πρώτη επιλέχθηκε μια RNA απτίνη ενώ για την αβρίνη χρησιμοποιήθηκε μια DNA απτίνη.

Τέλος όσον αφορά την χρήση των διατάξεων απτινών για την ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών και τοξίνων στα τρόφιμα κατασκευάσθηκαν αισθητήρες για την ανίχνευση δύο βακτηρίων τα οποία μεταδίδονται μέσω της κατανάλωσης ωμού ή μη καλά μαγειρεμένου κρέατος, του *Campylobacter jejuni[50]* και του *Francisella tularensis[51]*, όπως και για την πρίον πρωτεΐνη PrP[52]. Για την παρεμπόδηση της δράσης τους, επιλέχθηκε μια RNA απτίνη η οποία με την πρόσδεση σε μια πρωτεΐνη της σαλμονέλας (*Salmonella enterica* serovar Typhi*)* την εμποδίζει να εισέρθει στον ανθρώπινο οργανισμό.

1.3.4 Φωτοσυστήματα I,II

Η φωτοσύνθεση περιλαμβάνει τη δέσμευση του διοξειδίου του άνθρακα και την αναγωγή του σε υδατάνθρακες, που αξιοποιούνται στο μεταβολισμό των ετερότροφων οργανισμών. Η ολική αντίδραση της φωτοσύνθεσης μπορεί να γραφεί ως εξής:

$$CO_2 + 2H_2A \rightarrow (CH2O) + H_2O + 2A$$

Το H_2A είναι ένα αναγωγικό που ποικίλει ανάλογα με το είδος του φωτοσυνθετικού οργανισμού και το CH2O συμβολίζει τον υδατάνθρακα που προκύπτει. Τα φυτά, τα άλγη και τα κυανοβακτήρια χρησιμοποιούν ως αναγωγικό το H_2O και η ολική αντίδραση για τους οργανισμούς αυτούς είναι:

$$CO_2 + H_2O \rightarrow (CH2O) + O_2$$

Το γεγονός ότι το αρχικό αναγωγικό δεν είναι κατάλληλο για να ανάγει άμεσα το CO_2 υπερνικάται με τη φωτοχημική παραγωγή ενός ισχυρότερου αναγωγικού, του NADPH.

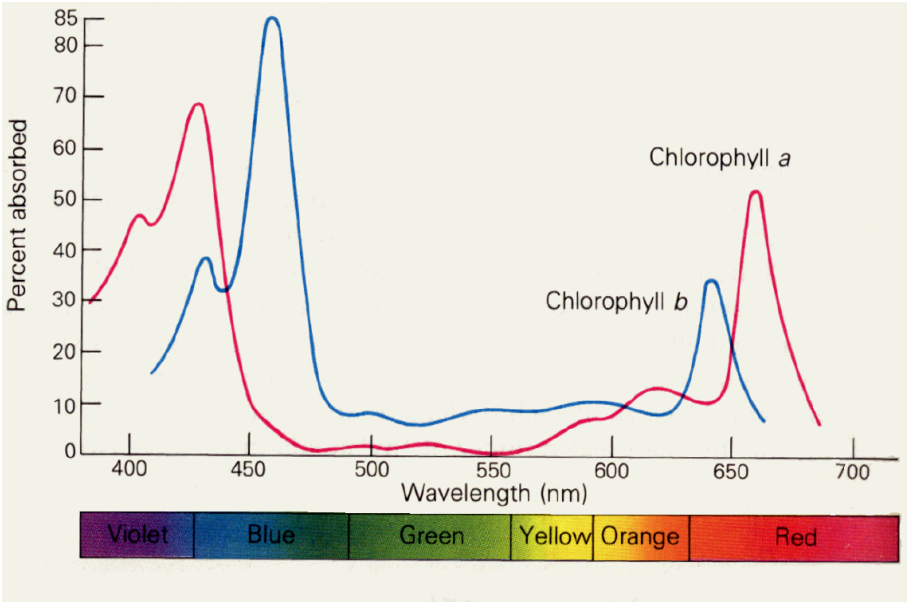
Ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός των φυτών εντοπίζεται μέσα σε ειδικά μεμβρανικά σωμάτια, τους χλωροπλάστες. Ο χλωροπλάστης αποτελείται εξωτερικά από μια διπλή μεμβράνη (την εξωτερική και την εσωτερική). Ο χώρος μεταξύ εσωτερικής και εξωτερικής μεμβράνης ονομάζεται διαμεμβρανικός χώρος. Η εσωτερική μεμβράνη περιβάλλει μια εσωτερική υδατική περιοχή που ονομάζεται στρώμα. Στη περιοχή του στρώματος υπάρχει ένα σύστημα εσωτερικών μεμβρανών που διατάσσονται σε αναδιπλώσεις και λέγονται lamellae. Σε κανονικά διαστήματα, τα lamellae διαπλατύνονται και δημιουργούν μεμβρανώδεις σάκους, τα θυλακοειδή, που

περιέχουν ένα εσωτερικό χώρο, γνωστό ως lumen. Τέλος, τα θυλακοειδή επιστοιβάζονται κατά κάποιο τρόπο σε μορφώματα, δημιουργώντας τα grana.

Στα θυλακοειδή των φυτών υπάρχουν δύο είδη φωτοσυστημάτων: το φωτοσύστημα I (PSI) και το φωτοσύστημα II (PSII), τα οποία είναι πολυπρωτεϊνικά μεμβρανικά σύμπλοκα. Τα φωτοσυστήματα αποτελούνται από το κέντρο αντίδρασης (Reaction Center, RC) και το σύμπλοκο συλλογής φωτός (Light Harvesting Complex, LHC). Το σύμπλοκο συλλογής φωτός αποτελείται από ένα σύστημα πρωτεϊνών που δεσμεύουν το μεγαλύτερο μέρος των χρωστικών και είναι μη ομοιοπολικά συνδεμένο με το ενεργό κέντρο. Στο ενεργό κέντρο (Reaction Center, RC) του φωτοσυστήματος υπάρχουν μόρια που μετέχουν στη μεταφορά ηλεκτρονίων και ειδικά μόρια χλωροφύλλης, γνωστά ως «χλωροφύλλες του ενεργού κέντρου». Στο ενεργό κέντρο του PSI το ειδικό μόριο χλωροφύλλης παρουσιάζει μέγιστο απορρόφησης στα 700nm και συμβολίζεται ως P700. Στο ενεργό κέντρο του PSII το ειδικό μόριο χλωροφύλλης εμφανίζει το μέγιστο της απορρόφησης στα 680nm και ονομάζεται P680. Τα δύο φωτοσυστήματα συνδέονται με μικρούς μεταφορείς ηλεκτρονίων, την πλαστοκινόνη (PQ) και την πλαστοκυανίνη (PC), μέσω ενός τρίτου συμπλόκου που ονομάζεται κυτόχρωμα b_6f και δρα σαν αντλία πρωτονίων κατά τη διάρκεια της μεταφοράς των ηλεκτρονίων. Ακόμη στα θυλακοειδή υπάρχει και η συνθετάση του ATP. Το PSII βρίσκεται κυρίως στα grana, ενώ το PSI και το σύμπλοκο CF_o-CF_1 (ATP-συνθετάση), που αποτελεί τη θέση δέσμευσης του ATP, εντοπίζεται στα lamellae και τις εκτεθειμένες στο στρώμα περιοχές των grana. Το cyt b_6f είναι ομοιόμορφα κατανεμημένο και στις δύο περιοχές. Όλα αυτά τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα προσανατολίζονται στη μεμβράνη με τέτοιο τρόπο ώστε η επαγόμενη από το φως ηλεκτρονιακή μεταφορά να προκαλεί πρωτονιακή μεταφορά από το στρώμα στην περιοχή lumen. Η διαβαθμισμένη συγκέντρωση πρωτονίων κατά μήκος της θυλακοειδούς μεμβράνης χρησιμοποιείται για τη σύνθεση του ενεργειακού μεταφορέα ATP από το ένζυμο ATP-συνθετάση.

Η απορρόφηση της ηλιακής ενέργειας είναι το πρώτο στάδιο του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Αυτό πραγματοποιείται στους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς με τη χρήση φωτοαπορροφητικών μορίων, όπως οι χρωστικές. Οι κυριότερες χρωστικές των ανώτερων φυτών, των φυκών και των κυανοβακτηρίων είναι η χλωροφύλλη α (Chl a) και η χλωροφύλλη β (Chl b). Η χλωροφύλλη α έχει μέγιστα απορρόφησης στα 430nm και 662nm περίπου, ενώ η χλωροφύλλη β έχει μέγιστα απορρόφησης στα 453nm και 642nm, όπως φαίνεται στην *Εικόνα 12*

Εκτός των χλωροφυλλών, στους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς υπάρχουν και άλλες χρωστικές όπως τα καροτενοειδή και οι φυκοβιλίνες. Οι χρωστικές αυτές οργανώνονται μέσα στα φωτοσυστήματα. Τα καροτενοειδή, εκτός από το ότι απορροφούν φως, έχουν και προστατευτική δράση στη φωτοσύνθεση. Το O_2 μπορεί να μετατραπεί σε ενεργοποιημένο οξυγόνο (singlet oxygen), καθώς απορροφά ενέργεια. Αν το ενεργοποιημένο οξυγόνο περάσει στο χλωροπλάστη, μπορεί να προκαλέσει οξειδωτική καταστροφή στα μεμβρανικά λιπίδια και τις άλλες χρωστικές. Τα καροτενοειδή παίρνουν ενέργεια από το ενεργοποιημένο οξυγόνο, σχηματίζοντας ξανά τη βασική κατάσταση του. Αυτή η ενέργεια, που απορροφάται από τα καροτενοειδή, χάνεται τελικά ως θερμότητα.



Εικόνα 12: Φάσμα απορρόφησης των χλωροφυλλών α και β.

Όλες οι χλωροφύλλες έχουν την ικανότητα να απορροφούν το φως αλλά μόνο οι χλωροφύλλες του ενεργού κέντρου συμμετέχουν στη μετατροπή της φωτοχημικής σε ηλεκτροχημική ενέργεια. Οι χρωστικές της κεραίας απορροφούν και μεταφέρουν την ηλιακή ενέργεια στις χλωροφύλλες του ενεργού κέντρου.

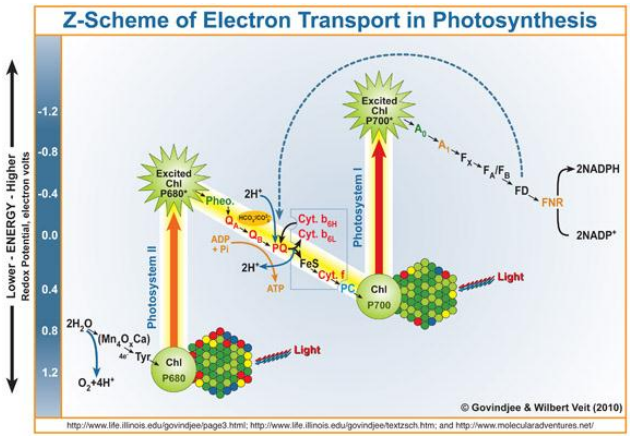
Κατά την έναρξη των φωτεινών αντιδράσεων δημιουργείται ένας διαχωρισμός φορτίου. Ένα ηλεκτρόνιο ενός χρωμοφόρου, με την απορρόφηση ηλιακής ενέργειας, διεγείρεται και η διεγερμένη κατάστασή του αποτελεί ένα ισχυρό αλλά ασταθές αναγωγικό. Το κενό τροχιακό, από το οποίο προέρχεται το e^-, αποτελεί ένα ισχυρό οξειδωτικό. Το e^- μεταφέρεται γρήγορα σε ένα κοντινό ηλεκτρονιοδέκτη με χαμηλότερο δυναμικό οξειδοαναγωγής και ο διαχωρισμός φορτίου σταθεροποιείται έναντι της επαναφοράς του ηλεκτρονίου στο αρχικό τροχιακό (*Εικόνα 13*).

Εικόνα 13: Αναπαράσταση διαχωρισμού φορτίου.

Το χρωμοφόρο, από το οποίο προέρχεται το e^-, αποτελεί τον πρωτοταγή ηλεκτρονιοδότη. Σε διαδοχικές μεταφορές, το ασύζευκτο e^- μετακινείται σε ηλεκτρονιοδέκτες, μακριά από τον πρωτοταγή ηλεκτρονιοδότη, που αποτελούν ασθενή αναγωγικά, όταν αναχθούν. Ο πρωτοταγής ηλεκτρονιοδότης ανάγεται κι έτσι με τη μεταφορά του οξειδωτικού ισοδύναμου σταθεροποιείται ο διαχωρισμός

φορτίου. Στα φυτά, ο πρωτοταγής ηλεκτρονιοδότης είναι το ειδικό μόριο χλωροφύλλης P680. Για να λειτουργήσει το ενζυμικό σύμπλοκο της φωτοσύνθεσης, είναι απαραίτητη η παρουσία των συμπαραγόντων που συγκροτούν τις αλυσίδες δοτών και δεκτών e^-, τον πρωτοταγή ηλεκτρονιοδότη και μια σειρά χρωστικών (μόρια χλωροφύλλης και καροτενοειδών) για τη συλλογή και μεταφορά της ενέργειας στον πρωτοταγή ηλεκτρονιοδότη. Το ενζυμικό σύμπλοκο που περιέχει τον πρωτοταγή ηλεκτρονιοδότη και όπου γίνεται ο πρωτοταγής διαχωρισμός φορτίου λέγεται κέντρο αντίδρασης.

Στα φυτά, στα άλγη και στα κυανοβακτήρια, ηλεκτρόνια μεταφέρονται από το H_2O, το οποίο οξειδώνεται παράγοντας O_2, προς τη φερρεδοξίνη (Fd), μια υδατοδιαλυτή οξειδοαναγωγική πρωτεΐνη που ανάγει το συνένζυμο $NADP^+$. Το περισσότερο αναγωγικό σύμπλοκο είναι το φωτοσύστημα I το οποίο δρα σαν οξειδοαναγωγάση πλαστοκυανίνης-φερρεδοξίνης. Η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων από το H_2O στη φερρεδοξίνη αναπαρίσταται με μια οξειδοαναγωγική κλίμακα δυναμικού η οποία είναι γνωστή ως σχήμα-Z (*Εικόνα 14*). Το δυναμικό αναγωγής του P680 στο PSII είναι πιο θετικό από αυτό του P700 στο PSI. Παρόμοια, τα e^- δε μπορούν να μεταφερθούν από τη βασική κατάσταση του P700 στο $NADP^+$, γιατί το δυναμικό αναγωγής του P700 είναι πιο θετικό από αυτό του $NADP^+$. Έτσι κατά τη φωτοσύνθεση, με την απορρόφηση φωτός δημιουργείται η διεγερμένη κατάσταση του P680, η P680*, της οποίας το δυναμικό αναγωγής είναι πιο αρνητικό από του P700. Στη συνέχεια, τα e^- μεταφέρονται μέσω μιας σειράς ηλεκτρόνιο-μεταφορέων από το P680 στο P700. Ανάλογα, η διεγερμένη κατάσταση του P700, η P700* έχει πιο αρνητικό δυναμικό αναγωγής από το $NADP^+$, οπότε μέσω μιας σειράς ηλεκτρόνιο-μεταφορέων, τα e^- μεταφέρονται από το P700 στο $NADP^+$. Έτσι η ηλιακή ακτινοβολία παρέχει την ενέργεια που απαιτείται για να πραγματοποιηθούν διαδικασίες που δεν ευνοούνται θερμοδυναμικά.



Εικόνα 14:Το σχήμα Z της φωτοσυνθετικής μεταφοράς ηλεκτρονίων [53].

Αντίδραση Hill

Οι αντιδράσεις που έχουν σαν αποτέλεσμα τη μετατροπή της ηλιακής ενέργειας σε χημική είναι αυτές που οδηγούν στη βιοσύνθεση των ενεργειακών μορίων ATP και $NADPH_2$ που στη συνέχεια θα χρησιμοποιηθούν για την βιοσύνθεση των υδατανθράκων με την δέσμευση του CO_2 της ατμόσφαιρας και την

χρησιμοποίηση του νερού των φυτικών κυττάρων. Το σύνολο των αντιδράσεων που οδηγούν στη βιοσύνθεση του ATP και του $NADPH_2$, ονομάζονται φωτεινές αντιδράσεις, επειδή είναι απαραίτητη η παρουσία του ηλιακού φωτός και γίνονται μόνον κατά την διάρκεια της ημέρας. Με την επίδραση του φωτός γίνεται και η φωτόλυση του νερού, η διάσπασή του δηλαδή σε δύο υδρογονοκατιόντα και οξυγόνο (αντίδραση Hill). Η διάσπαση αυτή παρατηρήθηκε για πρώτη φορά από τον Robert Hill το 1937, όταν σε απομονωμένους χλωροπλάστες που τους φώτισε ισχυρά, παρατήρησε την αναγωγή μιας ουσίας όπως το σιδηροκυανιούχο κάλλιο ($K_3[Fe(CN)_6]$), μιας ουσίας δηλαδή που μπορεί να λειτουργήσει σαν δέκτης ηλεκτρονίων. Τα ηλεκτρόνια αυτά προέρχονται από την διάσπαση του νερού σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση.

$$H_2O \xrightarrow{hv} 2H^+ + 2e^- + ½O_2$$

$$2Fe(CN)_6^{3-} + 2e^- \rightarrow 2Fe(CN)_6^{4-} \text{ ή}$$

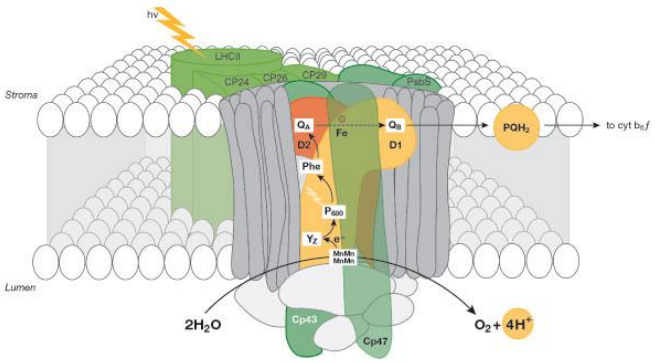
$$2Fe^{3+} + 2e^- \rightarrow 2Fe^{2+}$$

In vivo ο ηλεκτρονιοδέκτης είναι το $NADP^+$, ωστόσο *in vitro* κάποιες χρωστικές όπως η 2,6-dichlorophenolindophenol (DCPIP) ή η Duroquinone (DQ) μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν ηλεκτρονιοδέκτες

Ο Hill διαπίστωσε ότι η DCPIP θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως υποκατάστατο αποδέκτη ηλεκτρονίων. Η DCPIP λαμβάνει τα ηλεκτρόνια από την πρωτεΐνη D1, με μεγαλύτερη συγγένεια, από την πλαστοκίνονη QB. Δεδομένου ότι η ροή ηλεκτρονίων μέσω του PSII επηρεάζεται παρουσία των ζιζανιοκτόνων, η αναγωγή της DCPIP είναι ανάλογη προς την συγκέντρωση ζιζανιοκτόνου και θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση του.

Το φωτοσύστημα ΙΙ

Το PSII το οποίο λειτουργεί ως φωτοεπαγόμενη οξειδοαναγωγάση αποτελείται από τρία μέρη, το κέντρο αντίδρασης, το σύμπλοκο συλλογής φωτός και το σύμπλοκο έκλυσης οξυγόνου (Oxygen Evolving Complex, OEC). Η ηλιακή ενέργεια απορροφάται από το σύμπλοκο συλλογής φωτός, το οποίο αποτελεί την κεραία του φωτοσυστήματος και περιέχει και το μεγαλύτερο μέρος των χλωροφυλλών α και β. Η ενέργεια διέγερσης μεταφέρεται από την κεραία αυτή στο κέντρο αντίδρασης του PSII όπου λαμβάνουν χώρα οι φωτοχημικές αντιδράσεις. Οι αντιδράσεις αυτές οδηγούν στη συσσώρευση οξειδωτικών ισοδυνάμων στο σύμπλοκο έκλυσης οξυγόνου, τα οποία διατίθενται για την οξείδωση δύο μορίων H_2O σε O_2.



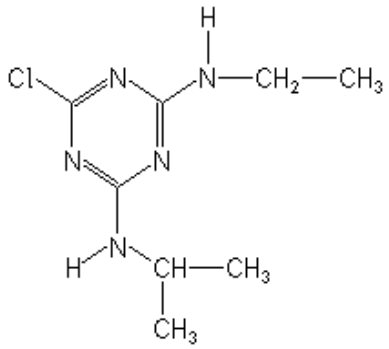
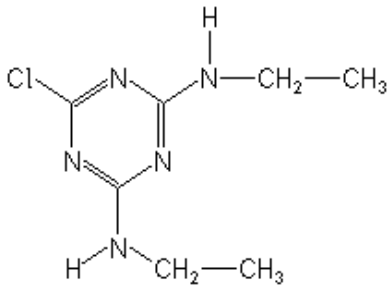
Εικόνα 15: Σχηματική απεικόνιση του Photosystem II [54].

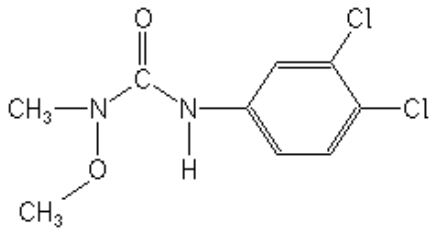
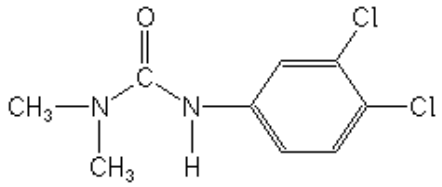
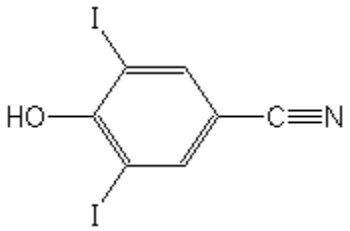
Φυτοφάρμακα

Φυτοφάρμακα λέγονται μια σειρά από χημικές ουσίες που φτιάχνονται για την αποτελεσματική καταπολέμηση των εχθρών των φυτών. Είναι δυνατά δηλητήρια, προϊόντα υψηλής τεχνολογίας, που δρουν σκοτώνοντας τους ζωικούς και φυτικούς οργανισμούς που βλάπτουν τις καλλιέργειες. Αναπτύχθηκαν τα τελευταία εξήντα περίπου χρόνια. Το 1942 ο Ελβετός Muller ανακάλυψε το DDT, ενώ το 1946 τα εργαστήρια της εταιρίας φαρμάκων BAYER κατασκεύασαν το παραθείο.

Ζιζανιοκτόνα

Τα φυτοφάρμακα που έχουν δράση ζιζανιοκτόνων ανήκουν σε τρεις βασικές κατηγορίες: τις φαινόλες (π.χ. ioxynil), τις τριαζίνες (π.χ. atrazine, simazine) και τις φαινυλουρίες (π.χ. diuron, linuron) (*Πίνακας 3*).

Τριαζίνες	
	
Ατραζίνη (6-chloro-N^2-ethyl-N^4-isopropyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine)	**Σιμαζίνη** (6-chloro-N^2,N^4-diethyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine)
Φαινυλουρίες	

	
Λίνουρον (3-(3,4-dichlorophenyl)-1-methoxy-1-methylurea)	**Diuron** (3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea)
Φαινολικές ενώσεις	
	
Ioxynil (4-hydroxy-3,5-di-iodobenzonitrile)	

Πίνακας 3: Παραδείγματα ζιζανιοκτόνων που ανήκουν στις τρεις βασικές κατηγορίες φυτοφαρμάκων.

Οι φαινιλουρίες, οι τριαζίνες, και οι φαινολικές ενώσεις χρησιμοποιούνται ευρέως στις χημικές, φαρμακευτικές και γεωργικές βιομηχανίες. Αυτές οι ενώσεις έχουν συντεθεί από το δεύτερο παγκόσμιο πόλεμο και έχουν εφαρμοστεί σε μεγάλες ποσότητες, ιδιαίτερα ως ζιζανιοκτόνα.

Τα ζιζανιοκτόνα μπορούν να ενεργήσουν ποικιλοτρόπως ελέγχοντας την ανάπτυξη των φυτών. Μπορούν να ταξινομηθούν σύμφωνα με το εάν σκοτώνουν όλο το φυτικό ιστό (μη εκλεκτικό) ή μόνο συγκεκριμένα είδη (εκλεκτικά ζιζανιοκτόνα). Μέσα σε αυτές τις κατηγορίες η λήψη τους μπορεί να είναι μέσω του χώματος ή του φυλλώματος (φύλλα και μίσχοι). Επιπλέον, μπορούν να σκοτώσουν στην επαφή ή μπορούν να μεταφερθούν μέσω του ιστού των φυτών στα όργανα στόχους. Η δράση τους έγκειται στο ότι παρεμποδίζουν την αντίδραση Hill και ως εκ τούτου παρεμποδίζουν την φωτοσύνθεση των ζιζανίων και επομένως και την ανάπτυξή τους. Περίπου 30% των ζιζανιοκτόνων που χρησιμοποιούνται αναστέλλουν τις φωτεινές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης, εμποδίζοντας την ηλεκτρονιακή ροή στο φωτοσυστήμα ΙΙ και επομένως εμποδίζουν την παραγωγή του ATP και NADPH.

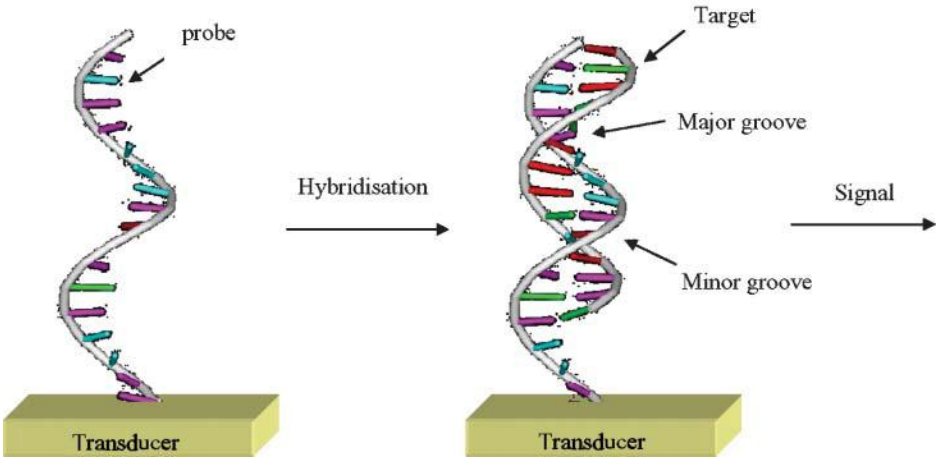
1.3.5 Νουκλεικά οξέα

Η ανίχνευση γενετικών διαταραχών έχει ιδιαίτερη σημασία για την πρόληψη στην υγεία του ανθρώπου. Οι περισσότερες από αυτές τις διαταραχές οφείλονται στις μεταλλάξεις των νουκλεικών οξέων των κυττάρων, που περιλαμβάνουν το προσχέδιο του γενετικού προφίλ των οργανισμών. Το DNA αποτελείται από δυο έλικες, οι οποίες ενώνονται και σχηματίζουν μια διπλή έλικα. Η διπλή έλικα σχηματίζεται κατά την πρόσδεση των βάσεων γουανίνη-κυτοσίνη και αδενίνη-θυμίνη. Πολλές διαταραχές μπορούν να προκληθούν έστω και από μια λάθος αντιστοιχία στο ζεύγος

των βάσεων, γι'αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντική η διάγνωση τέτοιων διαταραχών στο γενετικό υλικό. Η ανίχνευση μη συμπληρωματικών ζευγών βάσεων έχει ως κύριες εφαρμογές στην κλινική έρευνα την ανίχνευση κληρονομικών ασθενειών αλλά και τη χαρτογράφηση του γενετικού υλικού . Η ανίχνευση τέτοιων μεταλλάξεων μπορεί να εφαρμοστεί στο προγεννητικό έλεγχο, στην εξέταση ενός ενήλικα και η χαρτογράφηση του γενετικού υλικού χρησιμεύει στη κατασκευή ή στην επιλογή φαρμάκων.

Οι αισθητήρες DNA χρησιμοποιούν τις ιδιότητες σύνδεσης της μιας έλικας DNA με τη συμπληρωματική της. Οι αισθητήρες DNA μέχρι τώρα έχουν χρησιμοποιηθεί για ανίχνευση γενετικών ανωμαλιών, για ταυτοποίηση γονιδίων και γονιδιακής έκφρασης και για περιβαλλοντολογικούς σκοπούς. Για την πρόσδεση του DNA στην επιφάνεια του αισθητήρα συνήθως γίνεται τροποποίηση με ομάδες θειόλης (SH). Το μήκος του DNA μπορεί να είναι από 10 έως 50 βάσεων. Το μήκος αυτό διαδραματίζει μεγάλο ρόλο για την ευαισθησία του αισθητήρα, μαζί με το μήκος του στρώματος ακινητοποίησης. Πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι όσο μεγαλύτερο είναι το στρώμα ακινητοποίησης, τόσο περισσότερο χώρος υπάρχει για την υβριδοποίηση του DNA [55]. Στην περίπτωση χρήσης ηλεκτροχημικών αισθητήρων είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι με την αύξηση του στρώματος ακινητοποίησης, αυξάνεται και η απόσταση που πρέπει να διανύσουν τα ηλεκτρόνια για να μεταφερθούν στο ηλεκτρόδιο και να ανιχνευτούν.

Η κάλυψη της επιφάνειας με DNA μπορεί να ελεγθεί με χρήση κατάλληλων διαλυμάτων (π.χ: μερκατοεξανόλη). Ο έλεγχος της συγκέντρωσης του DNA στην επιφάνεια είναι σημαντικός, έτσι ώστε να διατηρείται χώρος μεταξύ των μορίων DNA για να περιορίζεται η απώθηση των συμπληρωματικών μορίων που θα προσδεθούν κατά την υβριδοποίηση. Εκτός από τη συγκέντρωση, υπάρχουν και άλλοι περιβαλλοντικοί παράγοντες που επηρεάζουν την απόδοση της υβριδοποίησης όπως η συγκέντρωση αλάτων και το pH, οι οποίοι πρέπει να προσδιορίζονται για κάθε πιθανή εφαρμογή του αισθητήρα.



Σχήμα 14: Αναπαράσταση υβριδοποίησης αλληλουχίας DNA με τη συμπληρωματική του αλληλουχία, σε βιοαισθητήρα [56].

Κεφάλαιο 2

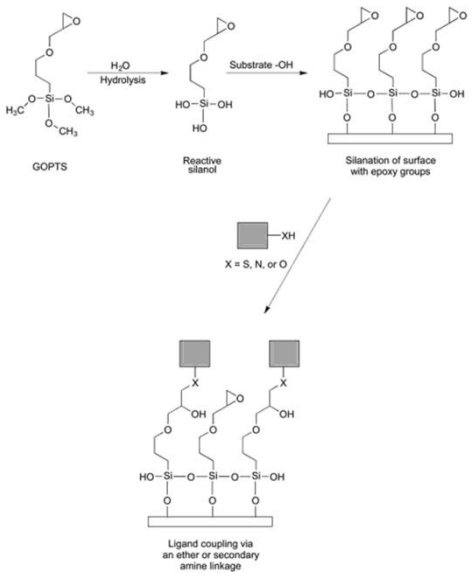
2.1 Πρωτόκολλα διαμόρφωσης επιφανειών, ακινητοποίησης βιολογικών υλικών και υβριδοποίησης.

Πριν την εναπόθεση ολιγονουκλεοτιδίων σε αισθητήρες, με τη χρήση laser έγιναν δοκιμές ακινητοποίησης σε επίπεδες επιφάνειες LTO/Si. Για την ενεργοποίηση των επιφανειών επιλέχθηκαν μέθοδοι σύμφωνα με τις οποίες γίνεται απλή χημική πρόσδεση έτσι ώστε να επιτυγχάνεται η ακινητοποίηση των βιομορίων σε πυκνές διατάξεις. Απαραίτητη σε αυτές τις περιπτώσεις είναι η χρήση κατάλληλων διαλυμάτων για την ακινητοποίηση των βιομορίων με μεγάλη ιοντική ισχύ, έτσι ώστε τυχόν απωθήσεις λόγω ομώνυμων φορτίων να εξουδετερώνονται. Οι μέθοδοι ακινητοποίησης που επιλέχθηκαν ήταν: η εναπόθεση στρώματος χρυσού πριν την εκτύπωση του βιολογικού υλικού και η χρήση 3-glycidoxypropyltrimethoxysilane (GOPTS), ενός σιλανίου.

Στις επιφάνειες όπου γίνεται επίστρωση χρυσού, καμία περαιτέρω τροποποίηση δεν είναι απαραίτητη πέραν της τροποποίησης των βιομορίων προς εναπόθεση με θειόλη (-SH) η οποία μπορεί να προσδεθεί στον χρυσό μέσω της δημιουργίας ομοιοπολικού δεσμού αφού ο χρυσός λειτουργεί ως δότης ηλεκτρονίων (electron donor) και το πυρίτιο ως αποδέκτης (electron acceptor).

Στις επιφάνειες που έχουν τροποποιηθεί με χρήση 3-glycidoxypropyltrimethoxysilane (GOPTS), το σιλάνιο προσδένεται στα ελεύθερα υδροξύλια του πυριτίου (-OH groups).

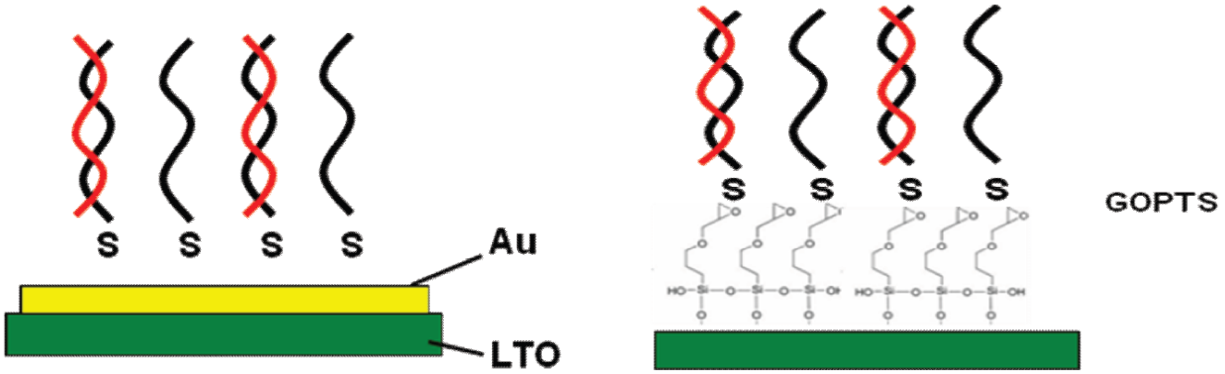
Οι ενεργοποιημένες με 3-glycidoxypropyltrimethoxysilane (GOPTS) επιφάνειες εν συνεχεία τροποποιούνταν με PDITC το οποίο φέρει δύο N=C=S ομάδες στα άκρα και άρα συνδέεται με τις ελεύθερες αμινομάδες του APTMS από την μία και με εκείνες των τροποποιημένων ολιγονουκλεοτιδίων από την άλλη, όπως φαίνεται και στο σχήμα (*Σχήμα 15*).



Σχήμα 15: Μέθοδος τροποποίησης επιφανειών LTO με GOPTS.

Το 3-glycidoxypropyltrimethoxysilane (GOPTS) έχει την ιδιότητα να πολυμερίζεται σε κατάλληλες συνθήκες θερμοκρασίας πριν προσδεθεί στην επιφάνεια του LTO. Με αυτό τον τρόπο η παραπάνω χημική ένωση δίνει την δυνατότητα πρόσδεσης βιομορίων τροποποιημένων με θειόλες, αμίνες και υδροξυλικές ομάδες στην ενεργοποιημένη επιφάνεια ανάλογα με το pH του διαλύματος. Για την ακινητοποίηση των βιομορίων με θειόλες το διάλυμα πρέπει να είναι σχετικά ουδέτερο καθώς οι θειόλες είναι οι πιο δραστικές από τις τρείς ομάδες, ενώ για τις άλλες δυο απαιτούνται πιο βασικά διαλύματα.

Το κυριότερο που επιτυγχάνεται με την συγκεκριμένη μέθοδο ενεργοποίησης της επιφάνειας πέραν της μείωσης του κόστους και της απλούστευσης του πρωτοκόλλου εναπόθεσης βιομορίων είναι ότι το συγκεκριμένο σιλάνιο επιτρέπει την πρόσδεση βιομορίων σε πυκνότερες διατάξεις λόγω του μικρού μήκους και μοριακού βάρους. Στο σχήμα που ακολουθεί αναπαρίστανται οι δύο διαφορετικές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για την ακινητοποίηση βιομορίων στις επίπεδες επιφάνειες LTO/Si. Για την απλούστευση του σχεδιαγράμματος αναπαρίσταται η ακινητοποίηση ολιγονουκλεοτιδίων και η ανίχνευση των συμπληρωματικών τους (*Σχήμα 16*).



Σχήμα 16: Απεικόνιση ακινητοποίησης τροποποιημένων με θειόλη ολιγονουκλεοτιδίων σε επιφάνειες α) χρυσού και β) ενεργοποιημένου με GOPTS οξειδίου του πυριτίου.

2.1.1 Πρωτόκολλο ακινητοποίησης ολιγονουκλεοτιδίων σε επιφάνειες χρυσού.

Α. Διαμόρφωση της επιφάνειας

• Επίστρωση τιτανίου (20Å ή 2nm) στην επιφάνεια των υποστρωμάτων LTO/Si, ακολουθούμενη από επίστρωση χρυσού (2000Å ή 200nm).
• Στη συνέχεια το δείγμα ξεπλένεται δύο φορές με αποσταγμένο νερό.

Β. Ακινητοποίηση νουκλεικών οξέων

• Η ακινητοποίηση των τροποποιημένων με θειόλη νουκλεικών οξέων (500μM) γίνεται σε διάλυμα 1.0 M potassium phosphate buffer pH 8 και 0.5mM MCH για τουλάχιστον 10 ώρες.
• Εν συνεχεία τα δείγματα ξεπλένονται σε διάλυμα 10 mM NaCl σε 5 mM Tris buffer, pH 7.4.

Γ. Υβριδοποίηση συμπληρωματικών νουκλεικών οξέων

• Η υβριδοποίηση με το συμπληρωματικό ολιγομερές (500μm) πραγματοποιείται σε διάλυμα 1.0 M potassium phosphate buffer, pH 8 στους 37°C για 1 ώρα και ακλουθεί ξέπλυμα σε διάλυμα 10 mM NaCl σε 5 mM Tris buffer, pH 7.4.

2.1.2 Πρωτόκολλο ακινητοποίησης ολιγονουκλεοτιδίων στην επιφάνεια GOPTS/LTO

Α. Ενεργοποίηση της επιφάνειας

• Το δείγμα ξεπλένετε δύο φορές με 95% αιθανόλη.

• Στη συνέχεια γίνεται ανάδευση του δείγματος σε διάλυμα 2% 3-glycidoxypropyltrimethoxysilane (GOPTS) σε 95% αιθανόλη για 6 ώρες στους 37^0C.

• Τέλος στεγνώνονται με αέρα και ψήνονται στους 135^0C για μία ώρα.

Β. Ακινητοποίηση των νουκλεϊκών οξέων

• Η ακινητοποίηση των τροποποιημένων με θειόλη ολιγονουκλεοτιδίων (1μM) γίνεται σε διάλυμα 1.0 M potassium phosphate buffer pH 8.

• Εν συνεχεία, τα δείγματα ξεπλένονται σε διάλυμα 10 mM NaCl σε 5 mM Tris buffer, pH 7.4.

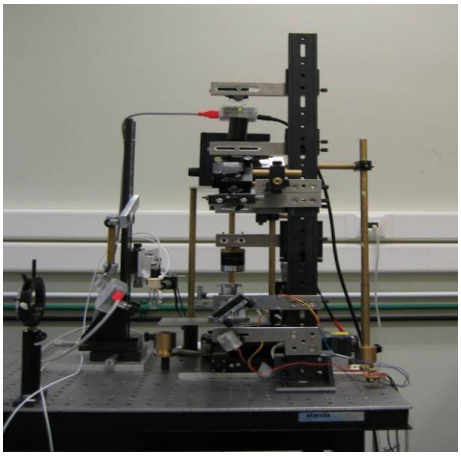
• Για την αδρανοποίηση των επιφανειών, τα δείγματα τοποθετούνται σε διάλυμα 1M MCH για 1 ώρα και ακλουθεί ξέπλυμα όπως και παραπάνω και στεγνώνονται με άζωτο.

Γ. Υβριδοποίηση συμπληρωματικών νουκλεϊκών οξέων

• Η υβριδοποίηση πραγματοποιείται σε διάλυμα 1.0 M potassium phosphate buffer pH 8 για 1 ώρα στους 37°C και ακλουθεί ξέπλυμα και στέγνωμα όπως και πριν.

2.2 Πειραματική διαδικασία

Για την διεξαγωγή των πειραμάτων LIFT σχεδιάστηκε και αναπτύχθηκε στα εργαστήρια LASER του Τομέα Φυσικής (*Εικόνα 16*α) ένας σταθμός μικρομηχανικής με προσαρμοσμένο σύστημα μικροσκοπίου (*Εικόνα 16*β). Ο σχεδιασμός περιελάμβανε την καταγραφή των απαιτήσεων σε οπτικά και βάσεις στήριξης αλλά και την σχεδίαση απαραίτητων βοηθητικών εξαρτημάτων που κατασκευάστηκαν στο μηχανουργείο του Τομέα Φυσικής του ΕΜΠ. Η ανάπτυξη αναφέρεται στην τοποθέτηση τους στα οπτικά τραπέζια αλλά και στην διαδικασία της ευθυγράμμισης.

α) β) 

Εικόνα 16: Διάταξη πειράματος LIFT υγρών, στο εργαστήριο του τμήματος φυσικής, στο ΕΜΠ.

Η πειραματική διάταξη περιλαμβάνει ένα παλμικό Nd:YAG laser με διάρκεια παλμού 10ns (μετρήθηκε). Για την εκτύπωση των βιολογικών υλικών, χρησιμοποιήθηκε η τέταρτη αρμονική (266 nm). Η δέσμη, κατά την έξοδό της από το laser, διέρχεται από έναν εξασθενητή, ο οποίος είναι προσαρμοσμένος σε περιστροφική βάση και ελέγχεται από ένα πρόγραμμα Lab View. Στη συνέχεια η δέσμη κατευθύνεται σε ένα σύστημα φακών που λειτουργεί ως τηλεσκοπική διάταξη, μεγεθύνοντας τη δέσμη κατά δύο φορές. Η τηλεσκοπική διάταξη αποτελείται από έναν αποκεντρωτικό φακό UV (f=100mm) και έναν συγκεντρωτικό φακό UV (f=200mm).
Μέσω δύο κατόπτρων, η διευρυμένη δέσμη κατευθύνεται σε μια μάσκα, στην οποία καθορίζεται το σχήμα και οι διαστάσεις της δέσμης πάνω στο στόχο.

Καθώς διέρχεται η δέσμη του laser από τη μάσκα, προσπίπτει σε αντικειμενικό φακό με αριθμητικό άνοιγμα NA=0,32. Η μεγέθυνση της δέσμης έχει ως αποτέλεσμα να μπορεί να διακριθεί το προφίλ της δέσμης με μεγαλύτερη λεπτομέρεια, έχει όμως ένα βασικό περιορισμό που οφείλεται στο φαινόμενο της περίθλασης, εφόσον η δέσμη διέρχεται από οπτικά πεπερασμένων διαστάσεων (μάσκα). Όταν μια δέσμη διέρχεται από ένα άνοιγμα πεπερασμένων διαστάσεων τότε υφίσταται περίθλαση έτσι ώστε να γίνεται μια σειρά ομοαξονικών κώνων. Το 84% της έντασης της ακτινοβολίας περιέχεται στο κεντρικό δίσκο επομένως μπορεί να θεωρηθεί ότι όλη η ακτινοβολία περιέχεται σε αυτόν. Τα φαινόμενα αυτά της περίθλασης επηρεάζουν όμως την απεικόνιση της μάσκας στο στόχο. Η διακριτική ικανότητα του συστήματος, δηλαδή η ελάχιστη απόσταση διαχωρισμού δύο σημείων δίνεται από το κριτήριο Rayleigh (το μέγιστο της έντασης ενός δίσκου Airy να συμπίπτει με το πρώτο ελάχιστο του δεύτερου).

$$\boldsymbol{d = \frac{0.62\lambda}{NA}} \quad \textit{Εξίσωση 3}$$

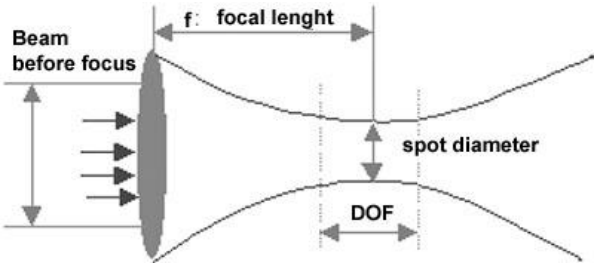
Όπου d: ελάχιστη δυνατή απόσταση, λ: μήκος κύματος του laser, NA: αριθμητικό άνοιγμα του φακού.

Για τη βελτίωση της διακριτικής ικανότητας, πρέπει να ληφθεί υπόψη το ελάχιστο μέγεθος εστίασης (*Εξίσωση* ***4***) του γκαουσιανού παλμού του laser και το βάθος πεδίου .

$$\boldsymbol{2W_0 = \frac{2\lambda}{\pi NA}} \quad \textit{Εξίσωση 4}$$

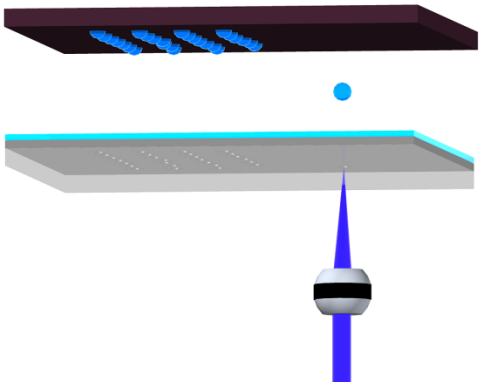
Βάθος πεδίου είναι το εύρος των θέσεων του αντικειμένου γύρω από τη θέση ακριβούς εστίασης για τις οποίες δεν μπορούμε να διακρίνουμε μεταβολή στην οξύτητα του ειδώλου. Εφόσον η περίθλαση περιορίζει τη διακριτική ικανότητα σε d, στο *Σχήμα 17* φαίνεται ότι η οξύτητα του ειδώλου δεν θα μεταβληθεί αν βρίσκεται μέσα στο εύρος h, το οποίο δίνεται:

$$\boldsymbol{h = \frac{2\pi W_0^2}{\lambda}} \qquad \textit{Εξίσωση 5}$$

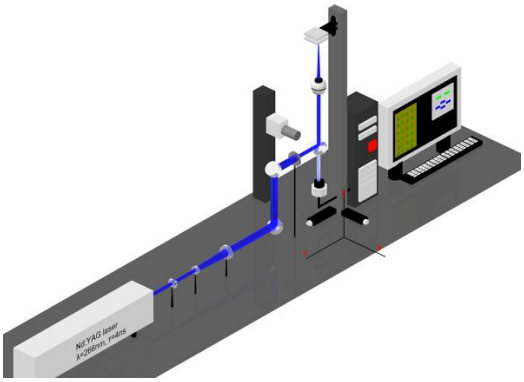


Σχήμα 17

Στη συνέχεια η δέσμη laser οδηγείται στο στόχο, με πυκνότητα ενέργειας ικανή να μεταφέρει την επιθυμητή ποσότητα υλικού στο υπόστρωμα (*Σχήμα 18*). Το υπόστρωμα τοποθετείται παράλληλα, σε μικρή απόσταση από το στόχο για να γίνει η εναπόθεση. Η θέση του υποστρώματος αυτού, ελέγχεται από σταθμό μικρομηχανικής που έχει αναπτυχθεί στον τομέα Φυσικής του ΕΜΠ (*Σχήμα 19*). Ένας στόχος τοποθετείται πάνω σε ένα ηλεκτρονικά ελεγχόμενο (κατά x-y) μοτέρ, επιτρέποντας κίνηση 25 x 25 mm (ανώτατο όριο) και έχοντας διακριτική ικανότητα κίνησης 1μm. Ένα πρόγραμμα Lab view έχει αναπτυχθεί για να συγχρονιστεί η κίνηση κατά x-y, με το laser. Η μεταφορά του υγρού υλικού γίνεται με τέτοιο τρόπο ώστε μια καθορισμένη ποσότητα υλικού να εναποτίθεται από έναν και μόνο παλμό. Η απόσταση μεταξύ του λεπτού στρώματος του υλικού προς εναπόθεση και του δέκτη είναι της τάξης των δεκάδων μικρομέτρων.



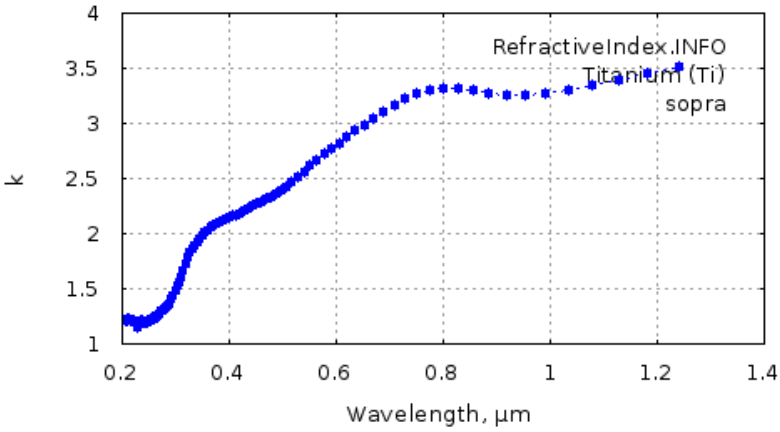
Σχήμα 18: Αναπαράσταση εναπόθεσης με την τεχνική LIFT.



Σχήμα 19:Πειραματική διάταξη LIFTστο εργαστήριο ΕΜΠ στο τομέα φυσικής.

Στα πειράματα στα οποία χρησιμοποιείται η τεχνική LIFT για την εναπόθεση βιολογικών υλικών, είναι απαραίτητο να εξασφαλίζεται η βιοενεργότητα του υλικού μετά την εναπόθεση. Για να επιβεβαιωθεί αυτό πρέπει πρώτα να οριστεί το βάθος διείσδυσης της Ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας (optical penetration depth).

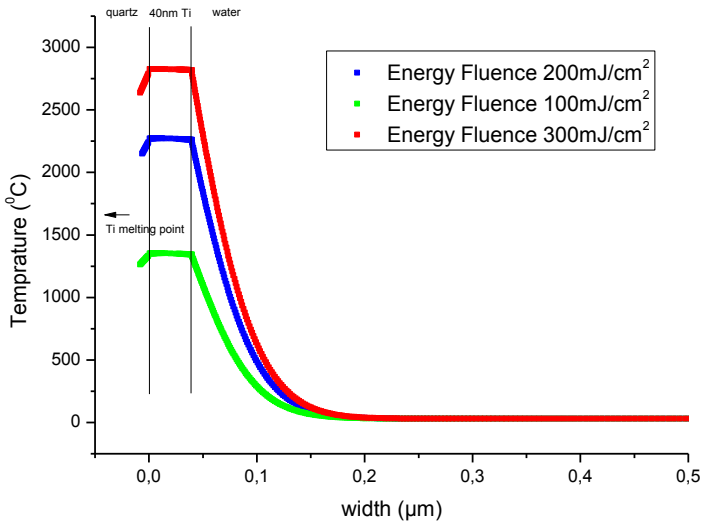
Αν υποθέσουμε ότι ο συντελεστής απορρόφησης του διαλύματος του στρώματος Ti είναι a= $5{,}96 \times 10^{5}$ cm^{-1} (*Σχήμα 20*) τότε το αντίστροφό του που είναι το οπτικό βάθος διείσδυσης είναι δ=$0{,}017 \times 10^{-6}$m ή 17nm.



Σχήμα 20

Γνωρίζοντας ότι το πάχος του απορροφητικού στρώματος Ti είναι 40nm, καταλαβαίνουμε ότι στα πρώτα 17nm απορροφάται η οπτική ακτινοβολία, με αποτέλεσμα να μην διαπερνά το τιτάνιο και κατά συνέπεια να μην επηρεάζει καθόλου το στρώμα του βιολογικού υγρού.

Για να επιβεβαιωθεί ότι το laser δεν καταστρέφει το βιολογικό υγρό που εναποτίθεται πρέπει να ληφθεί υπόψη και το μήκος θερμικής διάχυσης. Τα βιολογικά υγρά στα οποία γίνεται εναπόθεση σε αυτή την ενότητα είναι διαλύματα ολιγομερών με κύριο διαλύτη το νερό. Παρακάτω στο *Σχήμα 21* φαίνεται η προσομοίωση της εξίσωσης διάδοσης θερμότητας για την δομή που έχει ο στόχος που χρησιμοποιείται για όλα τα πειράματα εναπόθεσης. Λαμβάνοντας υπόψη το στρώμα quartz , το στρώμα Ti με πάχος (40nm) και το στρώμα βιολογικού υγρού με πάχος 20 μm (υπολογίζεται στην επόμενη ενότητα) παρατηρούνται τα εξής αποτελέσματα:



Σχήμα 21: Προσομοίωση διάδοσης θερμότητας κατά την ακτινοβόληση του στόχου (quartz/Ti/water) με το μήκος κύματος που χρησιμοποιείται στη πειραματική διάταξη LIFT του ΕΜΠ.

Για να γίνει η παραπάνω προσομοίωση χρησιμοποιήθηκαν οι συνήθης πυκνότητες ενέργειας των πειραμάτων εναπόθεσης υγρών 100MJcm^2, 200mJ/cm^2 και 300mJ/cm^2. Για πυκνότητες ενέργειας 200 mJ/cm^2 και 300mJ/cm^2 παρατηρούμε ότι η θερμοκρασία στο τιτάνιο ξεπερνά το σημείο τήξης του τιτανίου (1160^{0}C).

Η προσομοίωση έγινε σύμφωνα με την εξίσωση διάδοσης θερμότητας κατά μήκος του στόχου.

$$\boldsymbol{Cp\frac{\partial T(x,t)}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial x}\left(k\frac{\partial T(x,t)}{\partial x}\right) + S(x,t)} \quad \textbf{\textit{Εξίσωση 6 [57]}}$$

Όπου Cp: ειδική θερμοχωρητικότητα, ρ: η πυκνότητα και k η θερμική αγωγιμότητα των υλικών. Ο όρος S(x,t)= P_d(t)a(1-R)exp(-ax) εξαρτάται από την οπτική απορρόφηση (α) της ακτινοβολίας (*Σχήμα 20*), την ανακλαστικότητα του υλικού (R) και την ισχύ ανά επιφάνεια διαμορφωμένη στο χρόνο για την Gaussian κατανομή του παλμού. Στην εξίσωση αυτή δεν περιγράφονται οι μηχανισμοί απώλειας ενέργειας μετά το σημείο τήξης των υλικών, οπότε μετά το melting point του τιτανίου η κατανομή της θερμοκρασίας είναι ποιοτική.

Από τη προσομοίωση παρατηρείται ότι στα πρώτα 200 nm η θερμοκρασία πέφτει κάτω από 100^{0}C, ενώ το πάχος του βιολογικού φιλμ στο στόχο είναι 20 μm. Το αποτέλεσμα αυτό ήταν αναμενόμενο, εφόσον μετά από κάθε εναπόθεση η βιοενεργότητα του εναποτιθέμενου υγρού επιβεβαιώνεται με τη χρήση μικροσκοπίου φθορισμού.

2.3 Εναπόθεση ολιγονουκλεοτιδίων σε υποστρώματα LTO/Si, στα οποία έχει γίνει επίστρωση σιλανίου GOPTS.

Για την εναπόθεση των ολιγονουκλεοτιδίων σε επίπεδες επιφάνειες LTO/Si τροποποιημένες με σιλάνιο GOPTS, χρησιμοποιήθηκε διάλυμα ολιγονουκλεοτιδίων σε 1M phosphate buffer pH8 με 2% soldium dodecyl sulphate (SDS). Η χρήση του SDS έγινε για να δημιουργείται ομοιόμορφο φίλμ του διαλύματος των ολιγομερών στο στόχο τιτανίου. Πριν την εναπόθεση 10μL από το παραπάνω διάλυμα απλώθηκαν σε στόχο από quartz και 40nm τιτάνιο. Το quartz είναι διάφανο στο μήκος κύματος της δέσμης του laser, έτσι ώστε να προσπίπτει η δέσμη στο τιτάνιο. Το τιτάνιο έχει τη χρήση του ενδιάμεσου απορροφητικού στρώματος της ενέργειας του laser. Εφόσον το τιτάνιο απορροφά την ενέργεια, ένας θύλακας υψηλής πίεσης δημιουργείται στη διεπιφάνεια τιτανίου- υγρού και καθώς εκτονώνεται σπρώχνει το διάλυμα να εναποτεθεί στο υπόστρωμα με τη μορφή jet. Μετρώντας την ακτίνα του στόχου 12,5 χιλιοστά υπολογίζεται το πάχος του στρώματος του υγρού.

$$V=\pi\rho^2 h \Rightarrow h=20\mu m$$

Πριν γίνει εναπόθεση με laser στις τροποποιημένες με GOPTS επιφάνειες LTO/Si, ήταν απαραίτητο να επιλεγεί η κατάλληλη συγκέντρωση των ολιγομερών στο διάλυμα. Η συγκέντρωση έπρεπε να επιλεγεί έτσι ώστε να γίνεται η μέγιστη δυνατή υβριδοποίηση των βιομορίων - ανιχνευτών και των συμπληρωματικών τους, χωρίς όμως να επέρχεται κατάσταση κορεσμού. Για την διερεύνηση των συγκεντρώσεων των ολιγομερών στο διάλυμα, έγινε εναπόθεση με πιπέτα σε επιφάνειες LTO/Si τροποποιημένες με GOPTS. Όλες οι εναποθέσεις με πιπέτα έγιναν στην ακαδημία Αθηνών.

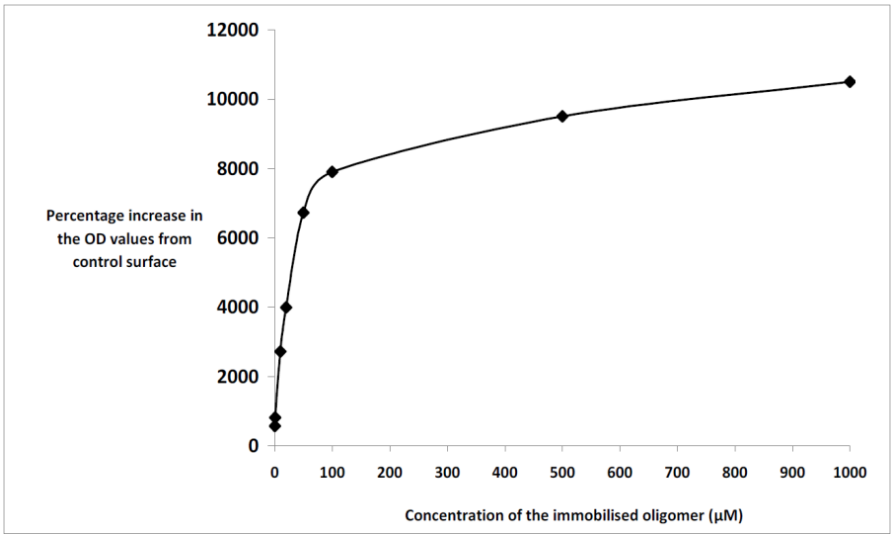
Επιλέχθηκε η δοκιμαστική εναπόθεση οκτώ συγκεντρώσεων βιομορίων - ανιχνευτών και έξι συγκεντρώσεων συμπληρωματικών βιομορίων - στόχων που φαίνονται στον *Πίνακας 4*. Εν συνεχεία τα εναποτιθέμενα ολιγονουκλεοτίδια αφέθηκαν για υβριδοποίηση με τα συμπληρωματικά ολιγομερή. Η εξέταση των συγκεντρώσεων, έγινε μέσω ενός *Leica* συνεστιακού μικροσκοπίου φθορισμού στην Ακαδημία Αθηνών. Εικόνες φθορισμού λήφθηκαν και αναλύθηκαν και από τα ακινητοποιημένα βιομόρια ανιχνευτές και από τα συμπληρωματικά τους, εφόσον και στους δύο τύπους ολιγομερών υπήρχαν δείκτες φθορισμού.

Συγκεντρώσεις ολιγομερών- ανιχνευτών (μM)	Συγκεντρώσεις ολιγομερών- στόχων (μM)
0,5	0,5
1	1
10	10
20	50
50	100
100	500
500	
1000	

Πίνακας 4: Συγκεντρώσεις ολιγομερων- ανιχνευτών και ολιγομερών- στόχων στο διάλυμα που εναποτίθεται στις επιφάνειες GOPTS/LTO/Si.

Σύμφωνα με την επεξεργασία των σημάτων φθορισμού των ολιγομερών-ανιχνευτών που ακινητοποιήθηκαν στην επιφάνεια GOPTS/LTO/Si και των συμπληρωματικών τους, παρατηρείται στο παρακάτω *Σχήμα 22* ότι η σχέση μεταξύ σήματος φθορισμού μετά την υβριδοποίηση και συγκέντρωσης ολιγομερών - ανιχνευτών αυξάνεται εκθετικά για μικρές συγκεντρώσεις ολιγομερών - ανιχνευτών, ενώ μετά τα 50μM συγκέντρωση, επέρχεται κορεσμός. Ο κορεσμός είναι λογικό συμπέρασμα, εφόσον η αύξηση της συγκέντρωσης των ακινητοποιημένων ολιγομερών στην επιφάνεια δεν συνεπάγεται μεγαλύτερα ποσοστά υβριδοποίησης με το συμπληρωματικό ολιγομερές.

Για την λήψη του σήματος φθορισμού, στα ακινητοποιημένα ολιγομερή - ανιχνευτές έγινε επισήμανση με fluorescein δείκτες φθορισμού ενώ στα συμπληρωματικά ολιγομερή έγινε σήμανση με Texas Red δείκτες φθορισμού. Στο παρακάτω σχήμα φαίνεται το ποσοστό της εκατό του φθορισμού των συμπληρωματικών ολιγομερών, καθώς αλλάζει η συγκέντρωση των ακινητοποιημένων ολιγομερών. Στα συμπληρωματικά ολιγομερή επιλέχθηκε η συγκέντρωση των 50μM.

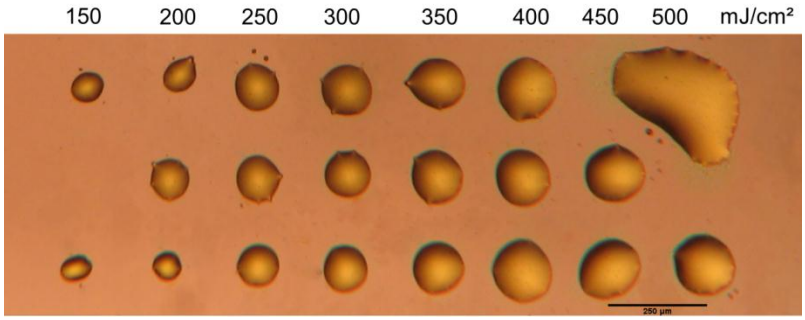


Σχήμα 22: Μεταβολή σήματος φθορισμού σε σχέση με τη συγκέντρωση του ακινητοποιημένου ολιγομερούς-ανιχνευτή σε επιφάνεια GOPTS/LTO/Si

Είναι φανερό ότι δεν υπήρξε ανάγκη για διερεύνηση του σήματος φθορισμού ξεχωριστά των ολιγομερών - ανιχνευτών, εφόσον όσο περισσότερα ολιγομερή - ανιχνευτές ακινητοποιούνταν στην επιφάνεια, τόσο μεγαλύτερο σήμα φθορισμού θα καταγράφαμε.

Σύμφωνα με τα ανωτέρω αποτελέσματα, το μέγιστο σήμα φθορισμού παρατηρήθηκε για συγκεντρώσεις 50μM ολιγομερή - ανιχνευτές και 50μM ολιγομερή - στόχους. Η συγκέντρωση όμως που επιλέχθηκε για τη διεξαγωγή των πειραμάτων ήταν 10μM, εφόσον το σήμα φθορισμού ήταν ικανοποιητικό και εύκολα ανιχνεύσιμο.

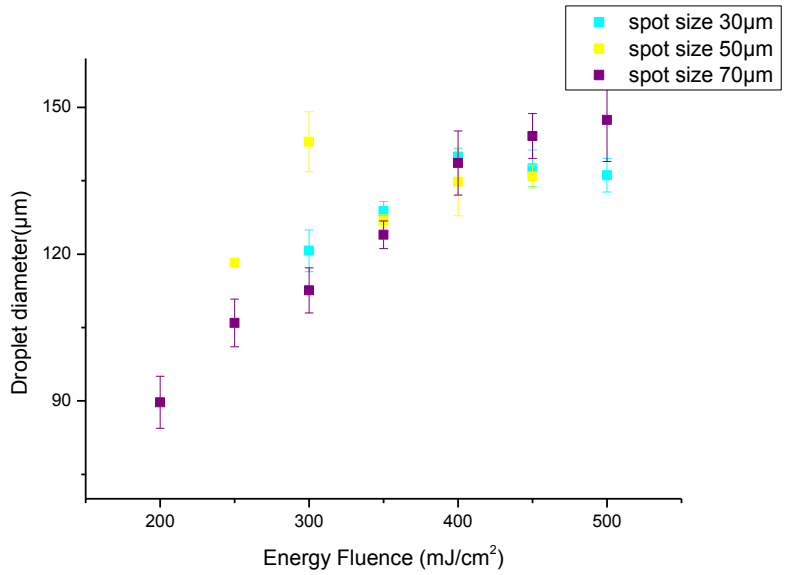
Μετά την επιλογή της σύστασης του διαλύματος των ολιγομερών και την ενεργοποίηση των επιφανειών, έγινε διερεύνηση των συνθηκών εναπόθεσης με το laser. Οι παράμετροι οι οποίοι εξετάστηκαν ήταν η εξάρτηση του μεγέθους και της ποιότητας των εναποτιθέμενων σταγόνων του διαλύματος από την ενεργειακή πυκνότητα του laser και από τη διάμετρο της δέσμης του laser πάνω στο στόχο (spot size).



Εικόνα 17: Μεταβολή της διαμέτρου των εναποτιθέμενων σταγόνων με laser, σε επιφάνειες τροποποιημένες με GOPTS, για διαφορετικές πυκνότητες ενέργειας του laser. Το spot size ήταν σταθερό στα 70μm.

Από την παραπάνω εικόνα παρατηρείται ότι για ενέργειες μικρότερες των 150 mJ/cm^2 δεν γίνεται εναπόθεση. Η εξήγηση του φαινομένου αυτού βασίζεται στο ότι η πυκνότητα ενέργειας δημιουργεί φυσαλίδα η οποία έχει μικρότερη εσωτερική πίεση από την εξωτερική (ατμοσφαιρική). Αποτέλεσμα αυτού είναι να υπερισχύει η εξωτερική πίεση και να μην εκτονώνεται η φυσαλίδα με τη δημιουργία jet αλλά να επιστρέφει στο στόχο. Για πυκνότητες ενέργειας του laser μεγαλύτερες των 450 mJ/cm^2 παρατηρείται αυξημένος όγκος των σταγόνων και δημιουργία μικρών δορυφορικών σταγονιδίων γύρω τους. Για πυκνότητες ενέργειας από 250 έως 400 mJ/cm^2 γίνεται επιτυχώς η εναπόθεση, οι σταγόνες έχουν σταθερή διάμετρο 100μm ενώ το σχήμα τους είναι κυκλικό και ομοιόμορφο.

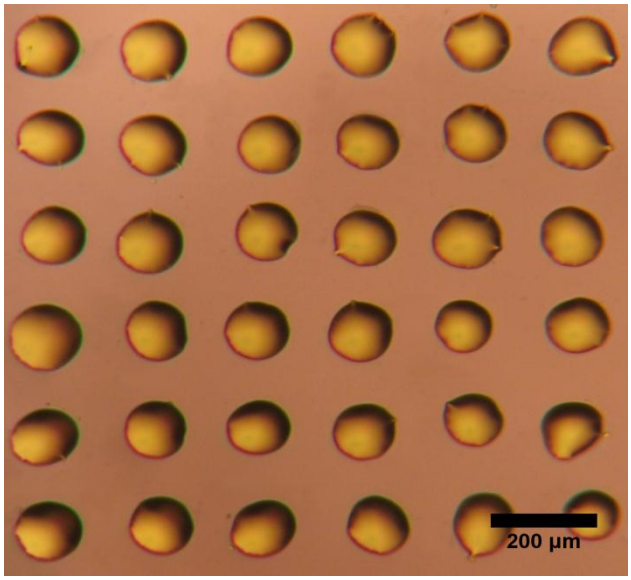
Για τη μελέτη της εξάρτησης της διαμέτρου της εναποτιθέμενης σταγόνας από το spot size έγινε εναπόθεση με laser σε τρία διαφορετικά spot size, ενώ ταυτόχρονα παρατηρήθηκε η μορφολογία των σταγόνων και σε διαφορετικές ενέργειες για κάθε spot size. Τα αποτελέσματα φαίνονται συνοπτικά στο παρακάτω *Σχήμα 23*



Σχήμα 23: Μεταβολή της διαμέτρου των εναποτιθέμενων με laser σταγόνων, σε υποστρώματαGOPTS/LTO/Si, για διαφορετικές ενέργειες και διαφορετικά spot sizes.

Από το παραπάνω σχήμα παρατηρείται ότι μεγαλύτερες μεταβολές διακρίνονται κατά την μεταβολή της πυκνότητας ενέργειας του laser παρά στην μεταβολή του spot size. Το αποτέλεσμα αυτό είναι λογικό σκεπτόμενοι ότι όλα τα εναποτιθέμενα υλικά είναι σε υγρή μορφή, οπότε η ενέργεια του laser επηρεάζει πολύ περισσότερο τη μορφολογία της σταγόνας, από το μέγεθος και το σχήμα της μάσκας που ορίζει το spot size.

Ορίζοντας ως βέλτιστες συνθήκες εναπόθεσης 50μm spot size και πυκνότητα ενέργειας του laser 300 mJ/cm^2 έγιναν όλες οι εναποθέσεις μικροσυστοιχειών ολιγομερών - στόχων για την ανίχνευση υβριδοποίησης.

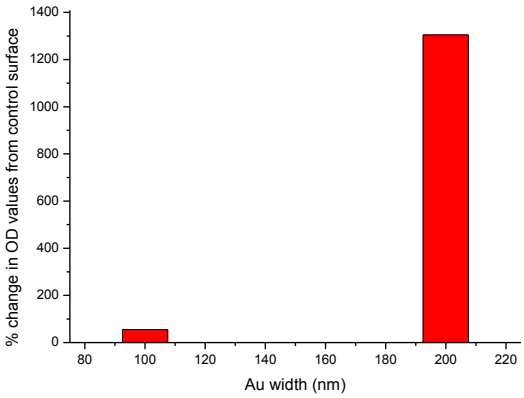


Εικόνα 18: Μικροσυστοιχία σταγόνων ολιγομερών - στόχων για πυκνότητα ενέργειας του laser 300mJ/cm^2 και spot size 50μm, σε επιφάνεια GOPTS/LTO/Si.

Από την παρακάνω εικόνα παρατηρείται ότι οι σταγόνες παρουσιάζουν σφαιρικό σχήμα διαμέτρου 100μm, είναι ομοιόμορφες και απόλυτα στοιχισμένες, ενώ δεν παρουσιάζονται σταγόνες δορυφόροι γύρω τους. Η εικόνα αυτή επιβεβαιώνει την χρήση της τεχνικής LIFT για την εναπόθεση βιολογικών μικροσυστοιχιών.

2.4 Εναπόθεση ολιγονουκλεοτιδίων σε υποστρώματα Au/LTO/Si

Για την εναπόθεση ολιγονουκλεοτιδίων σε επιφάνειες Au/LTO/Si, έγινε πρώτα διερεύνηση στο κατάλληλο πάχος χρυσού για εναπόθεση. Η διερεύνηση έγινε στην Ακαδημία Αθηνών, όπου εξετάστηκαν υποστρώματα LTO/Si στα οποία είχε γίνει εναπόθεση στρώματος χρυσού με πάχη 200, 1000 και 2000 Å. Εν συνεχεία έγινε εναπόθεση ολιγομερών- ανιχνευτών. Σύμφωνα με το σήμα φθορισμού των ολιγομερών - ανιχνευτών έγιναν οι παρακάτω παρατηρήσεις:



Σχήμα 24: Σύγκριση σήματος φθορισμού ακινητοποιημένων ολιγομερών σε επιφάνειες χρυσού πάχους 2000 και 1000 Å.

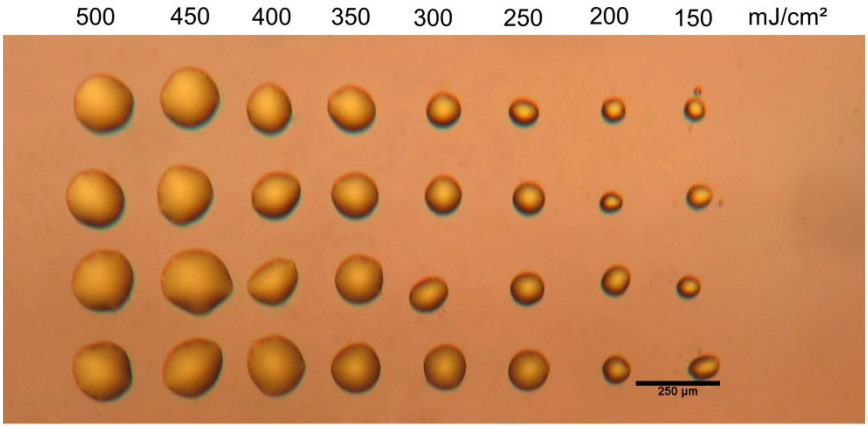
Για πάχος χρυσού 200 Å δεν παρατηρείται σήμα φθορισμού, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι δεν ακινητοποιούνται τα ολιγομερή στην επιφάνεια. Για πάχη χρυσού 1000 και 2000 Å παρατηρείται σήμα φθορισμού, του οποίου γίνεται σύγκριση στην έντασή του. Σύμφωνα με το παραπάνω σχήμα, η επίδραση του πάχους της επίστρωσης χρυσού είναι καταλυτική αφού προκύπτει ότι η μείωση των ακινητοποιημένων ολιγομερών κατόπιν μείωσης του στρώματος χρυσού είναι τεράστια από 2000 σε 1000Å.

Εκτός από τα διαφορετικά πάχη στρώματος χρυσού, εξετάστηκε και η χρήση του διαλύματος piranha σε επιφάνειες χρυσού. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, το piranha είναι ένα μείγμα υπεροξειδίου του υδρογόνου και θειικού οξέος, το οποίο χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό των επιφανειών χρυσού και σε πολλές περιπτώσεις για αύξηση τραχύτητας. Το πάχος στις επιφάνειες χρυσού ήταν 2000Å όπως αποφασίστηκε λόγω των παραπάνω αποτελεσμάτων. Η εναπόθεση σε υποστρώματα, στα οποία είχε γίνει piranha έδειξαν αυξημένο σήμα φθορισμού των ακινητοποιημένων ολιγομερών - ανιχνευτών με τη διαφορά όμως ότι το σήμα φθορισμού ήταν ανομοιόμορφο οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι δημιουργούνται συσσωματώματα ολιγομερών.

Τέλος εξετάστηκε η χρήση νανοσωματιδίων χρυσού αντί για ενιαίο φιλμ. Όπως παρατηρήθηκε από πειράματα που έγιναν στην Ακαδημία Αθηνών, η χρήση

νανοσωματιδλιων χρυσού, οδηγούν σε παρόμοια αποτελέσματα με αυτά που φαίνονται στη χρήση piranha. Επιπρόσθετα, μετά υβριδοποίηση δεν παρατηρείται καθόλου φθορισμός στο σημείο που έχουν τοποθετηθεί τα ολιγομερή- ανιχνευτές, ενώ παρατηρείται σήμα φθορισμού περιφερικά. Το φαινόμενο αυτό δικαιολογείται λαμβάνοντας υπόψη ότι η δημιουργία συσσωματωμάτων εμποδίζει την πρόσδεση των συμπληρωματικών ολιγομερών, εφόσον η πυκνότητα των ολιγομερών - ανιχνευτών είναι μεγάλη και δεν υπάρχει χώρος για την πρόσδεση των ολιγομερών - στόχων.

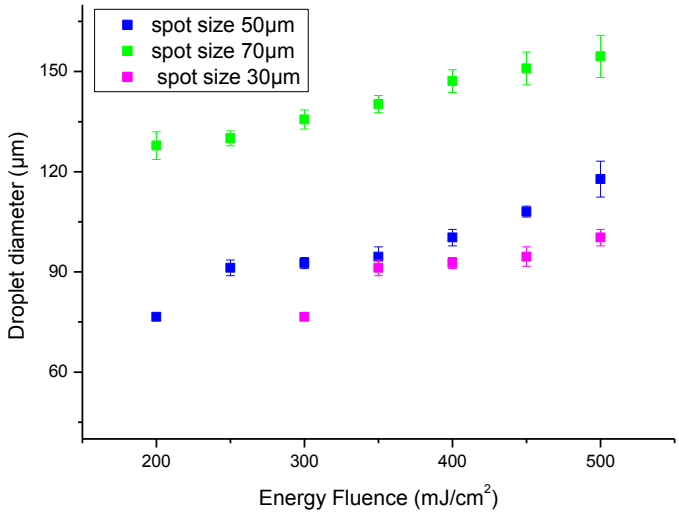
Σύμφωνα με τα παραπάνω συμπεράσματα, αποφασίστηκε η χρήση χρυσού πάχους 2000Å σε επιφάνειες LTO/Si. Στη συνέχεια έγιναν πειράματα εναπόθεσης με laser σε διαφορετικές συνθήκες πυκνότητας ενέργειας του laser και spot size, όπως ακριβώς και στα πειράματα της προηγούμενης ενότητας.



Εικόνα 19: Μεταβολή της διαμέτρου των εναποτιθέμενων σταγόνων με laser, σε επιφάνειες χρυσού, για διαφορετικές πυκνότητες ενέργειας του laser. Το spot size ήταν σταθερό στα 70μm.

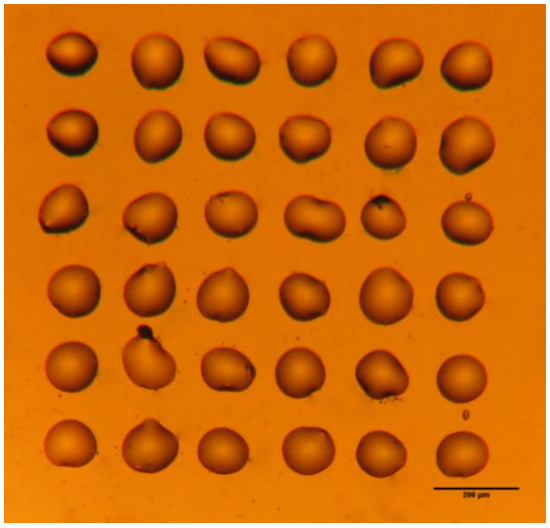
Στη *Εικόνα 19* είναι φανερή η εξάρτηση της πυκνότητας της ενέργειας του laser, με τη διάμετρο και την ομοιομορφία της εναποτιθέμενης σταγόνας. Για πυκνότητες ενέργειας μικρότερες των 150 mJ/cm^2 δεν γίνεται εναπόθεση, εφόσον όπως προαναφέρθηκε στην προηγούμενη ενότητα δεν είναι αρκετή η πυκνότητα ενέργειας για την εναπόθεση του διαλύματος των ολιγομερών- στόχων. Στο εύρος των παραπάνω πυκνοτήτων ενέργειας του laser, η διάμετρος της σταγόνας μεταβάλλεται από 70μm έως 150μm ανάλογα με τη πυκνότητα ενέργειας. Για τη λήψη των παραπάνω συμπερασμάτων επιλέγηκε spot size 70 μm όπως ακριβώς και στα αντίστοιχα πειράματα εναπόθεσης σε επίπεδα πλακίδια LTO/Si τροποποιημένα με GOPTS.

Στη συνέχεια έγινε διερεύνηση της εξάρτησης της διαμέτρου της σταγόνας με τη μεταβολή του spot size. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών φαίνονται στο παρακάτω γράφημα



Σχήμα 25: Μεταβολή της διαμέτρου των εναποτιθέμενων με laser σταγόνων, σε υποστρώματα Au/LTO/Si, για διαφορετικές ενέργειες και διαφορετικά spot sizes.

Από το *Σχήμα 25* φαίνεται πως η μορφολογία των εναποτιθέμενων σταγόνων εξαρτάται σε μεγαλύτερο ποσοστό από την πυκνότητα ενέργειας του laser από το μέγεθος του spot size.

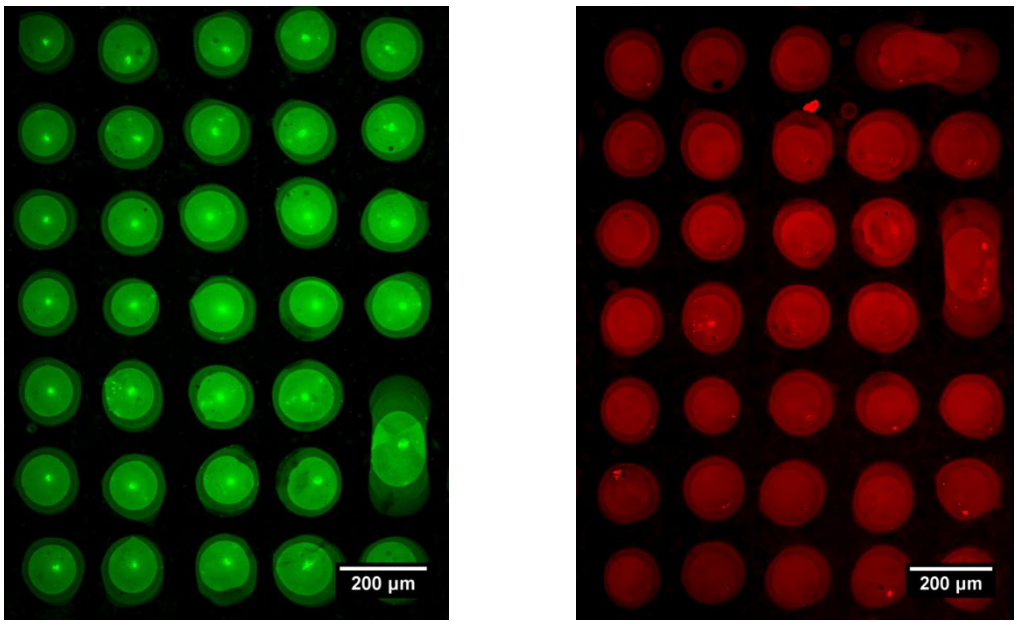


Εικόνα 20: Μικροσυστοιχία σταγόνων ολιγομερών- στόχων για πυκνότητα ενέργειας του laser 350mJ/cm^2 και spot size 50μm, σε επιφάνεια Au/LTO/Si.

Οι σταγόνες που φαίνονται στην *Εικόνα 20* έχουν εναποτεθεί με πυκνότητα ενέργειας 350 mJ/cm^2 και spot size 50μm. Παρατηρείται πλήρη στοίχιση των σταγόνων, οι αποστάσεις στη μικροσυστοιχία των σταγόνων είναι σταθερές και ίσες με 200 μm (η απόσταση των κέντρων των σταγόνων-pixel distance), η διάμετρος της κάθε σταγόνας είναι 120 μm.

2.5 Υβριδοποίηση εναποτιθέμενων ολιγομερών- ανιχνευτών με τα συμπληρωματικά ολιγομερή- στόχους.

Μετά την εναπόθεση των ολιγομερών- ανιχνευτών, είναι ιδιαιτέρως σημαντική η υβριδοποίηση τους με τα ολιγομερή-στόχους, εφόσον αποδεικνύει τη βιοενεργότητα των εναποτιθέμενων βιομορίων. Στη παρακάτω *Εικόνα 21* φαίνεται μια φωτογραφία που έχει ληφθεί από συνεστιακό μικροσκόπιο *Leica* στην ακαδημία Αθηνών. Στα αριστερά είναι μια μικροσυστοιχία 5x7 όπου παρατηρούνται τα εναποτιθέμενα ολιγομερή- ανιχνευτές τα οποία είναι επισημασμένα με δείκτη φθορισμού Fluorescein (πράσινο χρώμα) ενώ στα δεξιά φαίνεται η ίδια μικροσυστοιχία μετά την υβριδοποίηση. Το κόκκινο χρώμα οφείλεται στο δείκτη φθορισμού (Texas Red) που έχουν τα συμπληρωματικά ολιγομερή-στόχοι.

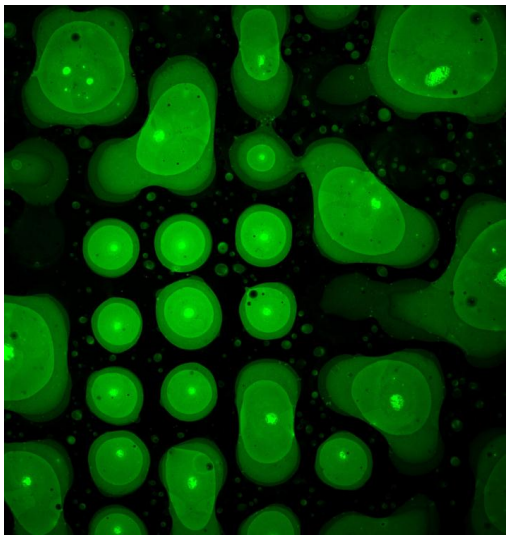


Εικόνα 21: Μικροσυστοιχίες ολιγομερών, εναποτιθέμενες με laser, α) πριν (πράσινες σταγόνες) και β) μετά (κόκκινες σταγόνες) την υβριδοποίηση.

Από την εικόνα παρατηρείται η απόλυτη στοίχιση των σταγόνων, οι αποστάσεις μεταξύ των σταγόνων είναι σταθερές (απόσταση μεταξύ των κέντρων 200μm) και η διάμετρος των σταγόνων είναι κατά μέσο όρο ίση με 100 μm. Το στεφάνι που παρατηρείται γύρο από κάθε σταγόνα πιθανότατα οφείλεται στο γεγονός ότι μετά την εναπόθεση οι σταγόνες συρρικνώθηκαν με αποτέλεσμα να απομένουν περιφερικά ολιγομερή αλλά σε πολύ μικρότερο ποσοστό από αυτό που υπάρχει στο κέντρο της σταγόνας. Μετά την υβριδοποίηση παρατηρείται πόσο επιλεκτική είναι η πρόσδεση των ολιγομερών, εφόσον τα ολιγομερή εντοπίζονται μόνο στις περιοχές που είχε γίνει εναπόθεση των ολιγομερών - ανιχνευτών με laser. Η τιμή του φθορισμού που εντοπίζεται στις περιοχές που έχει γίνει εναπόθεση ολιγομερών - ανιχνευτών σε σχέση με τις γύρω περιοχές (background) είναι περίπου έξι φορές μεγαλύτερη. Επίσης το σήμα φθορισμού είναι ομοιόμορφο σε κάθε σταγόνα, αποδεικνύοντας πως

υπάρχει ομογενής κατανομή των ολιγονουκλεοτιδίων στην επιφάνεια και δεν εμφανίζονται πουθενά συσσωματώματα.

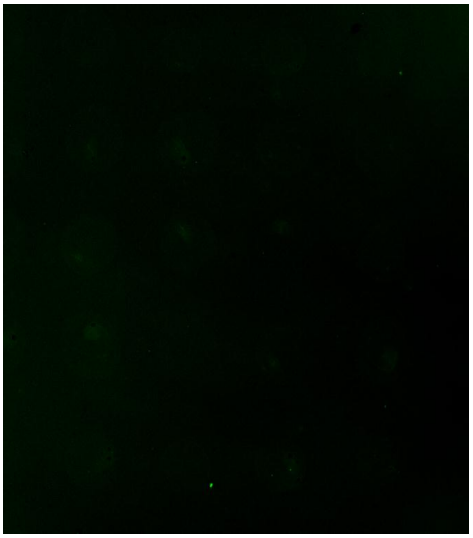
Η εξάρτηση της μορφολογίας των σταγόνων, από την πυκνότητα ενέργειας του laser φαίνεται στην παρακάτω εικόνα. Το spot size ήταν 50 μm, η πυκνότητα ενέργειας του laser ήταν 500 mJ/cm^2 ενώ η απόσταση μεταξύ των κέντρων των σταγόνων παραμένει σταθερή στα 200μm, όπως και σε όλες τις προηγούμενες περιπτώσεις.



Εικόνα 22: Μικροσυστοιχία εναποτιθέμενων ολιγομερών-ανιχνευτών, για πυκνότητα ενέργειας του laser500mJ/cm^2.

Είναι φανερό ότι στην *Εικόνα 22* η πυκνότητα ενέργειας του laser είναι πολύ μεγάλη με αποτέλεσμα να μην μπορεί να γίνει εναπόθεση ομοιόμορφων σταγόνων όπως στις προηγούμενες περιπτώσεις. Επίσης είναι αυξημένος ο αριθμός μικρότερων σταγόνων- δορυφόρων γύρω από τις κύριες σταγόνες. Παρατηρώντας την εικόνα αυτή συνειδητοποιούμε ότι επιλεκτική εναπόθεση γίνεται μόνο σε συγκεκριμένες συνθήκες εναπόθεσης, όμως επίσης φαίνεται πως παρόλο της μεγάλης πυκνότητας ενέργειας του laser, τα βιομόρια δεν έχουν χάσει την βιοενεργοτητά τους.

Ιδιαίτερη αξία στα πειράματα εναπόθεσης με laser, έχει να εξεταστεί η πιθανή ακινητοποίηση των βιομορίων στις επιφάνειες LTO/Si χωρίς τη χρήση επιπλέον στρώματος τροποποίησης. Πειράματα τέτοια έγιναν σε μη τροποποιημένες επιφάνειες LTO/Si, χωρίς όμως να γίνεται ακινητοποίηση των ολιγομερών (*Εικόνα 23*). Οι συνθήκες εναπόθεσης της μικροσυστοιχίας στην *Εικόνα 23* είναι ίδιες με τις συνθήκες της *Εικόνα 21* (J=350mJ/cm^2, spot size: 50μm, pixel distance: 200μm).



Εικόνα 23: Μικροσυστοιχία εναποτιθέμενων ολιγομερών- ανιχνευτών σε μη τροποποιημένες επιφάνειες LTO/Si.

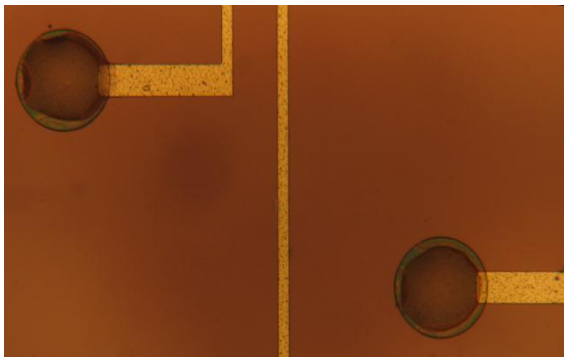
Είναι φανερό ότι χωρίς την τροποποίηση της επιφάνειας είτε με GOPTS, είτε με χρυσό, δεν είναι δυνατή η ακινητοποίηση των ολιγομερών. Ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο βέβαια σε αυτό το αποτέλεσμα παίζει η πολύ μικρή τραχύτητα των επιφανειών (RMS=2nm), εφόσον στα πειράματα που περιγράφονται στην επόμενη ενότητα επισημαίνεται πως είναι δυνατή η ακινητοποίηση βιουλικών με τη χρήση laser, σε επιφάνειες με αυξημένη τραχύτητα.

2.6 Εναπόθεση ολιγονουκλεοτιδίων σε αισθητήρες χωρητικότητας και ανίχνευση της υβριδοποίησής τους με τα συμπληρωματικά ολιγομερή.

Η τεχνική εναπόθεσης με laser (LIFT) εφαρμόστηκε, για την εναπόθεση ολιγομερών - ανιχνευτών, εκτός από επίπεδα υποστρώματα και σε μεμβράνες αισθητήρων χωρητικότητας. Οι αισθητήρες του χρησιμοποιήθηκαν αποτελούνται από μικροσυστοιχία μεμβρανών (64 μεμβράνες) στις οποίες υπάρχει η δυνατότητα επιλεκτικής εναπόθεσης βιουλικών για πολλαπλή ανίχνευση. Οι αισθητήρες κατασκευάστηκαν στο Ινστιτούτο Μικροηλεκτρονικής του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. Δημόκριτος. Κάθε αισθητήρας αποτελείται από μικροσυστοιχία υπέρλεπτων μεμβρανών (Si) πάνω σε επίπεδη επιφάνεια οξειδίου του πυριτίου (SiO_2).

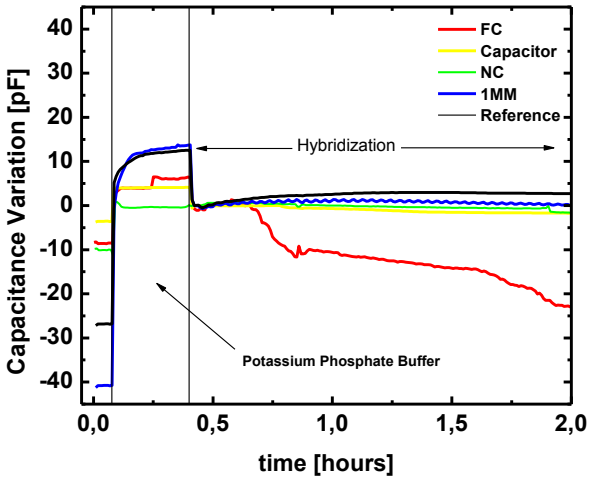
Η επιφάνεια των αισθητήρων τροποποιείται με την επίστρωση σιλανίου 3-glycidoxypropyltrimethoxysilane (GOPTS) για την επιτυχή ακινητοποίηση των ολιγομερών στην επιφάνεια των μεμβρανών.

Στη παρακάτω *Εικόνα 24* παρουσιάζεται φωτογραφία οπτικού μικροσκοπίου, όπου φαίνονται οι εναποτιθέμενες σταγόνες στις μεμβράνες του αισθητήρα. Η διάμετρος των σταγόνων είναι 100μm, έτσι ώστε να καλύπτουν το μεγαλύτερο μέρος της μεμβράνης. Η πυκνότητα ενέργειας του laser επιλέχθηκε 300 $mJ.cm^2$ ενώ το spot size ήταν 50μm. Ανάλογα με την ενέργεια του laser και το μέγεθος του spot size υπάρχει δυνατότητα μερικής κάλυψης των μεμβρανών.



Εικόνα 24: Φωτογραφία οπτικού μικροσκοπίου όπου απεικονίζονται οι μεμβράνες του αισθητήρα χωρητικότητας στις οποίες έχει γίνει εναπόθεση ολιγομερών με laser.

Στις μεμβράνες του αισθητήρα εναποτέθηκαν τρία είδη ολιγομερών - ανιχνευτών. Το πρώτο (fully complementary) ήταν πλήρως συμπληρωματικό με το ολιγομερές - στόχο, το δεύτερο ήταν διαμορφωμένο έτσι ώστε να μην υπάρχει αντιστοιχία σε ένα ζεύγος βάσεων ανάμεσα στο ολιγομερές - ανιχνευτή και στο ολιγομερές - στόχο και το τρίτο ολιγομερές - ανιχνευτής δεν ήταν συμπληρωματικό με το ολιγομερές - στόχο του διαλύματος. Τα τρία είδη ολιγομερών εναποτέθηκαν σε τυχαίες μεμβράνες και τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρατηρούνται στο παρακάτω σχήμα.



Σχήμα 26: Μετρήσεις χωρητικότητας του αισθητήρα, στον οποίο έχει γίνει εναπόθεση με laser.

Στις μετρήσεις χωρητικότητας απομονώθηκαν τρείς μεμβράνες, κάθε μια από τις οποίες είχαν διαφορετικό ολιγομερές ανιχνευτή, από τα είδη που περιγράφηκαν παραπάνω. Εκτός από τις μεμβράνες στις οποίες υπήρχαν ολιγομερή, μετρήσεις χωρητικότητας καταγράφηκαν και από ένα πυκνωτή αλουμινίου και μια μεμβράνη στην οποία δεν είχε γίνει εναπόθεση. Στις τρείς μεμβράνες που υπάρχουν ολιγονουκλεοτίδια, λόγω των δυνάμεων των βιομορίων, κατά την υβριδοποίηση, εμφανίζεται παραμόρφωση. Αποτέλεσμα αυτού είναι η μεταβολή του σήματος της χωρητικότητας που καταγράφεται παραπάνω.

Το διάλυμα των ολιγονουκλεοτιδίων που εναποτέθηκαν αλλά και των ολιγονουκλεοτιδίων – στόχων, αποτελείται από 1.0 M potassium phosphate buffer pH 8. Πριν τοποθετηθεί ο αισθητήρας στο θάλαμο υβριδοποίησης αφέθηκε για μια ώρα σε μερκατοεξανόλη (MCH), όπως ακριβώς περιγράφεται η διαδικασία στο πρωτόκολλο ακινητοποίησης των ολιγονουκλεοτιδίων σε επιφάνειες GOPTS/LTO/Si. Στη συνέχεια τοποθετήθηκε ο αισθητήρας στο θάλαμο υβριδοποίησης. Στα πέντε πρώτα λεπτά περνάει αέρας. Στη συνέχεια περνάει 1.0 M potassium phosphate buffer pH 8 για να προετοιμαστεί η επιφάνεια για την υβριδοποίηση. Όταν σταθεροποιηθεί η μέτρηση της χωρητικότητας (περίπου μετά από μισή ώρα), περνάει το διάλυμα της υβριδοποίησης που αποτελείται από 1.0 M potassium phosphate buffer pH 8 και τα ολιγομερή - στόχους (10μM) και αφήνεται μέχρι να τελειώσει η διαδικασία της υβριδοποίησης (περίπου δύο ώρες).

Σύμφωνα με το παραπάνω *Σχήμα 26* παρατηρούνται οι εξής μεταβολές:

- Για τη μεμβράνη στην οποία υπάρχουν τα πλήρως συμπληρωματικά ολιγομερή παρατηρείται αύξηση της χωρητικότητας κατά την ροή του 1.0 M potassium phosphate buffer pH 8 στα πέντε πρώτα λεπτά. Μετά την ροή του διαλύματος υβριδοποίησης, η χωρητικότητα μειώνεται απότομα στην αρχή

από 6pF έως -1,2pF και στη συνέχεια για όσο διαρκεί η διαδικασία της υβριδοποίησης , η χωρητικότητα μειώνεται συνεχόμενα μέχρι που φτάνει στα -23pF. Το αποτέλεσμα της συνεχούς μείωσης της χωρητικότητας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η διαδικασία της υβριδοποίησης δεν γίνεται ταυτόχρονα για όλα τα βιομόρια – ανιχνευτές.

- Στη μεμβράνη που έχει γίνει εναπόθεση ολιγομερών με ένα mismatch, όπου δεν γίνεται σύνδεση σε ένα ζεύγος βάσεων, η χωρητικότητα μεταβλήθηκε όσο γινόταν ροή του buffer, όμως κατά την διαδικασία της υβριδοποίησης έμεινε σχετικά σταθερή, από -0,8 έως -0,3 pF.
- Η μεμβράνη, στην οποία ήταν ακινητοποιημένα τα μη συμπληρωματικά ολιγονουκλεοτίδια παρουσίασε την ίδια συμπεριφορά με την μεμβράνη στην οποία δεν είχε γίνει ακινητοποίηση ολιγονουκλεοτιδίων και με τον πυκνωτή αλουμινίου. Το αποτέλεσμα αυτό ήταν αναμενόμενο, εφόσον αυτούς τους αισθητήρες δεν επηρεάζει καθόλου η διαδικασία υβριδοποίησης.

Σύμφωνα με τη μεταβολή της χωρητικότητας που καταγράφηκε, παρατηρείται η επιτυχής ανίχνευση των πλήρως συμπληρωματικών ολιγονουκλεοτιδίων. Από τον αισθητήρα αυτό δεν υπάρχουν συμπεράσματα επιτυχούς ανίχνευσης ολιγονουκλεοτιδίων με 1 mismatch, γι αυτό αναμένονται περεταίρω πειράματα σε αισθητήρες.

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα των μετρήσεων επιβεβαιώνουν τη βιοενεργότητα των ολιγομερών – ανιχνευτών του εναποτέθηκαν με laser και την επιτυχή ανίχνευση της παραμόρφωσης της μεμβράνης του αισθητήρα.

Πίνακες πειραματικών δεδομένων

Date	Experiment	Substrate	LIFT-ed solution	Target	Volume on target (μL)	Laser beam size (μm)	Sub - Target distance (μm)	Pixel distance(μm)	Energy density (mJ/cm^2)	Array
12/1/2011	15_mer_probes_pH8_01_01	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	150	75	6x6
12/1/2011	15_mer_probes_pH8_01_02	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	150	100	6x6
12/1/2011	15_mer_probes_pH8_01_03	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	150	125	6x6
12/1/2011	15_mer_probes_pH8_01_04	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	150	150	6x6
12/1/2011	15_mer_probes_pH8_01_05	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	150	175	6x6
12/1/2011	15_mer_probes_pH8_01_06	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	150	200	6x6
12/1/2011	15_mer_probes_pH8_01_07	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	150	125	6x6
12/1/2011	15_mer_probes_pH8_01_08	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	150	150	6x6
12/1/2011	15_mer_probes_pH8_01_09	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	150	175	6x6
12/1/2011	15_mer_probes_pH8_01_10	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	150	200	6x6
12/1/2011	15_mer_probes_pH8_01_11	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	150	125	6x6
12/1/2011	15_mer_probes_pH8_01_12	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	150	150	6x6
12/1/2011	15_mer_probes_pH8_01_13	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	150	175	6x6
12/1/2011	15_mer_probes_pH8_01_14	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	150	200	6x6
12/1/2011	15_mer_probes_pH8_01_15	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	150	100	6x6
12/1/2011	15_mer_probes_pH8_01_16	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	150	125	6x6
12/1/2011	15_mer_probes_pH8_01_17	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	150	150	6x6
12/1/2011	15_mer_probes_pH8_01_18	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	150	175	6x6
13/1/2011	15_mer_probes_pH8_02_01	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	200	125	6x6
13/1/2011	15_mer_probes_pH8_02_02	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	200	150	6x6

13/1/2011	15_mer_probes_pH8_02_03	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	200	175	6x6
13/1/2011	15_mer_probes_pH8_02_04	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	200	200	6x6
13/1/2011	15_mer_probes_pH8_02_05	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	200	225	6x6
13/1/2011	15_mer_probes_pH8_02_06	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	200	175	8x8
13/1/2011	15_mer_probes_pH8_02_07	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	200	175	8x8
13/1/2011	15_mer_probes_pH8_02_08	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	200	200	8x8
13/1/2011	15_mer_probes_pH8_02_09	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	200	200	8x8
13/1/2011	15_mer_probes_pH8_02_10	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	200	175	10x10
13/1/2011	15_mer_probes_pH8_02_11	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	200	200	10x10
13/1/2011	15_mer_probes_pH8_02_12	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	200	175	10x10
18/1/2011	15_mer_probes_pH8_03_01	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	200	175	16x16
18/1/2011	15_mer_probes_pH8_03_02	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	200	175	16x16
18/1/2011	15_mer_probes_pH8_03_03	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	200	200	6x6
18/1/2011	15_mer_probes_pH8_03_04	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	200	225	6x6
18/1/2011	15_mer_probes_pH8_03_05	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	200	125 to 275(step25)	7x7
18/1/2011	15_mer_probes_pH8_03_06	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	200	150 to 300 (step 25)	7x7
18/1/2011	15_mer_probes_pH8_03_07	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	200	125 to 400(step 25)	12x12
18/1/2011	15_mer_probes_pH8_04_01	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	200	325	16x16
18/1/2011	15_mer_probes_pH8_04_02	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	200	300	16x16
18/1/2011	15_mer_probes_pH8_04_03	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	200	275	16x16
18/1/2011	15_mer_probes_pH8_04_04	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	200	250	16x16
18/1/2011	15_mer_probes_pH8_05_01	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	200	150 to 500 (step 50)	14x6
18/1/2011	15_mer_probes_pH8_05_02	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	200	225 to 350 (step 25)	12x6
18/1/2011	15_mer_probes_pH8_05_03	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	200	325	12x12

18/1/2011	15_mer_probes_pH8_05_04	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	200	350	12x12
18/1/2011	15_mer_probes_pH8_05_05	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	200	375	12x12
18/1/2011	15_mer_probes_pH8_05_06	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	200	375	12x12
18/1/2011	15_mer_probes_pH8_05_07	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	200	400	12x12
20/1/2011	15_mer_probes_pH8_06_01	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	150	200	6x6
20/1/2011	15_mer_probes_pH8_06_02	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	150	250	6x6
20/1/2011	15_mer_probes_pH8_06_03	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	150	300	6x6
20/1/2011	15_mer_probes_pH8_06_04	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	150	350	6x6
20/1/2011	15_mer_probes_pH8_06_05	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	150	400	6x6
20/1/2011	15_mer_probes_pH8_06_06	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	150	450	6x6
20/1/2011	15_mer_probes_pH8_06_07	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	150	300	6x6
20/1/2011	15_mer_probes_pH8_06_08	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	150	320	6x6
20/1/2011	15_mer_probes_pH8_06_09	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	150	340	6x6
20/1/2011	15_mer_probes_pH8_06_10	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	150	360	6x6
20/1/2011	15_mer_probes_pH8_06_11	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	150	380	6x6
20/1/2011	15_mer_probes_pH8_06_12	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	150	400	6x6
20/1/2011	15_mer_probes_pH8_06_13	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	150	300	6x6
20/1/2011	15_mer_probes_pH8_06_14	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	150	320	6x6
20/1/2011	15_mer_probes_pH8_06_15	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	150	340	6x6
20/1/2011	15_mer_probes_pH8_06_16	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	150	360	6x6
20/1/2011	15_mer_probes_pH8_06_17	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	150	380	6x6
20/1/2011	15_mer_probes_pH8_06_18	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	150	400	6x6
25/1/2011	15_mer_probes_pH7_01_01	GOLD/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	200	100	6x6
25/1/2011	15_mer_probes_pH7_01_02	GOLD/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	200	125	6x6

25/1/2011	15_mer_probes_pH7_01_03	GOLD/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	200	150	6x6
25/1/2011	15_mer_probes_pH7_01_04	GOLD/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	200	175	6x6
25/1/2011	15_mer_probes_pH7_01_05	GOLD/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	200	200	6x6
25/1/2011	15_mer_probes_pH7_01_06	GOLD/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	200	225	6x6
25/1/2011	15_mer_probes_pH7_01_07	GOLD/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	200	100	6x6
25/1/2011	15_mer_probes_pH7_01_08	GOLD/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	200	125	6x6
25/1/2011	15_mer_probes_pH7_01_09	GOLD/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	200	150	6x6
25/1/2011	15_mer_probes_pH7_01_10	GOLD/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	200	175	6x6
25/1/2011	15_mer_probes_pH7_01_11	GOLD/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	200	200	6x6
25/1/2011	15_mer_probes_pH7_01_12	GOLD/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	200	100	6x6
25/1/2011	15_mer_probes_pH7_01_13	GOLD/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	200	125	6x6
25/1/2011	15_mer_probes_pH7_01_14	GOLD/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	200	150	6x6
25/1/2011	15_mer_probes_pH7_01_15	GOLD/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	200	175	6x6
25/1/2011	15_mer_probes_pH7_01_16	GOLD/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	200	200	6x6
25/1/2011	15_mer_probes_pH7_01_17	GOLD/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	200	100 to 225 (step 25)	10x12
25/1/2011	15_mer_probes_pH7_01_18	GOLD/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	200	100	6x6
25/1/2011	15_mer_probes_pH7_01_19	GOLD/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	200	125	6x6
25/1/2011	15_mer_probes_pH7_01_20	GOLD/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	200	150	6x6
25/1/2011	15_mer_probes_pH7_01_21	GOLD/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	200	175	6x6
25/1/2011	15_mer_probes_pH7_01_22	GOLD/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	200	200	6x6
25/1/2011	15_mer_probes_pH7_01_23	GOLD/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	200	225	6x6
25/1/2011	15_mer_probes_pH7_01_24	GOLD/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	52	200	200	250	6x6
26/1/2011	15_mer_probes_pH7_02_01	LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	50	200	150	100	6x6
26/1/2011	15_mer_probes_pH7_02_02	LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	50	200	150	125	6x6

26/1/2011	15_mer_probes_pH7_02_03	LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	50	200	150	150	6x6
26/1/2011	15_mer_probes_pH7_02_04	LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	50	200	150	175	6x6
26/1/2011	15_mer_probes_pH7_02_05	LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	50	200	150	200	6x6
26/1/2011	15_mer_probes_pH7_02_06	LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	50	200	150	225	6x6
26/1/2011	15_mer_probes_pH7_02_07	LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	50	200	150	250	6x6
26/1/2011	15_mer_probes_pH7_02_08	LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	50	200	200	175	10x10
26/1/2011	15_mer_probes_pH7_02_09	LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	50	200	200	200	10x10
26/1/2011	15_mer_probes_pH7_02_10	LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	50	200	200	225	10x10
26/1/2011	15_mer_probes_pH7_02_11	LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	50	200	200	225	10x10
26/1/2011	15_mer_probes_pH7_02_12	LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	50	200	200	200	10x10
26/1/2011	15_mer_probes_pH7_02_13	LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	50	200	200	250	10x10
26/1/2011	15_mer_probes_pH7_02_14	LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	50	200	200	275	10x10
26/1/2011	15_mer_probes_pH7_03_01	LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	50	200	200	200	10x10
26/1/2011	15_mer_probes_pH7_03_02	LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	50	200	200	225	10x10
26/1/2011	15_mer_probes_pH7_03_03	LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	50	200	200	250	10x10
26/1/2011	15_mer_probes_pH7_03_04	LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	50	200	200	175	10x10
26/1/2011	15_mer_probes_pH7_03_05	LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	50	200	200	150	10x10
26/1/2011	15_mer_probes_pH7_03_06	LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	50	200	200	200	10x10
26/1/2011	15_mer_probes_pH7_03_07	LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	50	200	200	175	10x10
26/1/2011	15_mer_probes_pH7_03_08	LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	50	200	200	225	10x10
26/1/2011	15_mer_probes_pH7_03_09	LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	50	200	200	250	10x10
26/1/2011	15_mer_probes_pH7_03_10	LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	50	200	200	275	10x10
26/1/2011	15_mer_probes_pH7_04_01	GOLD/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	50	200	200	350	10x10
26/1/2011	15_mer_probes_pH7_04_02	GOLD/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	50	200	200	375	10x10

26/1/2011	15_mer_probes_pH7_04_03	GOLD/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	50	200	200	225	10x10
26/1/2011	15_mer_probes_pH7_04_04	GOLD/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	50	200	200	225	10x10
26/1/2011	15_mer_probes_pH7_04_05	GOLD/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	50	200	200	250	10x10
26/1/2011	15_mer_probes_pH7_04_06	GOLD/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	50	200	200	275	10x10
26/1/2011	15_mer_probes_pH7_04_07	GOLD/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	50	200	200	300	10x10
26/1/2011	15_mer_probes_pH7_04_08	GOLD/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	50	200	200	325	10x10
1/2/2011	15_mer_probes_pH8_07_01	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	50	200	200	150	8x8
1/2/2011	15_mer_probes_pH8_07_02	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	50	200	200	175	8x8
1/2/2011	15_mer_probes_pH8_07_03	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	50	200	200	200	8x8
1/2/2011	15_mer_probes_pH8_07_04	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	50	200	200	225	8x8
1/2/2011	15_mer_probes_pH8_07_05	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	50	200	200	250	8x8
1/2/2011	15_mer_probes_pH8_07_06	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	50	200	200	250	8x8
1/2/2011	15_mer_probes_pH8_07_07	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	50	200	200	275	8x8
1/2/2011	15_mer_probes_pH8_07_08	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	50	200	200	300	8x8
1/2/2011	15_mer_probes_pH8_07_09	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	50	200	200	150	8x8
1/2/2011	15_mer_probes_pH8_07_10	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	50	200	200	175	8x8
1/2/2011	15_mer_probes_pH8_07_11	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	50	200	200	200	8x8
1/2/2011	15_mer_probes_pH8_07_12	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	50	200	200	225	8x8
1/2/2011	15_mer_probes_pH8_07_13	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	50	200	200	250	8x8
1/2/2011	15_mer_probes_pH8_07_14	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	50	200	200	275	8x8
1/2/2011	15_mer_probes_pH8_07_15	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	50	200	200	300	8x8
1/2/2011	15_mer_probes_pH8_07_16	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	50	200	200	325	8x8
2/2/2011	15_mer_probes_pH7_05_01	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	50	200	200	150	8x8
2/2/2011	15_mer_probes_pH7_05_02	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	50	200	200	175	8x8

2/2/2011	15_mer_probes_pH7_05_03	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	50	200	200	200	8x8
2/2/2011	15_mer_probes_pH7_05_04	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	50	200	200	225	8x8
2/2/2011	15_mer_probes_pH7_05_05	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	50	200	200	225	8x8
2/2/2011	15_mer_probes_pH7_05_06	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	50	200	200	250	8x8
2/2/2011	15_mer_probes_pH7_05_07	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	50	200	200	275	8x8
2/2/2011	15_mer_probes_pH7_05_08	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	50	200	200	300	8x8
2/2/2011	15_mer_probes_pH7_05_09	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	50	200	200	325	8x8
2/2/2011	15_mer_probes_pH7_05_10	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	50	200	200	350	8x8
2/2/2011	15_mer_probes_pH7_05_11	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	50	200	200	375	8x8
17/2/2011	15_mer_probes_pH8_08_01	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	50	200	200	150	8x8
17/2/2011	15_mer_probes_pH8_08_02	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	50	200	200	175	8x8
17/2/2011	15_mer_probes_pH8_08_03	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	50	200	200	200	8x8
17/2/2011	15_mer_probes_pH8_08_04	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	50	200	200	225	8x8
17/2/2011	15_mer_probes_pH8_08_05	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	50	200	200	225	8x8
17/2/2011	15_mer_probes_pH8_08_06	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	50	200	200	250	8x8
17/2/2011	15_mer_probes_pH8_08_07	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	50	200	200	275	8x8
17/2/2011	15_mer_probes_pH8_08_08	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	50	200	200	300	8x8
17/2/2011	15_mer_probes_pH8_08_09	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	50	200	200	325	8x8
17/2/2011	15_mer_probes_pH8_08_10	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	50	200	200	350	8x8
17/2/2011	15_mer_probes_pH8_08_11	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	50	200	200	375	8x8
17/2/2011	15_mer_probes_pH8_08_12	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	50	200	200	400	8x8
22/3/2011	15_mer_probes_pH8_09_01	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	60	200	200	50 to 400 (step 25)	10x30
22/3/2011	15_mer_probes_pH8_09_02	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	60	200	200	50 to 400 (step 25)	10x30
22/3/2011	15_mer_probes_pH8_10_01	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	60	200	200	250	10x10

22/3/2011	15_mer_probes_pH8_10_02	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	60	200	200	300	10x10
22/3/2011	15_mer_probes_pH8_10_03	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	60	200	200	225	10x10
22/3/2011	15_mer_probes_pH8_10_04	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	60	200	200	250	10x10
22/3/2011	15_mer_probes_pH8_10_05	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	60	200	200	275	10x10
22/3/2011	15_mer_probes_pH8_10_06	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	60	200	200	300	10x10
22/3/2011	15_mer_probes_pH8_10_07	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	60	200	200	275	10x10
22/3/2011	15_mer_probes_pH8_10_08	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	60	200	200	250	10x10
22/3/2011	15_mer_probes_pH8_10_09	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	60	200	200	300	10x10
22/3/2011	15_mer_probes_pH8_10_10	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	60	200	200	325	10x10
22/3/2011	15_mer_probes_pH8_11	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	60	200	200	300	12x12
22/3/2011	15_mer_probes_pH8_12	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	60	200	200	300	12x12
22/3/2011	15_mer_probes_pH8_13	GOPTS/LTO/Si	oligos+SDS	Ti	10	60	200	200	300	12x12

Κεφάλαιο 3

3.1 Πρωτόκολλο απομόνωσης θυλακοειδών μεμβρανών

Οι θυλακοειδής μεμβράνες απομονώθηκαν σύμφωνα με λεπτομερές πρωτόκολλο που περιγράφεται παρακάτω. Για την απομόνωση των θυλακοειδών 250g φρέσκων φύλλων σπανακιού πλύθηκαν με απιονισμένο νερό και αλέστηκαν από ένα μίξερ με ρυθμιστικό διάλυμα (*grinding buffer*) άλεσης που αποτελείται από: 20 mM τρισίνη pH 7,8, 300 mM σακχαρόζη, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA, 0,2% BSA και 1mM PMSF σε pH7,8. Το μείγμα διηθήθηκε από οκταπλό φύλλο γάζας και το διήθημα φυγοκεντρήθηκε στα 7500g για 20min. Το ίζημα (χλωροπλάστες) διαλυτοποιήθηκε στο διάλυμα επαναιώρησης (*resuspending buffer*): 20 mM τρισίνη pH 7,8, 70 mM σακχαρόζη και 5 mM $MgCl_2$) και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε στα 7500g για 20min. Το ίζημα που καταβυθίστηκε (θυλακοειδή), διαλυτοποιήθηκε ξανά στο διάλυμα επαναιώρησης (Berthold et al., 1981). Όλα τα βήματα πραγματοποιήθηκαν στο σκοτάδι και σε θερμοκρασία 4^oC.

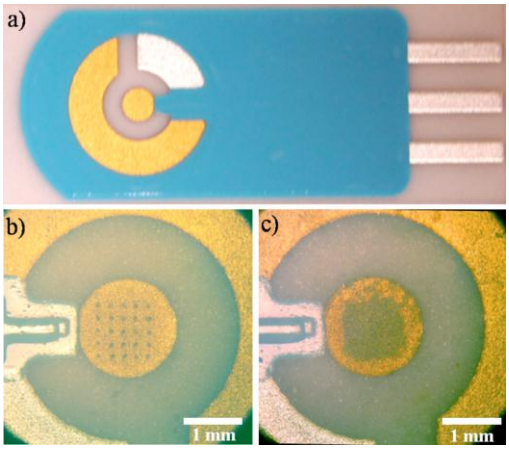
1. Τα φύλλα σπανακιού τοποθετούνται στο μίξερ με το ρυθμιστικό διάλυμα (*grinding buffer*) σε αναλογία 1:2 g/ml για 2x1min σε 4^0C στο σκοτάδι. Μεταξύ των δυο αλεσμάτων μπαίνει το μείγμα στο ψυγείο για λίγα λεπτά.
2. Το μείγμα φιλτράρεται με τη χρήση 8 στρωμάτων γάζας ή 2 Whatman ® Papers.
3. Το μείγμα φυγοκεντρείται σε 700g για 2min, στους 4^0C όπου καθαρίζεται το μείγμα από σβόλους.
4. Το μείγμα φυγοκεντρείται στα 7500g για 10min στους 4^0C όπου καθαρίζεται από το υπερκείμενο.
5. Διαλύεται το ίζημα στο διάλυμα επανεώρησης (δν έχει σημασία ο όγκος)
6. Φυγοκεντρείται το μείγμα στα 7500g για 10min στους 4^0C όπου απομονώνεται το ίζημα των θυλακοειδών.
7. Επαναφυγοκεντρείται το ίζημα διαλυμένο στο διάλυμα (επανεώρησης *resuspending buffer*) όπου μετά ομογενωποιείται απαλά με ένα πινέλο.
8. Μετράται ο όγκος και υπολογίζεται η συγκέντρωση των θυλακοειδών μεμβρανών (συνήθως είναι 2,5-3 mg/ml)
9. Επαληθεύεται η φωτοσυνθετική δραστηριότητα με φθορισμό.

Τα παρασκευάσματα των θυλακοειδών μεμβρανών, πριν από κάθε βιοχημική επεξεργασία, ήταν αποθηκευμένα σε θερμοκρασία -80^oC. Οι φυγοκεντρήσεις έγιναν με φυγόκεντρο Heraeus SEPATECH, τύπου Suprafuge 22, χρησιμοποιώντας κεφαλές HFA 2194 ή HFA 14290, ή με φυγόκεντρο SIGMA, τύπου 3K20, με κεφαλή Nr: 12258. Η απομόνωση των θυλακοειδών μεμβρανών έγινε στο ινστιτούτο κρυσταλλογραφίας της Ρώμης (Institute of Crystallography, CNR, Montelibretti Rome).

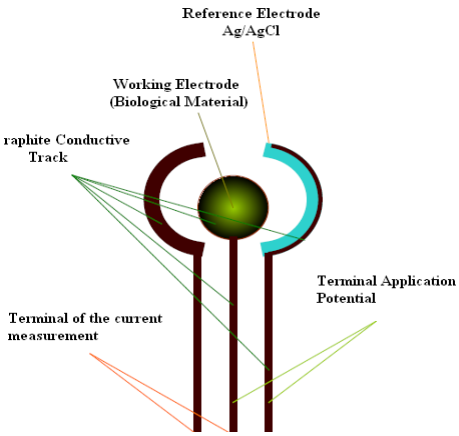
3.2 Πειραματική διαδικασία: Εναπόθεση και ακινητοποίηση θυλακοειδών σε αμπερομετρικούς αισθητήρες

Η εναπόθεση και η ακινητοποίηση των θυλακοειδών μεμβρανών σε ηλεκτρόδια χρυσού έγινε στο ΕΜΠ με τη χρήση της διάταξης LIFT υγρής φάσης. Η πειραματική διάταξη του εργαστηρίου LIFT υγρής φάσης του ΕΜΠ αποτελείται από ένα Nd:YAG laser (266nm,4ns) και ένα σύστημα μικρομηχανικής τα οποία έχουν περιγραφεί στην ανωτέρω πειραματική διαδικασία λεπτομερώς. Ο στόχος στον οποίο επικαλύπτεται το διάλυμα των θυλακοειδών αποτελείται από quartz μιας ίντσας, στον οποίο έχει τοποθετηθεί ένα στρώμα 40nm τιτανίου. Πάνω στο στόχο, στη συνέχεια απλώνονται 10μL του διαλύματος που εμπεριέχονται τα θυλακοειδή. Το τελικό διάλυμα θυλακοειδών μεμβρανών στο στόχο, ήταν συγκέντρωσης 2,5 mg/mL. Παράλληλα στο στόχο τοποθετήθηκε ο αισθητήρας, σε απόσταση 300 μm.

Ο αισθητήρας αποτελείται από τρία ηλεκτρόδια (*Εικόνα 26*), ένα ηλεκτρόδιο εργασίας διαμέτρου 1,6 mm **(working)** όπου εμφανίζεται η επιθυμητή αντίδραση, ένα ηλεκτρόδιο αναφοράς **(reference)** και ένα βοηθητικό ηλεκτρόδιο **(counter)**. Μεταξύ του ηλεκτροδίου εργασίας και του ηλεκτροδίου αναφοράς εφαρμόζεται σταθερό δυναμικό με τη βοήθεια ποτενσιοστάτη. Η τιμή του δυναμικού επιλέγεται έτσι ώστε ο αναλύτης να μπορεί να αντιδράσει στο ηλεκτρόδιο εργασίας. Το ρεύμα που παράγεται από την οξείδωση ή την αναγωγή του αναλύτη διαρρέει το κύκλωμα μέσω του βοηθητικού ηλεκτροδίου. Το παραγόμενο ρεύμα (καταγραμμένο σήμα) μπορεί να συσχετιστεί με τη συγκέντρωση του αναλύτη. Αυτό επιτυγχάνεται κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες μέτρησης και έτσι η ένταση του ρεύματος που λαμβάνεται είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση του αναλύτη.



Εικόνα 25: α) Φωτογραφία του αμπερομετρικού αισθητήρα στον οποίο έγινε εναπόθεση με laser, β) Array 5x5, εναποτιθέμενο με laser, από το διάλυμα των θυλακοειδών πάνω στο ηλεκτρόδιο εργασίας του αισθητήρα, γ) Συνεχόμενο φιλμ εναποτιθέμενο με laser πάνω το ηλεκτρόδιο εργασίας του αισθητήρα.

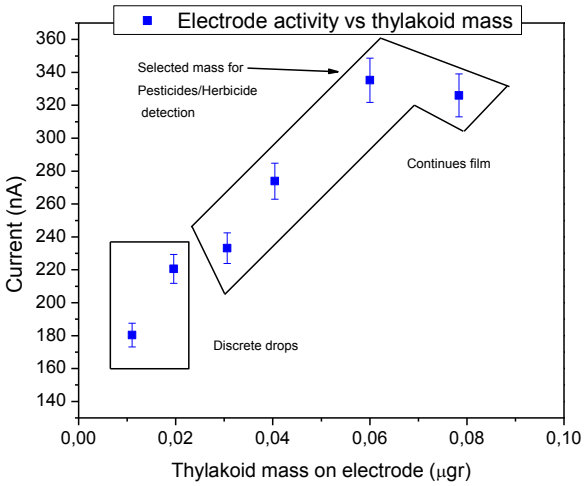


Εικόνα 26 : Σχηματική απεικόνιση ηλεκτροδίων εργασίας, αναφοράς και βοηθητικού ηλεκτροδίου.

Για την επιλογή της κατάλληλης μορφής της μικροσυστοιχίας πάνω στον αισθητήρα έγινε μια σειρά πειραμάτων εναπόθεσης που περιγράφεται συνοπτικά στο παρακάτω πίνακα:

Pattern	Total droplets	Estimated diameter (μm)	Estimated volume on electrode (pL)	Estimated mass on electrode (Thyl. μgr)
16x16	256	150	131781	1,00417
14x14	196	150	100895	0,76882
11x12	132	150	67950	0,51778
10x10	100	150	51477	0,39225
8x8	64	150	32945	0,25104
6x6	36	150	18532	0,14121

Τα αποτελέσματα εναπόθεσης φαίνονται στο *Σχήμα 27*



Σχήμα 27: Δραστικότητα των ηλεκτροδίων χρυσού συναρτήσει της μάζας των θυλακοειδών που έχει εκτυπωθεί.

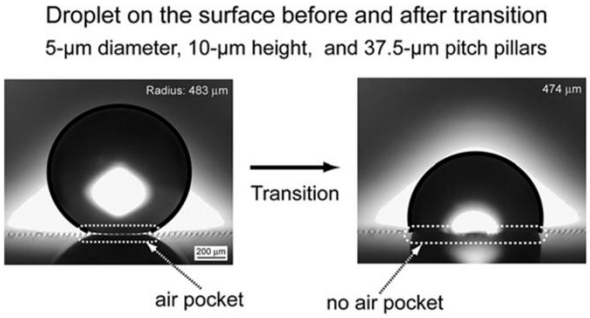
Η ενέργεια εναπόθεσης (400 mJ/cm^2) και η διάμετρος του laser πάνω στο στόχο (60μm) υπολογίστηκαν έτσι ώστε να γίνεται εναπόθεση σταγόνες διαμέτρου 150μm στο ηλεκτρόδιο εργασίας του αισθητήρα. Η εναπόθεση έγινε με τέτοιες συνθήκες ώστε με ένα παλμό να γίνεται η εναπόθεση κάθε σταγόνας.
Το διάλυμα των θυλακοειδών αποτελούνταν από buffer 25mM 2-(*N*-morpholino) ethanesulfonic acid (MES) *p*H=6.0, sucrose 70 mM, and NaCl 15 mM.

Το *Σχήμα 27* χωρίζεται σε δύο περιοχές. Στην πρώτη περιοχή η μικροσυστοιχία αποτελείται από 36 και 64 σταγόνες, όπου οι σταγόνες είναι διακριτές πάνω στο ηλεκτρόδιο εργασίας. Στη δεύτερη περιοχή (256, 196, 132, 100 σταγόνες) σχηματίζεται συνεχόμενο φιλμ στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μέτρησης του ρεύματος, για την ανίχνευση των φυτοφαρμάκων, που περιγράφεται παρακάτω, επιλέχθηκε η δημιουργία συνεχόμενου φιλμ (pattern 14x14)

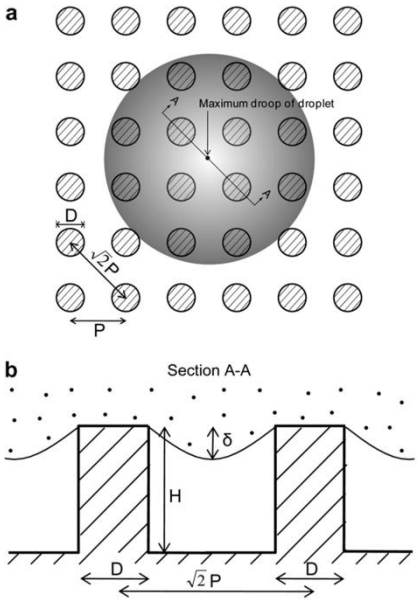
Η αιτιολόγηση της ακινητοποίησης του βιολογικού δείγματος στην επιφάνεια των ηλεκτροδίων είναι αποτέλεσμα διερεύνησης της φυσική διαδικασίας εναπόθεσης μέσω της τεχνικής LIFT. Το ηλεκτρόδιο εργασίας του αισθητήρα αποτελείται από επιφάνεια χρυσού μεγάλης τραχύτητας (μετρήθηκε από AFM RMS=0,5μm), έτσι ώστε να σχηματίζονται κοιλάδες στην επιφάνειά του. Οι επιφάνειες με μεγάλη τραχύτητα παρουσιάζουν δύο στάδια προσρόφησης υγρών (Cassie state, Wenzel state).
Η διαμόρφωση της σταγόνας σε επιφάνειες με μεγάλη τραχύτητα εξαρτάται από επιφανειακά φαινόμενα και όχι από τη δύναμη της βαρύτητας. Η καμπυλότητα της σταγόνας δίνεται από την εξίσωση Laplace, στην οποία συνδέεται η καμπυλότητα με την πίεση στο εσωτερικό της σταγόνας. Η μέγιστη εισχώρηση της σταγόνας ανάμεσα από δύο προεξοχές της επιφάνειας δίνεται σύμφωνα με την *Εικόνα 28* ως:

$$\delta = \frac{(\sqrt{2}\,P - D)^2}{8R}$$

Αν η εισχώρηση της σταγόνας είναι μεγαλύτερη από το ύψος H των προεξοχών γίνεται μεταβίβαση από την κατάσταση Cassie στην κατάσταση Wenzel. Ο λόγος της μεγαλύτερης εισχώρησης της σταγόνας βασίζεται στην εκτόπιση του παγιδευμένου αέρα ανάμεσα στις προεξοχές. Αίτιο για την εκτόπιση του αέρα είναι η πίεση της σταγόνας πάνω στην επιφάνεια, τα επιφανειακά κύματα στην επιφάνεια της σταγόνας, η βαρυτική δύναμη αλλά και η διάμετρος της σταγόνας και η απόσταση διαδοχικών προεξοχών.



Εικόνα 27 : Σταγόνες στην κατάσταση Cassie (αριστερά) και στην κατάσταση Wenzel (δεξιά) σε επιφάνειες πυριτίου μεPF_3.[58]

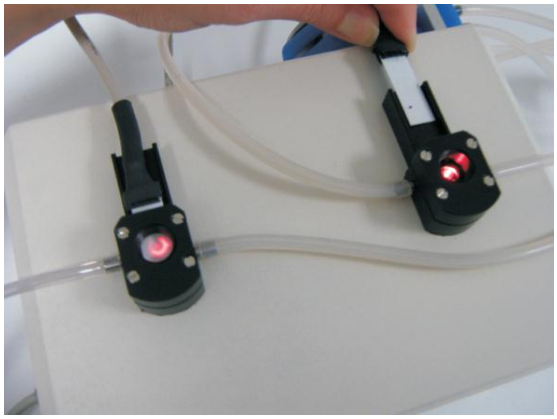


Εικόνα 28: Σταγόνα σε υδρόφοβη επιφάνεια μεγάλης τραχύτητας. D είναι η διάμετρος των προεξοχών, H είναι το ύψος των προεξοχών και √2 P το διάκενο των προεξοχών.[58]

Σύμφωνα με την Cassie state, γίνεται μερική προσρόφηση του υγρού, ενώ σύμφωνα με την Wenzel state γίνεται πλήρης προσρόφηση. Κατά την διαδικασία ακτινοβόλησης του στόχου με το laser, δημιουργείται jet υψηλής πίεσης το οποίο κατευθύνει το υγρό με πολύ μεγάλη ταχύτητα (της τάξης των 100m/s [59]) στο ηλεκτρόδιο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα οι σταγόνες που μεταφέρονται να ασκούν πολύ μεγάλη πίεση (της τάξης των MPascal) στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Η πίεση αυτή είναι αρκετή για την εισχώρηση του υγρού στις κοιλάδες του ηλεκτροδίου, εκτοπίζοντας τον παγιδευμένο στις κοιλάδες αέρα, και έτσι το στάδιο προσρόφησης μεταβάλλεται από Cassie state σε Wenzel state.

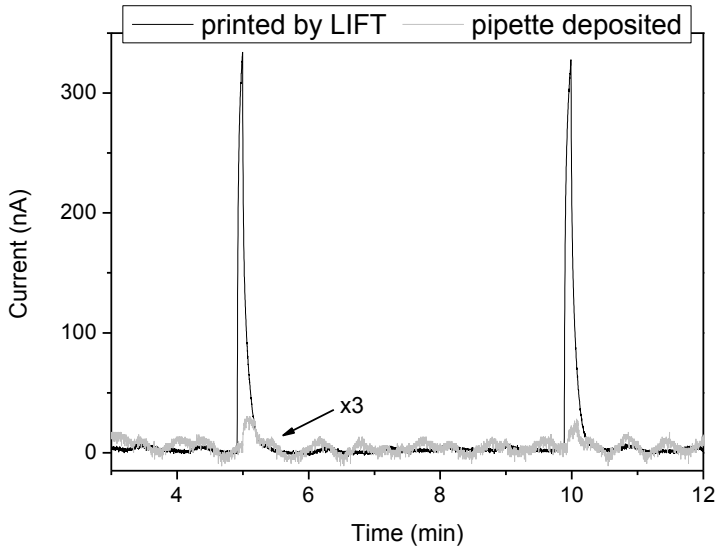
3.3 Αποτελέσματα αμπερομετρικής μέτρησης αισθητήρων.

Οι μετρήσεις των αισθητήρων έγιναν στο εργαστήριο του ΕΜΠ, στο τομέα φυσικής, χρησιμοποιώντας το αμπερομετρικό σύστημα Biosensor srl. μέσω του οργάνου AMPBIOSPE. Το AMPBIOSPE (*Εικόνα 29*) αποτελείται από δύο κελιά ροής, 30mm εξωτερικής διαμέτρου, 25mm ύψους όπου μπορούν να τοποθετηθούν τα ηλεκτρόδια. Το υγρό διάλυμα ρέει με μικρή ταχύτητα μέσω μιας περισταλτικής αντλίας. Αυτή η συσκευή είναι εξοπλισμένη και με ηλεκτρονικό εξοπλισμό για απεικόνιση, επεξεργασία και αποθήκευση των μετρήσεων. Οι παράμετροι που μπορούν να προγραμματιστούν είναι η επιλογή και η λειτουργία LED (peak 652nm, light intensity 130 μmol photons m^{-2} s^{-1}), η ταχύτητα ροής, ο κύκλος των μετρήσεων, ο αριθμός του κύκλου των μετρήσεων, η δυναμική ή στατική λειτουργία.
Τα ηλεκτρόδια, στα οποία έχει γίνει ακινητοποίηση του φωτοσυνθετικού υλικού τοποθετούνται στο εσωτερικό των κελιών όπου γίνεται η ροή. Στα κελιά αυτά υπάρχουν δύο δίοδοι LED οι οποίες φωτίζουν το ενεργό φωτοσυνθετικό υλικό με αποτέλεσμα την διεξαγωγή οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων, που οδηγούν στη δημιουργία ρεύματος. Η αμπερομετρική ανίχνευση του ρεύματος αυτού που παράγεται από τη διαδικασία της φωτοσύνθεσης μετριέται πέντε δευτερόλεπτα μετά την ακτινοβόληση με LED παρουσία του τεχνητού αποδέκτη ηλεκτρονίων DCPIP. Στη συνέχεια το ηλεκτρόδιο ξεπλένεται από το buffer μέτρησης (20mM Tricine pH=7.8, 70mM sucrose, 15mM NaCl, 5mM MgCl2 and 30μM DCPIP) με ρυθμό ροής 130μL/min. όλες οι μετρήσεις γίνονται σε θερμοκρασία δωματίου.



Εικόνα 29: Κελιά ροής που υπάρχουν στο όργανο μέτρησης (AMPBIO-SPE Biosensor SRL)των αμπερομετρικών αισθητήρων.

Για να φανούν τα αποτελέσματα φυσικής προσρόφησης των ηλεκτροδίων, μέσω της μεθόδου εναπόθεσης με laser LIFT έγινε εναπόθεση διαλύματος θυλακοειδών με χρήση laser και πιπέτας. Τα ηλεκτρόδια αυτά τοποθετήθηκαν στο όργανο μέτρησης *AMPBIO-SPE* όπου ακτινοβολήθηκαν, μετά από πέντε λεπτά. Η ταχύτητα ροής του διαλύματος μέτρησης ήταν ίδια και στις δύο περιπτώσεις (350μl/min όπως και ο χρόνος ακτινοβόλησης (7 sec). Τα αποτελέσματα του πειράματος αυτού φαίνονται στο *Σχήμα 28*.



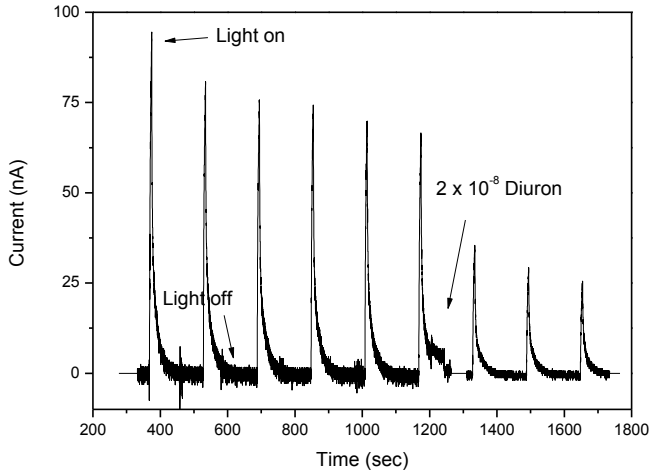
Σχήμα 28: Ηλεκτρικές μετρήσεις αισθητήρων στους οποίους έχει γίνει εναπόθεση με LIFT και με πιπέτα.

Από τις αμπερομετρικές μετρήσεις που καταγράφηκαν (*Σχήμα 28: Ηλεκτρικές μετρήσεις αισθητήρων στους οποίους έχει γίνει εναπόθεση με LIFT και με πιπέτα.*) παρατηρείται ότι το ρεύμα που καταγράφεται από τη φωτοσύνθεση των θυλακοειδών, είναι πολύ μεγαλύτερο στην περίπτωση εναπόθεσης με laser από την περίπτωση εναπόθεσης με πιπέτα. Οι παραπάνω μετρήσεις οδηγούν στο συμπέρασμα της ακινητοποίησης του βιολογικού υλικού με τη χρήση του laser.

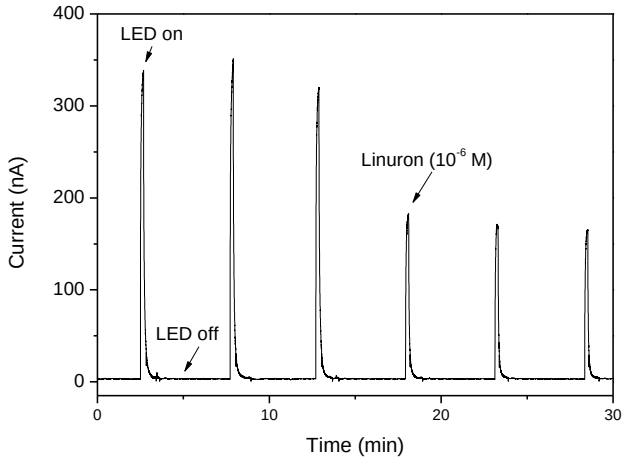
Για να γίνει έλεγχος της λειτουργικότητας του αισθητήρα, έγινε ανίχνευση δύο ζιζανιοκτόνων: Diuron 3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff. και Linuron 3-(3,4-dichlorophenyl)-1-methoxy-1-methylurea.

Όπως περιγράφηκε και στο Κεφάλαιο 1, η παρουσία ζιζανιοκτόνου, αναστέλλει τη διαδικασία της φωτοσύνθεσης. Παρουσία ζιζανιοκτόνου, αναμένεται το καταμετρούμενο ρεύμα να μειώνεται αισθητά.

Στο *Σχήμα 7* φαίνεται η αναστολή της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας του ακινητοποιημένου φωτοσυνθετικού υλικού, παρουσία ζιζανιοκτόνου. Το buffer στο οποίο περιέχεται το ζιζανιοκτόνο αποτελείται από 20mM Tricine pH=7.8, 70mM sucrose, 15mM NaCl, 5mM $MgCl_2$ and 30μM DCPIP. Πριν γίνει ροή του παραπάνω διαλύματος, γινόταν ακτινοβόληση του ακινητοποιημένου φωτοσυνθετικού υλικού έξι φορές. Η συγκέντρωση του ζιζανιοκτόνου ήταν $2x10^{-8}$M.



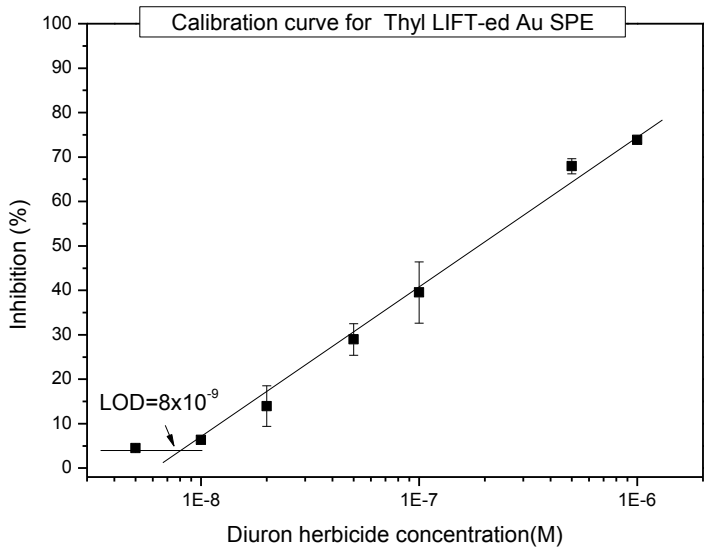
Σχήμα 29: Σήμα φωτοαναστολής κατά την εισχώρηση ζιζανιοκτόνου Diuron (2x10^{-8}M)



Σχήμα 30: Σήμα φωτοαναστολής κατά την εισχώρηση ζιζανιοκτόνου Linuron (10^{-6}M)

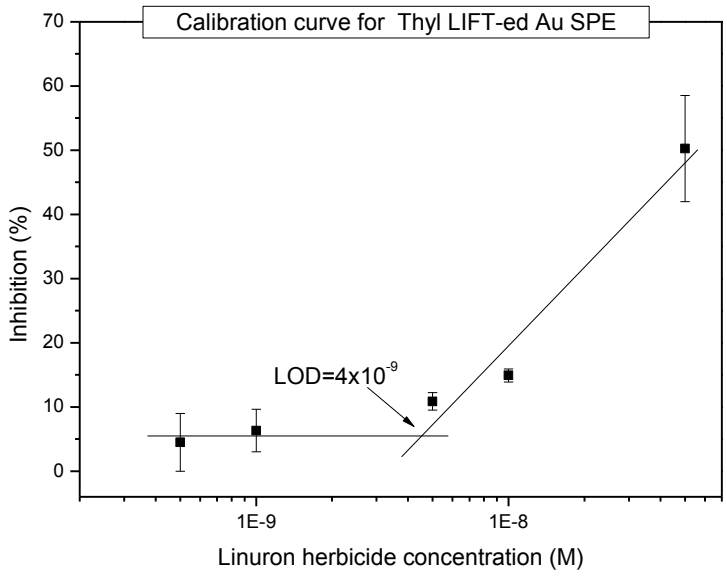
Στα δύο παραπάνω σχήματα (*Σχήμα 29,Σχήμα 30*) καταγράφεται μείωση του σήματος περίπου κατά 50%. Εκτός από την αναστολή που μπορεί να προκαλέσει ένα ζιζανιοκτόνο, ιδιαίτερη αξία έχει και το εύρος συγκεντρώσεων που μπορεί να ανιχνευτεί.

Το εύρος συγκεντρώσεων του ζιζανιοκτόνου Diuron που μπορεί να ανιχνεύσει ο βιοαισθητήρας περιγράφεται από την παρακάτω καμπύλη



Σχήμα 31: Καμπύλη αναφοράς για την ανίχνευση ζιζανιοκτόνου Diuron σε ηλεκτρόδια χρυσού (DRP 223 BT, high roughness), στα οποία έχει γίνει εναπόθεση με LIFT.

Το εύρος συγκεντρώσεων ζιζανιοκτόνου Linuron που μπορεί να ανιχνεύσει ο αισθητήρας περιγράφεται από την παρακάτω καμπύλη.



Σχήμα 32: Καμπύλη αναφοράς για την ανίχνευση ζιζανιοκτόνου Linuron, σε ηλεκτρόδια χρυσού (DRP 223 BT, high roughness), στα οποία έχει γίνει εναπόθεση με LIFT.

Πίνακες πειραματικών δεδομένων

Thylacoid solution (stock) (mg/mL)	LIFT-ed solution	Target	Volume on target (μL)	Laser beam diameter (μm)	Sub - Target distance (μm)	Energy density (mJ/cm^2)	Pattern	Total droplets	Estimated diameter (μm)	Rough estimation (μL) (Airradiate/Atotal)*10μL	Estimated mass on electrode (Thyl. μgr)	Pesticide-Concentration
2,54	2,54	Ti (40nm) on quartz	10	60	200	350	14x14	196	150	0,0815	0,20698	Diuron (10-6M)
2,54	2,54	Ti (40nm) on quartz	10	60	200	350	14x14	196	150	0,0815	0,20698	Diuron (10-6M)
2,54	2,54	Ti (40nm) on quartz	10	60	200	350	14x14	196	150	0,0815	0,20698	Diuron (10-6M)
2,54	2,54	Ti (40nm) on quartz	10	60	200	350	14x14	196	150	0,0815	0,20698	Diuron (10-6M)
2,54	2,54	Ti (40nm) on quartz	10	60	200	350	14x14	196	150	0,0815	0,20698	Diuron (10-6M)
2,54	2,54	Ti (40nm) on quartz	10	60	200	350	14x14	196	150	0,0815	0,20698	Diuron (10-8M)
2,54	2,54	Ti (40nm) on quartz	10	60	200	350	14x14	196	150	0,0815	0,20698	Diuron (10-8M)
2,54	2,54	Ti (40nm) on quartz	10	60	200	350	14x14	196	150	0,0815	0,20698	Diuron (5x10-7M)
2,54	2,54	Ti (40nm) on quartz	10	60	200	350	14x14	196	150	0,0815	0,20698	Diuron (5x10-7M)
2,54	2,54	Ti (40nm) on quartz	10	60	200	350	14x14	196	150	0,0815	0,20698	Diuron (5x10-7M)
2,54	2,54	Ti (40nm) on quartz	10	60	200	350	14x14	196	150	0,0815	0,20698	Diuron (5x10-7M)
2,54	2,54	Ti (40nm) on quartz	10	60	200	350	14x14	196	150	0,0815	0,20698	Diuron (10-7M)
2,54	2,54	Ti (40nm) on quartz	10	60	200	350	14x14	196	150	0,0815	0,20698	Diuron (10-7M)
2,54	2,54	Ti (40nm) on quartz	10	60	200	350	14x14	196	150	0,0815	0,20698	Diuron (10-7M)
2,54	2,54	Ti (40nm) on quartz	10	60	200	350	14x14	196	150	0,0815	0,20698	Diuron (10-7M)
2,54	2,54	Ti (40nm) on quartz	10	60	200	350	14x14	196	150	0,0815	0,20698	Diuron (5x10-8M)
2,54	2,54	Ti (40nm) on quartz	10	60	200	350	14x14	196	150	0,0815	0,20698	Diuron (5x10-8M)
2,54	2,54	Ti (40nm) on quartz	10	60	200	350	14x14	196	150	0,0815	0,20698	Diuron (5x10-8M)
2,54	2,54	Ti (40nm) on quartz	10	60	200	350	14x14	196	150	0,0815	0,20698	Diuron (5x10-8M)
2,54	2,54	Ti (40nm) on quartz	10	60	200	350	14x14	196	150	0,0815	0,20698	Diuron (10-8M)
2,54	2,54	Ti (40nm) on quartz	10	60	200	350	14x14	196	150	0,0815	0,20698	Diuron (10-8M)
2,54	2,54	Ti (40nm) on quartz	10	60	200	350	14x14	196	150	0,0815	0,20698	Diuron (10-8M)
2,54	2,54	Ti (40nm) on quartz	10	60	200	350	14x14	196	150	0,0815	0,20698	Diuron (10-8M)
2,54	2,54	Ti (40nm) on quartz	10	60	200	350	14x14	196	150	0,0815	0,20698	Diuron (2x10-8M)
2,54	2,54	Ti (40nm) on quartz	10	60	200	350	14x14	196	150	0,0815	0,20698	Diuron (2x10-8M)

2,54	2,54	Ti (40nm) on quartz	10	60	200	350	14x14	196	150	0,0815	0,20698	Diuron (2x10-8M)
2,54	2,54	Ti (40nm) on quartz	10	60	200	350	14x14	196	150	0,0815	0,20698	Diuron (5x10-9M)
2,54	2,54	Ti (40nm) on quartz	10	60	200	350	14x14	196	150	0,0815	0,20698	Diuron (5x10-9M)
2,54	2,54	Ti (40nm) on quartz	10	60	200	350	14x14	196	150	0,0815	0,20698	Diuron (5x10-9M)
2,54	2,54	Ti (40nm) on quartz	10	60	200	350	14x14	196	150	0,0815	0,20698	Diuron (10-8M)
2,54	2,54	Ti (40nm) on quartz	10	60	200	350	14x14	196	150	0,0815	0,20698	Linuron (10-7M)
2,54	2,54	Ti (40nm) on quartz	10	60	200	350	14x14	196	150	0,0815	0,20698	Linuron (10-7M)
2,54	2,54	Ti (40nm) on quartz	10	60	200	350	14x14	196	150	0,0815	0,20698	Linuron (10-7M)
2,54	2,54	Ti (40nm) on quartz	10	60	200	350	14x14	196	150	0,0815	0,20698	Linuron (10-7M)
2,54	2,54	Ti (40nm) on quartz	10	60	200	350	14x14	196	150	0,0815	0,20698	Linuron (5x10-8M)
2,54	2,54	Ti (40nm) on quartz	10	60	200	350	14x14	196	150	0,0815	0,20698	Linuron (5x10-8M)
2,54	2,54	Ti (40nm) on quartz	10	60	200	350	14x14	196	150	0,0815	0,20698	Linuron (5x10-8M)
2,54	2,54	Ti (40nm) on quartz	10	60	200	350	14x14	196	150	0,0815	0,20698	Linuron (10-8M)
2,54	2,54	Ti (40nm) on quartz	10	60	200	350	14x14	196	150	0,0815	0,20698	Linuron (10-8M)
2,54	2,54	Ti (40nm) on quartz	10	60	200	350	14x14	196	150	0,0815	0,20698	Linuron (10-8M)
2,54	2,54	Ti (40nm) on quartz	10	60	200	350	14x14	196	150	0,0815	0,20698	Linuron (10-8M)
2,54	2,54	Ti (40nm) on quartz	10	60	200	350	14x14	196	150	0,0815	0,20698	Linuron (5x10-9M)
2,54	2,54	Ti (40nm) on quartz	10	60	200	350	14x14	196	150	0,0815	0,20698	Linuron (5x10-9M)
2,54	2,54	Ti (40nm) on quartz	10	60	200	350	14x14	196	150	0,0815	0,20698	Linuron (5x10-9M)
2,54	2,54	Ti (40nm) on quartz	10	60	200	350	14x14	196	150	0,0815	0,20698	Linuron (10-9M)
2,54	2,54	Ti (40nm) on quartz	10	60	200	350	14x14	196	150	0,0815	0,20698	Linuron (10-9M)
2,54	2,54	Ti (40nm) on quartz	10	60	200	350	14x14	196	150	0,0815	0,20698	Linuron (10-9M)
2,54	2,54	Ti (40nm) on quartz	10	60	200	350	14x14	196	150	0,0815	0,20698	Linuron (5x10-10M)
2,54	2,54	Ti (40nm) on quartz	10	60	200	350	14x14	196	150	0,0815	0,20698	Linuron (5x10-10M)

Κεφάλαιο 4

4.1 Σύνοψη αποτελεσμάτων

Στα πλαίσια της μεταπτυχιακής εργασίας, μελετήθηκε η χρήση της τεχνικής εναπόθεσης με laser LIFT, για την ανάπτυξη μικροσυστοιχειών βιολογικών διαλυμάτων. Τα βιουλικά που επιλέχθηκαν ήταν ολιγονουκλεοτίδια και θυλακοειδής μεμβράνες. Τα ολιγονουκλεοτίδια εναποτέθηκαν σε επιφάνειες GOPTS/LTO/Si, Au/LTO/Si και σε μεμβράνες αισθητήρων χωρητικότητας ενώ οι θυλακοειδής μεμβράνες εναποτέθηκαν σε χρυσά ηλεκτρόδια, αμπερομετρικών αισθητήρων. Πριν την εναπόθεση των βιουλικών έγινε έρευνα για την τροποποίηση των επιφανειών έτσι ώστε να εξασφαλιστεί η ακινητοποίησή τους.

Για τις επιφάνειες LTO/Si επιλέχθηκαν δύο δυνατές τροποποιήσεις. Στην πρώτη χρησιμοποιήθηκε ένα είδος σιλανίου GOPTS (3-glycidoxypropyltrimethoxysilane) και στη δεύτερη χρησιμοποιήθηκε στρώμα χρυσού πάχους 200 nm. Τα αποτελέσματα και στις δύο περιπτώσεις έδειξαν την επιτυχή ακινητοποίηση των ολιγομερών με μόνο περιορισμό ότι στις επιφάνειες Au/LTO/Si έπρεπε η εναπόθεση των ολιγομερών να γίνεται σε μικρό χρονικό διάστημα μετά την εναπόθεση του στρώματος χρυσού (την ίδια μέρα). Εκτός από τις παραπάνω επιφάνειες εξετάστηκε και η πιθανότητα ακινητοποίησης των ολιγομερών σε μη τροποποιημένες επιφάνειες LTO/Si χωρίς όμως να επιτευχθεί η ακινητοποίηση των ολιγομερών λόγω της μικρής τραχύτητας των επιφανειών. Τα ολιγομερή που εναποτέθηκαν σε επιφάνειες LTO/Si τροποποιημένες με GOPTS επιλέχθηκαν για πειράματα υβριδοποίησης, τα οποία επιβεβαίωσαν και τη βιοενεργότητα των εναποτιθέμενων ολιγομερών. Οι διαστάσεις των εναποτιθέμενων σταγόνων καθορίστηκαν από τις συνθήκες εναπόθεσης, έτσι ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν οι μικροσυστοιχίες των ολιγομερών σε αισθητήρες χωρητικότητας.

Διαλύματα βιουλικών	Επιφάνειες που εναποτέθηκαν	Τρόπος ανίχνευσης
Διάλυμα ολιγονουκλεοτιδίων-ανιχνευτών: 1.0 M potassium phosphate buffer pH 8 Διάλυμα ολιγονουκλεοτιδίων-στόχων: 1.0 M potassium phosphate buffer, pH 8 Διάλυμα ξεπτλύματος: 10 mM NaCl σε 5 mM Tris buffer, pH 7.4.	GOPTS/LTO/Si Au/LTO/Si LTO/Si Μεμβράνες αισθητήρων χωρητικότητας τροποποιημένες με σιλάνιο GOPTS.	Μέσω συνεστιακού μικροσκοπίου. Μέσω μετρήσεων χωρητικότητας

Ως άμεσους μελλοντικούς στόχους στην εναπόθεση ολιγομερών, θα μπορούσαμε να θέσουμε:

- Την εναπόθεση ολιγομερών σε επιφάνειες LTO/Si με διαφορετική τραχύτητα, έτσι ώστε να εξεταστεί η δυνατότητα άμεσης ακινητοποίησης των ολιγομερών μέσω φυσικής προσρόφησης. Τα πειράματα αυτά έχουν δρομολογηθεί και οι τραχύτητες που έχουν επιλεγεί είναι από 50 έως 100 nm (RMS).
- Την εναπόθεση ολιγομερών σε αισθητήρες χωρητικότητας τροποποιημένους με επίστρωση χρυσού, σύμφωνα με τα δυο πρωτόκολλα ακινητοποίησης που επιλέχθηκαν.
- Την εναπόθεση ολιγομερών σε αισθητήρες χωρητικότητας τροποποιημένους με GOPTS για την εξέταση της επαναληψιμότητας των μετρήσεων αλλά και για περεταίρω δοκιμές ανίχνευσης ολιγονουκλεοτιδίων με ένα mismatch.

Στην παρούσα εργασία, εκτός από εναπόθεση ολιγομερών έγινε και εναπόθεση θυλακοειδών μεμβρανών σε αμπερομετρικούς αισθητήρες. Η ακινητοποίηση των θυλακοειδών έγινε στο ηλεκτρόδιο εργασίας του αισθητήρα, το οποίο είχε διάμετρο 1.6mm και ήταν κατασκευασμένος από χρυσό υψηλής τραχύτητας (0,5μm). Για την ακινητοποίηση δεν χρειάστηκε επιπλέον τροποποίηση η επιφάνεια του ηλεκτροδίου, εφόσον έγινε μέσω της τεχνικής LIFT. Στη συνέχεια συγκρίθηκαν οι αμπερομετρικές μετρήσεις ηλεκτροδίων στα οποία είχε γίνει εναπόθεση με laser και σε ηλεκτρόδια όπου η εναπόθεση είχε γίνει με πιπέτα. Σε αυτά τα πειράματα, φάνηκαν τα πλεονεκτήματα που παρουσιάζει η τεχνική LIFT (άμεση ακινητοποίηση και επιλεκτική εναπόθεση). Στη συνέχεια, έγινε ροή στα ηλεκτρόδια δύο ευρέως χρησιμοποιούμενων ζιζανιοκτόνων Diuron 3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff. και Linuron 3-(3,4-dichlorophenyl)-1-methoxy-1-methylurea. Οι αμπερομετρικές μετρήσεις έδειξαν αναστολή της διαδικασίας της φωτοσύνθεσης σε ποσοστό περίπου 50%. Σύμφωνα με τα παραπάνω, έγινε επιτυχής κατασκευή βιοαισθητήρα, για ανίχνευση φυτοφαρμάκων.

Διαλύματα βιουλικών	Επιφάνειες που εναποτέθηκαν	Τρόπος ανίχνευσης
Διάλυμα θυλακοειδών: από buffer 25mM 2-(*N*-morpholino) ethanesulfonic acid (MES) *p*H=6.0, sucrose 70 mM, and NaCl 15 mM. Buffer μέτρησης (20mM Tricine pH=7.8, 70mM sucrose, 15mM NaCl, 5mM MgCl2 and 30μM DCPIP) Buffer στο οποίο περιέχεται το ζιζανιοκτόνο αποτελείται από	Ηλεκτρόδιο εργασίας αμπερομετρικού αισθητήρα.	Μέσω αμπερομετρικών μετρήσεων.

20mM Tricine pH=7.8, 70mM sucrose, 15mM NaCl, 5mM $MgCl_2$ and 30μM DCPIP		

Τέλος, προτείνονται ως μελλοντικοί στόχοι στους αμπερομετρικούς αισθητήρες φυτοφαρμάκων:

- Εναπόθεση σε επιφάνειες αισθητήρων με διαφορετική τραχύτητα, έτσι ώστε να διαπιστωθεί υπό ποιες συνθήκες γίνεται η ακινητοποίηση.
- Εναπόθεση σε ηλεκτρόδια με διαφορετικές επιφάνειες πχ:CNTs
- Εναπόθεση άλλων φωτοσυνθετικών βιολογικών δειγμάτων (π.χ: ενζύμων).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

[1] *K.K.B. Hon,, L. Li, I.M. HutchingsCIRP Annals - Manufacturing Technology 57 (2008) 601–620*
[2] *http://www.nanoink.net*
[3] *Kim KH, Moldovan N, Espinosa HD (2005),Small 1(6):632–635.*
[4] *Hong S, Zhu J, Mirkin CA (1999), Science 286:523–525.*
[5] *http://www.nscryptinc.com*
[6] *http://www.micropen.com/*
[7] *Zhang C, Liu D, Mathews SA, Graves J, Shaefer TM, Gilbert BK,Modi R,Wu HD, Chrisey DB (2003), Microelectronic Engineering 70(1):41–49.*
[8] *I.Zergioti, A. Karaiskou and D. G. Papazoglou, C. Fotakis, M. Kapsetaki and D. Kafetzopoulos, Appl. Phys. Lett. 86, 163902,2005*
[9] *I. Zergioti, A. Karaiskou, D.G. Papazoglou, C. Fotakis, M. Kapsetaki, D. Kafetzopoulos, Applied Surface Science 247 (2005) 584–589*
[10] *C. Boutopoulos, P. Andreakou, D. Kafetzopoulos, S. Chatzandroulis and I. Zergioti, phys. stat. sol. (a) 205, No. 11 (2008)*
[11] *A. Karaiskou, I.Zergioti, C. Fotakis, M. Kapsetaki and D. Kafetzopoulos et al./ Applied surface Sciense 208-209(2003)245-249*
[12] *Vasiliki Tsouti, Christos Boutopoulos, Peristera Andreakou, Marina Ioannou, Ioanna Zergioti, Dimitris Goustouridis, Dimitris Kafetzopoulos, Dimitris Tsoukalas, Pascal Normand, Stavros Chatzandroulis, Microelectronic Engineering 86 (2009) 1495–1498*
[13] *J. Bohandy, B. F. Kim, and F. J. Adrian, Journal of Applied Physics 60, 1538-1539 (1986).*
[14] *K. D. Kyrkis, A. A. Andreadaki, D. G. Papazoglou, and I. Zergioti, in Recent Advances in Laser Processing of Materials, edited by J. Perriere, E. Millon, and E. Fogarassy (ELSEVIER, 2006).*
[15] *I. Zergioti, S. Mailis, N. A. Vainos, P. Papakonstantinou, C. Kalpouzos, C. P. Grigoropoulos, and C. Fotakis, Applied Physics a-Materials Science & Processing 66, 579-582 (1998).*
[16] *E. Fogarassy, C. Fuchs, F. Kerherve, G. Hauchecorne, and J. Perriere, Journal of Applied Physics 66, 457-459 (1989).*
[17] *G. B. Blanchet, Macromolecules 28, 4603-4607 (1995).*
[18] *Matthew S. Brown, Nicholas T. Kattamis, Craig B. Arnold/Microfluid Nanofluid DOI 10.1007/s10404-011-0787-4*
[19] *Jason A. Barron, David B. Krizman and Bradley R. Ringeisen, Annals of Biomedical Engineering, Vol. 33, No. 2, February 2005 (©2005) pp. 121–130*
[20] *Christina M Othon, Xingjia Wu, Juanita J Anders and Bradley R Ringeisen Biomed. Mater. 3 (2008) 034101*
[21] *APPLIED PHYSICS LETTERS 91, 171120 _2007_Kattamis et al.*
[22] *Hopp et al,.Tissue Engineering. November/December 2005, 11(11-12): 1817-1823. doi:10.1089/ten.2005.11.1817.*
[23] *C. Boutopoulos, P. Andreakou, D. Kafetzopoulos, S. Chatzandroulis and I. Zergioti, phys. stat. sol. (a) 205, No. 11 (2008)*
[24] *V. Dinca, M. Farsari, D. Kafetzopoulos, A. Popescu, M. Dinescu, C. Fotakis ,Thin Solid Films 516 (2008) 6504–6511*
[25] *A. Karaiskou, I.Zergioti, C. Fotakis, M. Kapsetaki and D. Kafetzopoulos et al./ Applied surface Sciense 208-209(2003)245-249*
[26] *P. Serra,M. Colina, J. M. Fernández-Pradas, L. Sevilla, J. L. Morenza Universitat dAppl. Phys. Lett., Vol. 85, No. 9, 30 August 2004*
[27] *J. A. Barron, H. D. Young, D. D. Dlott, M. M. Darfler, D. B. Krizman and B. R. Ringeisen Proteomics 2005, 5, 4138–4144*
[28] *P. Serra, J.M. Fernández-Pradas, F.X. Berthet, M. Colina, J. Elvira and J.L. Morenza ,Appl. Phys. A 79, 949–952 (2004)*
[29] *B.R. Ringeisen et al. / Biomaterials 23 (2002) 161–166*
[30] *J.A. Barron, R. Rosen, J. Jones-Meehan, B.J. Spargo, S. Belkin, B.R. Ringeisen, Biosensors and Bioelectronics 20 (2004) 246–252*

[31] *Wu, P. K. Ringeisen, B. R. Krizman, D. B. Frondoza, C. G. Brooks, M. Bubb, D. M. Auyeung, R. C. Y. Pique, A. Spargo, B. McGill, R. A. Chrisey, D. B. Rev. Sci. Instrum., Vol. 74, No. 4, April 2003 Laser transfer of biomaterials*
[32] *F. Guillemot, A. Souquet, S. Catros, B. Guillotin, J. Lopez, M. Faucon, B. Pippenger, R. Bareille, M. Rémy, S. Bellance, P. Chabassier, J.C. Fricain, J. Amédée/ Acta Biomaterialia 6 (2010) 2494–2500*
[33] *http://www.novalase.com*
[34] Vasiliki Tsouti, Christos Boutopoulos, Peristera Andreakou, Marina Ioannou, Ioanna Zergioti, Dimitris Goustouridisa, Dimitris Kafetzopoulos, Dimitris Tsoukalas, Pascal Normanda, Stavros Chatzandroulis, Biosensors and Bioelectronics 26 (2010) 1588–1592.
[35] http://www.ermicrosensor.com
[36] http://en.wikipedia.org
[37] *Winterthurerstr. 190 CH-8057 Zurich http://www.zora.uzh.ch/Electrochemical biosensors - sensor principles and architectures/Grieshaber , D; MacKenzie, R; Vörös, J; Reimhult, E.*
[38] http://investorshub.advfn.com
[39] *www.RSC.com*
[40] *http://www.biology.arizona.edu*
[41] *antigen: binding with antibody. Art. Encyclopædia Britannica Online. Web*
[42] *Angela Ivask, Marko Virta, Anne Kahru, Soil Biology & Biochemistry 34 (2002) 1439–1447*
[43] *L.H. Hansen, S.J. SÖrensen / FEMS Microbiology Letters 190 (2000) 273^278*
[44] *Brockstedt U., Uzarowska A., Montpetit A., Pfau W., Lauda D., Biochem. Biophys. Res. Commun., (2004), 313, 1004–1008*
[45] *Gu K.D., Famulok M., Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi, (2004), 38, 369–373*
[46] *Piganeau N, Jenne A, Thuillier V, Famulok M: Angew Chem Int Ed Engl (2000), 39, 4369-4373*
[47] *Lu Y., Liu J., Acc. Chem. Res. (2007), 40, 315–323.*
[48] *Santoro S. W. Joyce G. F. Sakthivel K. Gramatikova,S. Barbas C.F., III. J. Am. Chem. Soc. (2000), 122, 2433*
[49] *Cuenoud B.; Szostak J. W. Nature (1995), 375, 611-614*
[50] *Bruno J.G., Kiel J.L., Biosens. Bioelectron. (1999), 14, 457–464*
[51] *Bruno J.G., Kiel J.L., BioTechniques, (2002). 32, 178–183.*
[52] *Kirby, R., Cho, E.J., Gehrke, B., Bayer, T., Park, Y.S., Neikirk, D.P., McDevitt,J.T., Ellington A.D., Anal. Chem. (2004), 76, 4066–4075.*
[53] http://www.life.illinois.edu/govindjee/textzsch.htm.
[54] Ildikó Szabó, Elisabetta Bergantino & Giorgio Mario Giacometti, Light and oxygenic photosynthesis: energy dissipation as a protection mechanism against photo-oxidation ,*EMBO reports* (2005) 6, 629 - 634
[55] *E. L. S. Wong, E. Chow and J. J. Gooding, Langmuir, 2005, 21, 6957–6965.*
[56] Katherine J. Odenthal and J. Justin Gooding, An introduction to electrochemical DNA biosensors on http://pubs.rsc.org | doi:10.1039/B701816A.
[57] *C. Dutto, E. Fogarassy,, D. Mathiot, Applied Surface Science 184 (2001) 362–366*
[58] *Y. C. Jung, B. Bhushan / Scripta Materialia 57 (2007) 1057–1060*
[59] *M. Duocastella, J. M. Fernandez-Pradas, P. Serra, and J. L. Morenza, Appl. Phys. A: Mater. Sci. Process. 93, 453 _2008_.*