



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΗΛΕΚΤΡΟΛΟΓΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΩΝ, ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗΣ
ΚΑΙ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ

**Ανάπτυξη βιοαισθητήρα για τον εντοπισμό
αγελαδινού DNA και την ανίχνευση νοθείας στο
γάλα**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Δήμητρα Β. Καρκάνη

Επιβλέπων Καθηγητής:

Ευάγγελος Β. Χριστοφόρου

Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Αθήνα, Δεκέμβριος 2022



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΗΛΕΚΤΡΟΛΟΓΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΩΝ, ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗΣ
ΚΑΙ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ

**Ανάπτυξη βιοαισθητήρα για τον εντοπισμό αγελαδινού DNA και την
ανίχνευση νοθείας στο γάλα**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Δήμητρα Καρκάνη

Εγκρίθηκε από την τριμελή εξεταστική επιτροπή την .

.....
Ευάγγελος Χριστοφόρου
Καθηγητής Ε.Μ.Π.

.....
Κωνσταντίνος Πολιτόπουλος
Αναπληρωτής Καθηγητής
Ε.Μ.Π.

.....
Γεώργιος Ματσόπουλος
Καθηγητής Ε.Μ.Π.

.....
Δήμητρα Βασιλείου Καρκάνη

Διπλωματούχος Ηλεκτρολόγος Μηχανικός και Μηχανικός Υπολογιστών Ε.Μ.Π.

Copyright © Δήμητρα Καρκάνη, 2022.

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας εργασίας, εξ' ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης και να διατηρείται το παρόν μήνυμα. Ερωτήματα που αφορούν τη χρήση της εργασίας για κερδοσκοπικό σκοπό πρέπει να απευθύνονται προς τον συγγραφέα.

Οι απόψεις και τα συμπεράσματα που περιέχονται σε αυτό το έγγραφο εκφράζουν τον συγγραφέα και δεν πρέπει να ερμηνευθεί ότι αντιπροσωπεύουν τις επίσημες θέσεις του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

Περίληψη

Το γάλα είναι ένα προϊόν που καταναλώνεται ευρέως στην καθημερινότητα μεγάλου τμήματος του πληθυσμού του πλανήτη λόγω των θρεπτικών συστατικών του. Η νοθεία του γάλακτος, όπως και πολλών άλλων τροφίμων, αν και συχνά αγνοείται, είναι τόσο συνηθισμένη όσο και επικίνδυνη για την υγεία των καταναλωτών/-τριών.

Τα τελευταία χρόνια που το θέμα τυγχάνει μεγαλύτερης αναγνώρισης, δημιουργείται για αυτό τον σκοπό μια πληθώρα μεθόδων που ως σκοπό έχουν την αναγνώριση των διαφόρων ειδών νοθείας του γάλακτος. Για να αντιμετωπιστούν οι αδυναμίες των υπάρχουσών, περίπλοκων, χρονοβόρων και ακριβών εργαστηριακών μεθόδων, ιδιαίτερη έμφαση δίνεται στην ανάπτυξη βιοαισθητήρων, δηλαδή συσκευών που υπερτερούν σε ταχύτητα, χαμηλό κόστος και ευκολία χειρισμού.

Τα πλεονεκτήματα αυτά των βιοαισθητήρων συνδυάζονται με την ικανότητα του DNA για υβριδισμό, δηλαδή για επιλεκτική σύνδεση μεταξύ συμπληρωματικών αλληλουχιών ολιγονουκλεοτιδίων.

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας προτείνεται η δημιουργία ενός χωρητικού βιοαισθητήρα πυκνωτών ενδοδιαπλεκόμενων χρυσών ηλεκτροδίων για την ανίχνευση της νοθείας στο γάλα μέσω του εντοπισμού αγελαδινού DNA ως ουσία νοθείας σε γάλα διαφορετικών πηγών. Παρουσιάζεται αναλυτικά η διαδικασία κατασκευής του καθώς και τα αποτελέσματα των πειραμάτων αξιολόγησής του.

Λέξεις-κλειδιά: γάλα, νοθεία, βιοαισθητήρας, πυκνωτής ενδοδιαπλεκόμενων ηλεκτροδίων, DNA

Abstract

Milk is a product that is widely used in the daily life of a large part of the world's population because of its nutrients. Although adulteration of milk is often ignored, it is a phenomenon that is not only widespread but also dangerous for consumer's health.

In recent years, as awareness of the problem has increased, various methods have been developed in order to detect the different types of milk adulteration. To address the shortcomings of existing complex, time-consuming, and expensive laboratory methods, special emphasis is being placed on the development of biosensors, i.e., devices that are superior in terms of speed, low cost, and ease of use.

These advantages of biosensors are combined with the ability of DNA to hybridize, i.e., to selectively bind between complementary oligonucleotide sequences.

In this work, a capacitive biosensor of interdigitated gold electrode capacitors is proposed for the detection of milk adulteration through the identification of cow DNA as adulterant in milk from different sources. The process of its construction and the results of its evaluation experiments are presented.

Keywords: milk, adulteration, biosensor, interdigital gold electrode capacitor, DNA

Ευχαριστίες

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή κ. Ευάγγελο Χριστοφόρου για τη διαρκή υποστήριξη και ενθάρρυνση στην ενασχόλησή μου με ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά τον διδάκτορα Αντώνη Γεωργά και τον βιολόγο Angelo Ferraro για την πολύτιμη βοήθεια και συμβολή τους σε κάθε βήμα της υλοποίησης της συγκεκριμένης εργασίας. Χωρίς τις γνώσεις και τις πάντα άμεσες συμβουλές τους η συγκεκριμένη εργασία δεν θα είχε πραγματοποιηθεί.

Φυσικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την αναπληρώτρια καθηγήτρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής κα Δήμητρα Χουχούλα και τη Θεώνη Γεωργαράκη τόσο για την βοήθεια όσο και για την παροχή υλικών για την υλοποίηση της διπλωματικής.

Στην οικογένειά μου και ιδίως στους γονείς μου Κατερίνα , Βασίλη, Αλέκο και Κατερίνα και στα αδέρφια μου Ορέστη, Γιάννη και Μυρτώ καθώς και στη Βίκυ, την Τασία και τον Ιάσονα οφείλω περισσότερα από ένα ευχαριστώ για τη διαρκή υποστήριξη τόσο στη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας όσο και σε κάθε στάδιο της ζωής μου αλλά και την τόση αγάπη που μου δείχνουν.

Τέλος, ευχαριστώ πολύ τις φίλες και τους φίλους μου και ιδίως τον Άγγελο, την Αθηνά, τον Ανδρέα, τη Δημήτρια, την Ευγενία, την Ευδοκία, τον Ηλία, τον Ιωσήφ, την Νικολέττα, τον Νίκο, την Πέμη, τον Σπύρο, τη Σταυρούλα και τη Στελίνα για όλα όσα έχουμε ζήσει και θα ζήσουμε.

Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη.....	iv
Abstract.....	vi
Πρόλογος – Ευχαριστίες.....	ix
Πίνακας περιεχομένων.....	xi
Ευρετήριο Σχημάτων.....	xiv
Ευρετήριο Πινάκων.....	xxi
A. Θεωρητικό Μέρος.....	1
1. Εισαγωγή.....	1
1.1. Το πρόβλημα της νοθείας γάλακτος	1
1.2. Συνηθισμένες ουσίες ως νοθεία γάλακτος	2
1.3. Επισκόπηση μεθόδων ανίχνευσης νοθείας.....	3
2. Βιοαισθητήρες Ανίχνευσης DNA	5
2.1 Η Έννοια του Βιοαισθητήρα.....	5
2.2 Παραδείγματα Βιοαισθητήρων που Ανιχνεύουν DNA.....	6
2.2.1. Ηλεκτροχημικοί Βιοαισθητήρες Ανίχνευσης DNA.....	7
2.2.2 Οπτικοί Βιοαισθητήρες Ανίχνευσης DNA	9
2.2.3 Μηχανικός Βιοαισθητήρας Ανίχνευσης DNA.....	14
3.Βιοαισθητήρας Ενδοδιαπλεκόμενων Ηλεκτροδίων (Interdigital Electrodes Biosensor- IDE Biosensor)	18
3.1 Περιγραφή δομής.....	18
3.1.1 Βιοαισθητήρες Σύνθετης Αντίστασης	21
3.1.2 Βιοαισθητήρες Χωρητικότητας	23
3.2 Χρήση Βιοαισθητήρα Interdigital Ηλεκτροδίων για την Ανίχνευση DNA.....	26
B. Πειραματικό Μέρος.....	30
4.Υλικά και Μέθοδος	30
4.1. Δομή Βιοαισθητήρα.....	30

4.2 Προετοιμασία Δειγμάτων	31
4.3 Ανάπτυξη Βιοαισθητήρα και Μετρήσεις	31
4.3.1 Ανασύσταση των εκκινητών.....	32
4.3.2 Προετοιμασία Πυκνωτών.....	35
4.3.3 Διαδικασία Ανίχνευσης αγελαδινού DNA.....	39
4.3.4 Αρνητικός Έλεγχος.....	41
4.3.4.1 Αρνητικός Έλεγχος με Καθαρό Νερό	42
4.3.4.2 Αρνητικός Έλεγχος με μη συμπληρωματικό DNA	42
4.3.5 Προσδιορισμός Ορίου Ανίχνευσης	43
4.3.6 Μελέτη για τη Διάρκεια Ζωής του Αισθητήρα	43
4.3.7 Μελέτη για την Δυνατότητα Επαναχρησιμοποίησης του Αισθητήρα ...	44
5. Αποτελέσματα και Συζήτηση	47
6. Επίλογος	74
6.1. Σύνοψη και Συμπεράσματα	74
6.2 Προτάσεις για μελλοντικές έρευνες	75
Γ. Βιβλιογραφία	77

Ευρετήριο Σχημάτων

Σχήμα 1 Άρθρο της εφημερίδας <i>the Guardian</i> (2008)[Reuters].....	2
Σχήμα 2 QCM-based βιοαισθητήρας [5].....	4
Σχήμα 3 Σχηματική Αναπαράσταση των Βασικών Τμημάτων ενός Βιοαισθητήρα και Διάκριση ανάλογα με τον Αναλύτη και τον τύπο του Μεταλλάκτη[3].....	6
Σχήμα 4 Σχηματική Αναπαράσταση Βιοαισθητήρων που βασίζονται στον Υβριδισμό του DNA[10]	7
Σχήμα 5 Από εφαρμογή ανίχνευσης DNA που συνδέεται με ασθένεια φυτών[12]	8
Σχήμα 6 Καμπύλη ρεύματος (α)απουσία και (β) παρουσία του DNA στόχου[13].	8
Σχήμα 7 (α)εξωτερική και (β) εσωτερική τροποποίηση της οπτικής ίνας[14].....	10
Σχήμα 8 Σχηματική Αναπαράσταση της Εναπόθεσης ανιχνευτών πάνω στην οπτική ίνα και του Υβριδισμού με συμπληρωματικό DNA[14]	11
Σχήμα 9 Μετατόπιση της κορυφής συντονισμού πριν(μαύρο) και μετά(κόκκινο) τον υβριδισμό[15].....	12
Σχήμα 10 Η αλλαγή στο μήκος κύματος του φωτός από ανάκλαση από την οπτική ίνα πριν την προσθήκη DNA(i),μετά την προσθήκη DNA(ii), μετά τη διήθηση νανοσωματιδίων χρυσού(iii)[14]	12
Σχήμα 11 : Από αριστερά προς τα δεξιά: N: αρνητικός έλεγχος με νερό, C: θετικός έλεγχος με 100% αγελαδινό DNA, 20%-50%: κατσικίσιο γάλα νοθευμένο με 20% και 50% αντίστοιχα αγελαδινό γάλα, G:αρνητικός έλεγχος με 100% κατσικίσιο γάλα[16]	13
Σχήμα 12 Αρχή λειτουργίας QCM βιοαισθητήρα[17].....	14
Σχήμα 13 Αλλαγή συχνότητας συναρτήσει της θερμοκρασίας (A) και συναρτήσει του χρόνου(B)[17].....	16
Σχήμα 14 Σύγκριση QCM biosensor με real-time PCR[17].....	16
Σχήμα 15 Μετάβαση από πυκνωτή παράλληλων πλακών σε Interdigital Πυκνωτή[20]	18

Σχήμα 16 Βοήθημα για τον θεωρητικό υπολογισμό της χωρητικότητας <i>interdigital</i> πυκνωτή όπου K_m σταθερά ελατηρίου που αντιπροσωπεύει την ακαμψία του μηχανισμού των δυο χτενίων, C και C_f οι προαναφερθείσες χωρητικότητες.....	20
Σχήμα 17 Σχηματική αναπαράσταση και ισοδύναμο κύκλωμα διάταξης απουσία κυττάρων (a) και παρουσία κυττάρων (b)[18]	22
Σχήμα 18 Αναπαράσταση Σύνθετης Αντίστασης απουσία(αριστερά) και παρουσία(δεξιά) των κυττάρων[18].....	23
Σχήμα 19 Χωρητικός βιοαισθητήρας συγγένειας ενδοδιαπλεκόμενων ηλεκτροδίων[18].....	24
Σχήμα 20 (a) Συστοιχία ID πυκνωτών σε τσιπ, (b) Ενδεικτικός ID πυκνωτής, (c) Η εναπόθεση του αντισώματος επάνω στην επιφάνεια του ID πυκνωτή, (d) το συμπλεγμα αντισώματος-αντιγόνου που δημιουργεί το κατανεμημένο φορτίο, (e) Ισοδύναμο κύκλωμα του ID αισθητήρα[18].....	25
Σχήμα 21 (A) Σχηματική Αναπαράσταση του IDE Βιοαισθητήρα, (B) Ισοδύναμο Κύκλωμα πριν τη χρήση, (C) Ισοδύναμο κύκλωμα με προσκόλληση των ανιχνευτών DNA, (D) Ισοδύναμο κύκλωμα με προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος, (E) Ισοδύναμο κύκλωμα μετά τον Υβριδισμό με το DNA στόχο [23].....	27
Σχήμα 22 Μέτρηση της χωρητικότητας πριν(λευκό) και μετά(κόκκινο) τον υβριδισμό με μη συμπληρωματική(αριστερά) και συμπληρωματική (δεξιά) ακολουθία DNA με τον Χωρητικό Βιοαισθητήρα (A) και με Οπτική Μέθοδο(B)[23] .	28
Σχήμα 23 Πυκνωτής ενδοδιαπλεκόμενων χρυσών ηλεκτροδίων.....	30
Σχήμα 24 Πρωτότυπο κύκλωμα ανάγνωσης	31
Σχήμα 25 Οδηγίες που αφορούν τους εκκινητές	32
Σχήμα 26 Τα δοχεία με τους εκκινητές σε μορφή αποξηραμένων σφαιριδίων ..	33
Σχήμα 27 Πιπέττες και άκρες πιπεττών.....	33
Σχήμα 28 Χωρισμός των εκκινητών σε δοχεία των 60μl	34
Σχήμα 29 Vortex Vibrator.....	34
Σχήμα 30 Centrifuge Spinning Machine	35
Σχήμα 31 Ακινητοποίηση εκκινητών πάνω στην επιφάνεια χρυσού[21].....	36
Σχήμα 32 PBS με pH 7.2	36
Σχήμα 33 <i>Interdigital</i> Πυκνωτής χρυσών ηλεκτροδίων με 30μl COWREV εκκινητή	37

Σχήμα 34 Μετρήσεις χωρητικότητας με την πάροδο 1,2 και 3 ωρών από την εναπόθεση 30 μl COWREV εκκινητή στην επιφάνεια του πυκνωτή	37
Σχήμα 35 Τρυβλίο με τους πυκνωτές βυθισμένους στο διάλυμα PBS-εκκινητή .	38
Σχήμα 36 Διαδικασία στεγνώματος πυκνωτών.....	39
Σχήμα 37 Τρυβλία με τους πυκνωτές τοποθετημένους ανάποδα ώστε να είναι σε επαφή με τους εκκινητές.....	39
Σχήμα 38 Spectrophotometer	40
Σχήμα 39 Παραμετροποίηση PuTTY για ανάγνωση και καταγραφή δεδομένων που προέρχονται από σειριακή επικοινωνία με το κύκλωμα ανάγνωσης που συνδέεται στην θύρα COM3 του φορητού ηλεκτρονικού υπολογιστή	41
Σχήμα 40 Τιμή μέσης χωρητικότητας πριν και μετά την ακινητοποίηση των εκκινητών.....	48
Σχήμα 41 Τιμή μέσης κανονικοποιημένης χωρητικότητας πριν και μετά την ακινητοποίηση των εκκινητών.....	48
Σχήμα 42 (α) Μεταβολή Χωρητικότητας,(b) Κανονικοποιημένη Μεταβολή Χωρητικότητας πυκνωτών με ακινητοποιημένο COWFORW εκκινητή με προσθήκη διαλύματος με συγκέντρωση 1.333ng/μl COW DNA	50
Σχήμα 43 (α) Μεταβολή Χωρητικότητας,(b) Κανονικοποιημένη Μεταβολή Χωρητικότητας πυκνωτών με ακινητοποιημένο COWREV εκκινητή με προσθήκη διαλύματος με συγκέντρωση 1.333ng/μl COW DNA	51
Σχήμα 44 (α) Μεταβολή Χωρητικότητας,(b) Κανονικοποιημένη Μεταβολή Χωρητικότητας πυκνωτών με ακινητοποιημένο COWREV-COWFORW εκκινητή με προσθήκη διαλύματος με συγκέντρωση 1.333ng/μl COW DNA.....	52
Σχήμα 45 Συγκεντρωτικό διάγραμμα Κανονικοποιημένης Μεταβολής Χωρητικότητας πυκνωτών με ακινητοποιημένο α)COWFORW(μπλε),β) COWREV-COWFORW(κόκκινο) και γ) COWREV(πράσινο) εκκινητή με προσθήκη διαλύματος με συγκέντρωση 1.333ng/μl COW DNA	52
Σχήμα 46 Κανονικοποιημένη Μεταβολή Χωρητικότητας πυκνωτών με ακινητοποιημένο COWFORW εκκινητή με προσθήκη 30μl α)καθαρού νερού(μπλε), β)πρώτου διαλύματος GOAT DNA συγκέντρωσης 1ng/μl(κόκκινο) και γ)δεύτερου διαλύματος GOAT DNA συγκέντρωσης 1ng/μl(πράσινο)	53

Σχήμα 47 Κανονικοποιημένη Μεταβολή Χωρητικότητας πυκνωτών με ακινητοποιημένο COWREV εκκινητή με προσθήκη 30μl α)καθαρού νερού(μπλε), β)πρώτου διαλύματος GOAT DNA συγκέντρωσης 1ng/μl(κόκκινο) και γ)δεύτερου διαλύματος GOAT DNA συγκέντρωσης 1ng/μl(πράσινο)	53
Σχήμα 48 Κανονικοποιημένη Μεταβολή Χωρητικότητας πυκνωτών με ακινητοποιημένο COWREV-COWFORW εκκινητή με προσθήκη 30μl α)καθαρού νερού(μπλε), β)πρώτου διαλύματος GOAT DNA συγκέντρωσης 1ng/μl(κόκκινο) και γ)δεύτερου διαλύματος GOAT DNA συγκέντρωσης 1ng/μl(πράσινο).....	54
Σχήμα 49 ((a),(c),(e)) Μεταβολή Χωρητικότητας,((b),(d),(f)) Κανονικοποιημένη Μεταβολή Χωρητικότητας πυκνωτών με ακινητοποιημένο ((a),(b)) COWFORW, ((c),(d)) COWREV, ((e),(f)) COWFORW-COWREV εκκινητή με προσθήκη διαλύματος με συγκέντρωση 0.667ng/μl COW DNA	55
Σχήμα 50 Συγκεντρωτικό Διάγραμμα Κανονικοποιημένης Μεταβολής Χωρητικότητας πυκνωτών με ακινητοποιημένο α)COWFORW(μπλε),β) COWREV-COWFORW(κόκκινο) και γ) COWREV(πράσινο) εκκινητή με προσθήκη διαλύματος με συγκέντρωση 0.667ng/μl COW DNA	55
Σχήμα 51 ((a),(c),(e)) Μεταβολή Χωρητικότητας, ((b),(d),(f)) Κανονικοποιημένη Μεταβολή Χωρητικότητας πυκνωτών με ακινητοποιημένο ((a),(b)) COWFORW, ((c),(d)) COWREV, ((e),(f)) COWFORW-COWREV εκκινητή με προσθήκη διαλύματος με συγκέντρωση 0.333ng/μl COW DNA	57
Σχήμα 52 Συγκεντρωτικό Διάγραμμα Κανονικοποιημένης Μεταβολής Χωρητικότητας πυκνωτών με ακινητοποιημένο α)COWFORW(μπλε),β) COWREV-COWFORW(κόκκινο) και γ) COWREV(πράσινο) εκκινητή με προσθήκη διαλύματος με συγκέντρωση 0.333ng/μl COW DNA	57
Σχήμα 53 ((a),(c),(e)) Μεταβολή Χωρητικότητας, ((b),(d),(f)) Κανονικοποιημένη Μεταβολή Χωρητικότητας πυκνωτών με ακινητοποιημένο ((a),(b)) COWFORW, ((c),(d)) COWREV, ((e),(f)) COWFORW-COWREV εκκινητή με προσθήκη διαλύματος με συγκέντρωση 0.167ng/μl COW DNA	58
Σχήμα 54 Συγκεντρωτικό Διάγραμμα Κανονικοποιημένης Μεταβολής Χωρητικότητας πυκνωτών με ακινητοποιημένο α)COWFORW(μπλε),β) COWREV-COWFORW(κόκκινο) και γ) COWREV(πράσινο) εκκινητή με προσθήκη διαλύματος με συγκέντρωση 0.167ng/μl COW DNA	59

Σχήμα 55 ((a),(c),(e)) Μεταβολή Χωρητικότητας, ((b),(d),(f)) Κανονικοποιημένη Μεταβολή Χωρητικότητας πυκνωτών με ακινητοποιημένο ((a),(b)) COWFORW, ((c),(d)) COWREV, ((e),(f)) COWFORW-COWREV εκκινητή με προσθήκη διαλύματος με συγκέντρωση 0.083ng/μl COW DNA	60
Σχήμα 56 Συγκεντρωτικό Διάγραμμα Κανονικοποιημένης Μεταβολής Χωρητικότητας πυκνωτών με ακινητοποιημένο α)COWFORW(μπλε),β) COWREV-COWFORW(κόκκινο) και γ) COWREV(πράσινο) εκκινητή με προσθήκη διαλύματος με συγκέντρωση 0.083ng/μl COW DNA	60
Σχήμα 57 Συγκεντρωτικό διάγραμμα κανονικοποιημένης μέσης μεταβολής χωρητικότητας πυκνωτών με COWFORW εκκινητή	61
Σχήμα 58 Συγκεντρωτικό διάγραμμα κανονικοποιημένης μέσης μεταβολής χωρητικότητας πυκνωτών με COWREV εκκινητή	62
Σχήμα 59 Συγκεντρωτικό διάγραμμα κανονικοποιημένης μέσης μεταβολής χωρητικότητας πυκνωτών με COWFORW-COWREV εκκινητή	62
Σχήμα 60 Καμπύλη Βαθμονόμησης πυκνωτών με COWFORW εκκινητή.....	64
Σχήμα 61 Καμπύλη Βαθμονόμησης πυκνωτών με COWFORW-COWREV εκκινητή	64
Σχήμα 62 Καμπύλη Βαθμονόμησης πυκνωτών με COWREV εκκινητή.....	65
Σχήμα 63 ((a),(c),(e)) Μεταβολή Χωρητικότητας, ((b),(d),(f)) Κανονικοποιημένη Μεταβολή Χωρητικότητας πυκνωτών με ακινητοποιημένο ((a),(b)) COWREV, ((c),(d)) COWFORW-COWREV, ((e),(f)) COWFORW εκκινητή με προσθήκη διαλύματος με συγκέντρωση 1.333ng COWDNA.....	66
Σχήμα 64 Κανονικοποιημένη Μεταβολή Χωρητικότητας πυκνωτή που χρησιμοποιείται πρώτη(κόκκινο) ή δεύτερη(μωβ) φορά με COWFORW εκκινητή με προσθήκη διαλύματος 1.333ng/μl COWDNA.....	67
Σχήμα 65 Κανονικοποιημένη Μεταβολή Χωρητικότητας πυκνωτή που χρησιμοποιείται πρώτη(κόκκινο) ή δεύτερη(μωβ) φορά με COWREV εκκινητή με προσθήκη διαλύματος 1.333ng/μl COWDNA.....	67
Σχήμα 66 Κανονικοποιημένη Μεταβολή Χωρητικότητας πυκνωτή που χρησιμοποιείται πρώτη(κόκκινο) ή δεύτερη(μωβ) φορά με COWREV-COWFORW εκκινητή με προσθήκη διαλύματος 1.333ng/μl COWDNA.....	68

Σχήμα 67 (a) Μεταβολή Χωρητικότητας,(b) Κανονικοποιημένη Μεταβολή Χωρητικότητας πυκνωτών με ακινητοποιημένο COWFORW-COWREV εκκινητή με προσθήκη διαλύματος συγκέντρωσης 1.333ng/μl COWDNA μετά από αποθήκευση 5 ημερών.....69

Σχήμα 68 (a) Μεταβολή Χωρητικότητας,(b) Κανονικοποιημένη Μεταβολή Χωρητικότητας πυκνωτών με ακινητοποιημένο COWREV εκκινητή με προσθήκη διαλύματος συγκέντρωσης 0.667ng/μl COWDNA μετά από αποθήκευση 5 ημερών 69

Σχήμα 69 (a) Μεταβολή Χωρητικότητας,(b) Κανονικοποιημένη Μεταβολή Χωρητικότητας πυκνωτών με ακινητοποιημένο COWFORW εκκινητή με προσθήκη διαλύματος συγκέντρωσης 0.333ng/μl COWDNA μετά από αποθήκευση 5 ημερών 70

Σχήμα 70 Κανονικοποιημένη Μεταβολή Χωρητικότητας πυκνωτή με COWREV-COWFORW εκκινητή με προσθήκη διαλύματος 1.333ng/μl COWDNA μετά από 1 ημέρα (κόκκινο) και μετά από 5 ημέρες(πράσινο) αποθήκευσης 70

Σχήμα 71 Κανονικοποιημένη Μεταβολή Χωρητικότητας πυκνωτή με COWREV εκκινητή με προσθήκη διαλύματος 0.667ng/μl COWDNA μετά από 1 ημέρα (κόκκινο) και μετά από 5 ημέρες(πράσινο) αποθήκευσης 71

Σχήμα 72 Κανονικοποιημένη Μεταβολή Χωρητικότητας πυκνωτή με COWFORW εκκινητή με προσθήκη διαλύματος 0.333ng/μl COWDNA μετά από 1 ημέρα (κόκκινο) και μετά από 5 ημέρες(πράσινο) αποθήκευσης 71

Ευρετήριο Πινάκων

<u>Πίνακας 1: Συγκεντρωτικός πίνακας Μεταβολής Χωρητικότητας μετά την ακινητοποίηση των εκκινήτων</u>	47
<u>Πίνακας 2 Μέγιστη Μέση Μεταβολή Χωρητικότητας Πυκνωτών με COWFORW εκκινήτες</u>	63
<u>Πίνακας 3 Μέγιστη Μέση Μεταβολή Χωρητικότητας Πυκνωτών με COWFORW-COWREV εκκινήτες</u>	64
<u>Πίνακας 4 Μέγιστη Μέση Μεταβολή Χωρητικότητας Πυκνωτών με COWREV εκκινήτες</u>	65

A. Θεωρητικό Μέρος

1. Εισαγωγή

1.1. Το πρόβλημα της νοθείας γάλακτος

Η νόθευση τροφίμων είναι ένα συνολικό πρόβλημα που διεγείρει την παγκόσμια ανησυχία ιδίως τα τελευταία χρόνια. Παρότι πρόκειται για ένα συνηθισμένο και ιδιαίτερης σημασίας πρόβλημα, υπάρχει έλλειψη παρακολούθησης, οργανωμένων πρακτικών και πρωτοκόλλων για την αποφυγή αυτού. [1]

Πιο συγκεκριμένα όσον αφορά τη νοθεία του γάλακτος είναι ταυτόχρονα πολύ συνηθισμένη αλλά και πολύ επικίνδυνη καθώς πέρα από την ανήθικη σκοπιά του φαινομένου, μπορεί να οδηγήσει σε αλλεργίες μέχρι και σε σοβαρούς κινδύνους για την υγεία ακόμα και θανατηφόρες ασθένειες.[2] Αν και η νοθεία του γάλακτος είναι ένα πολύ παλιό φαινόμενο καθώς αναφέρονται σχετικά σκάνδαλα από το 1850 που οδήγησαν σε 8000 θανάτους βρεφών στη Νέα Υόρκη, ιδιαίτερη έμφαση στο πρόβλημα δόθηκε ιδιαίτερα μετά την αποκάλυψη της προσθήκης μελαμίνης σε βρεφικά γάλατα στην Κίνα το 2008(βλ. Σχήμα 1).[3] Η μελαμίνη είναι μια φθηνή χημική ουσία που χρησιμοποιείται σε πλήθος άλλων εφαρμογών και η οποία αυξάνει την περιεκτικότητα σε άζωτο στο γάλα.[4] Η έλλειψη καλά σχεδιασμένων μεθόδων για τον έλεγχο του γάλακτος είχε ως αποτέλεσμα το άζωτο που ανιχνευόταν στους εργαστηριακούς ελέγχους να θεωρείται πρωτεϊνούχο άζωτο, στοιχείο καθαρά παραπλανητικό καθώς αυτό αποτελούσε καθαρή νοθεία η οποία οδήγησε σε αυξημένα κρούσματα ασθενειών σε παιδιά καθώς και θανάτους από νεφρική ανεπάρκεια. [3]

Οι λόγοι για τους οποίους παρατηρείται σε μεγάλη ένταση αυτό το φαινόμενο είναι αδιαμφισβήτητα σε μεγάλο βαθμό τα οικονομικά κίνητρα. Πολλές από τις ουσίες που χρησιμοποιούνται ως νοθεία του γάλακτος είναι πιο φθηνές από το ίδιο το γάλα. Ταυτόχρονα παρατηρείται διαφορά ανάμεσα στην προσφορά και στη ζήτηση γάλακτος καθώς η δεύτερη είναι ιδιαίτερα αυξημένη και η νοθεία βοηθά στο να καλυφθεί το κενό της αγοράς. [3] Φυσικά όλοι οι παραπάνω λόγοι δεν θα ήταν

αρκετοί αν δεν υπήρχε έλλειψη αυστηρών πρωτοκόλλων και κατάλληλων ανιχνευτικών τεστ ώστε να γίνεται έλεγχος του γάλακτος.

Three die in tainted baby milk scandal in China

· Thousands ill after banned chemical found in formula
· Authorities not alerted for more than a month



Two Chinese babies suffering from kidney stones after drinking contaminated formula.
Photograph: Reuters

Σχήμα 1 Άρθρο της εφημερίδας the Guardian(2008)[Reuters]

1.2. Συνηθισμένες ουσίες ως νοθεία γάλακτος

Για τη νοθεία του γάλακτος υπάρχουν ορισμένες ουσίες που χρησιμοποιούνται ευρέως.

Το νερό είναι μία από αυτές καθώς χρησιμοποιείται για να διαλυθεί μέσα σε αυτό το γάλα και να αυξηθεί ο συνολικός όγκος, ταυτόχρονα όμως μειώνεται και η διατροφική αξία.[2]

Οι πρωτεΐνες από φυτικές πηγές όπως η σόγια , το ρύζι και το αμύγδαλο χρησιμοποιούνται επίσης ως νοθεία του γάλακτος. Αυτές χρησιμοποιούνται κυρίως σε γάλατα για καταναλωτές με δυσανεξία στη λακτόζη αλλά όχι μόνο καθώς το κόστος παραγωγής γάλακτος σόγιας είναι 70% χαμηλότερο σε σχέση με το αγελαδινό και αντίστοιχη διαφορά υπάρχει και στην τιμή των αντίστοιχων πρωτεϊνών. Παρόλα αυτά είναι σημαντικό το ότι αυτές οι ουσίες χαρακτηρίζονται ως αλλεργιογόνες και φυσικά όταν βρίσκονται στο γάλα ως νοθεία είναι επικίνδυνες για τον καταναλωτή ή την καταναλώτρια που δεν το γνωρίζει.[2]

Γάλατα που έχουν ιδίως ακριβότερο κόστος παραγωγής όπως το κατσικίσιο νοθεύονται συχνά με φθηνότερα γάλατα όπως το αγελαδινό. Κάτι τέτοιο μπορεί να οδηγήσει σε αλλεργίες, είναι ανήθικο και συγχρόνως πιο δύσκολα ανιχνεύσιμο. [5]

Τέλος, υπάρχουν νοθευτές που σκοπεύουν στην αύξηση των ποιοτικών παραμέτρων του γάλακτος και συνήθως είναι και οι πιο επικίνδυνοι για την υγεία όπως για παράδειγμα τα θειικά άλατα που αυξάνουν τον παράγοντα SNF(Solid-Not-Fat), η ουρία που υπάρχει ήδη στο γάλα αλλά προστίθεται εξωγενώς [6] ή η μελαμίνη που αναφέρθηκε παραπάνω και αυξάνουν την ένδειξη για πρωτεϊνούχο άζωτο. Τέτοιοι νοθευτές προκαλούν πιο συχνά σοβαρές και μακροπρόθεσμες συνέπειες στην υγεία. [2]

1.3. Επισκόπηση μεθόδων ανίχνευσης νοθείας

Ένας πρώτος διαχωρισμός των μεθόδων ανίχνευσης της νοθείας στο γάλα θα μπορούσε να γίνει σε ποιοτικές και ποσοτικές.

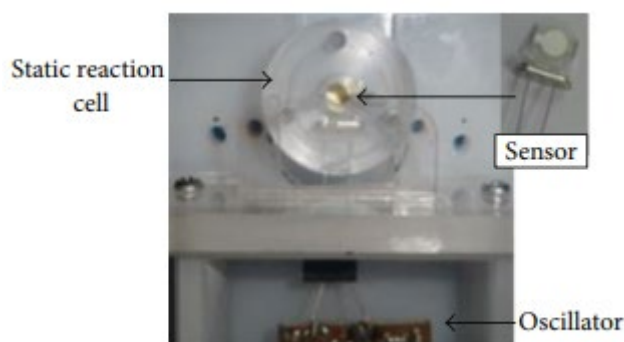
Ως ποιοτικές μέθοδοι συνήθως χρησιμοποιούνται αντιδράσεις που βασίζονται σε παρατήρηση χρωματικής αλλαγής και πιο σπάνια αλλαγές στο pH, τις θερμικές ιδιότητες κ.α.. Στα θετικά αυτών των μεθόδων συγκαταλέγεται το ότι είναι συνήθως γρήγορες, απλές και εύκολες να πραγματοποιηθούν καθώς δεν απαιτούν ούτε ιδιαίτερες προϋποθέσεις βιοασφάλειας ούτε έχουν σύνθετη εκτέλεση. Ωστόσο συχνά δίνουν αποτελέσματα για συγκεκριμένο και περιορισμένο εύρος συγκέντρωσης της ουσίας που αποτελεί τη νοθεία και δεν είναι αρκετά ακριβή. [2]

Στις ποσοτικές μεθόδους ανήκουν πολλά είδη τεστ, εκ των οποίων κάποια περιλαμβάνουν απαιτητικές εργαστηριακές διαδικασίες και κάποια είναι πιο γρήγορα και απλά.

Για την ανίχνευση ξένων πρωτεϊνών ιδιαίτερη σημασία έχουν οι ανοσολογικές διαδικασίες όπως η τεχνική ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) η οποία έχει μεγάλη ακρίβεια αλλά είναι πολύ απαιτητική ως προς την προετοιμασία των δειγμάτων και έχει αρκετούς παράγοντες σφάλματος.[3] Επίσης ιδιαίτερα χρήσιμη

είναι η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης HPLC(High-Performance Liquid Chromatography) η οποία αν και χρησιμοποιείται ευρέως μειονεκτεί ως προς το υψηλό κόστος των οργάνων που απαιτεί και την δύσκολη προετοιμασία των δειγμάτων.[2]

Στα πιο γρήγορα ποσοτικά τεστ ανήκουν οι φασματοσκοπικές τεχνικές οι οποίες υστερούν στη δυσκολία ανάλυσης των φασματικών δεδομένων αλλά και οι βιοαισθητήρες. [3] Ενδεικτικά αναφέρεται ο βιοαισθητήρας του σχήματος 2 που βασίζεται σε QCM (Quartz Crystal Microbalance) και χρησιμοποιείται για την ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο με την ανίχνευση χαρακτηριστικής πρωτεΐνης που υπάρχει στο αγελαδινό και όχι στο κατσικίσιο γάλα. [5]



Σχήμα 2 QCM-based βιοαισθητήρας [5]

2. Βιοαισθητήρες Ανίχνευσης DNA

2.1 Η Έννοια του Βιοαισθητήρα

Οι Βιοαισθητήρες είναι μια υποκατηγορία των αισθητήρων. Πρόκειται για αναλυτικά μικροσυστήματα που περιλαμβάνουν ένα βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης (biological recognition element/ sensing element) το οποίο συσχετίζεται με έναν μεταλλάκτη για την αναγνώριση κάποιου αναλύτη στόχου. Ουσιαστικά ο μεταλλάκτης μετατρέπει μία βιολογική ή βιοχημική αναγνώριση του αναλύτη σε ηλεκτρικό σήμα προς ανίχνευση από κατάλληλη συσκευή ανάγνωσης σήματος. [7]

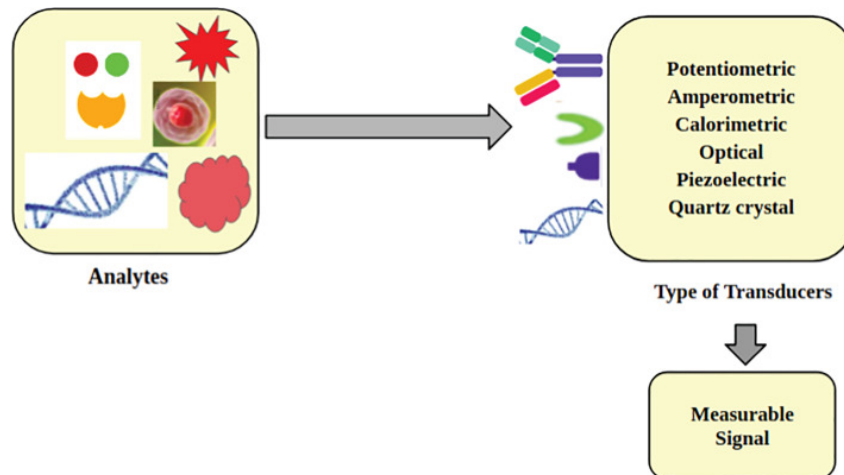
Ως βιοστοιχείο αναγνώρισης συνήθως χρησιμοποιείται ένα ένζυμο (ενζυμικοί βιοαισθητήρες) ή βιολογικοί υποδοχείς όπως αντισώματα, κύτταρα, ιστοί, νουκλεοτίδια (βιοαισθητήρες συγγένειας). Αυτό βρίσκεται συνήθως ακινητοποιημένο πάνω στον αισθητήρα προκειμένου να κρατιέται σε επαφή με τον μεταλλάκτη. Το παραγόμενο ηλεκτρικό σήμα είναι αποτέλεσμα βιοαναγνώρισης, δηλαδή επιλεκτικής αλληλεπίδρασης με την ουσία στόχο.[8], [9]

Ένας ιδανικός βιοαισθητήρας έχει συγκεκριμένες ιδιότητες, οι οποίες εξετάζονται και κατά την δημιουργία κάθε καινούριου βιοαισθητήρα και αποτελούν κριτήρια για την ποιότητά του. Κάποιες από τις σημαντικότερες αυτές ιδιότητες είναι η υψηλή ευαισθησία, δηλαδή η ανίχνευση της ουσίας στόχου σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις, η μεγάλη επιλεκτικότητα, δηλαδή η παραγωγή μετρήσιμου ηλεκτρικού σήματος μόνο στην περίπτωση ανίχνευσης της ουσίας στόχου, η μεγάλη ακρίβεια, η ταχεία απόκριση, το χαμηλό κόστος, η ευκολία κατασκευής κ.α.[8]

Η χρήση τους είναι ιδιαίτερα εκτεταμένη σε τομείς όπως η κλινική διάγνωση, ο ποιοτικός έλεγχος και η φαρμακευτική ανάλυση, η παραγωγή και ο ποιοτικός έλεγχος τροφίμων, ο έλεγχος βιομηχανικών αποβλήτων κ.α.

Για τον διαχωρισμό των βιοαισθητήρων σε κατηγορίες υπάρχουν διάφορα κριτήρια(βλ. Σχήμα 3):

- Ανάλογα με τον παράγοντα βιο-αναγνώρισης διακρίνονται σε ενζυμικούς οι οποίοι φέρουν ένα ένζυμο ακινητοποιημένο σε κάποιο φορέα, ανοσοχημικούς οι οποίοι χρησιμοποιούν ως βιοστοιχείο αναγνώρισης κάποιο αντίσωμα ή αντιγόνο και σε κυττάρων, ιστών και μικροοργανισμών.
- Ανάλογα με τον τύπο του μεταλλάκτη διακρίνονται σε ηλεκτροχημικούς, μηχανικούς και οπτικούς.[3]

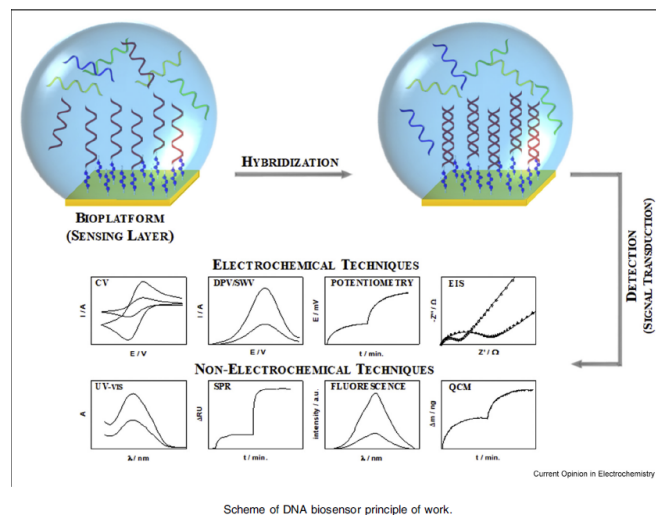


Σχήμα 3 Σχηματική Αναπαράσταση των Βασικών Τμημάτων ενός Βιοαισθητήρα και Διάκριση ανάλογα με τον Αναλύτη και τον τύπο του Μεταλλάκτη[3]

2.2 Παραδείγματα Βιοαισθητήρων που Ανιχνεύουν DNA

Το DNA είναι αρκετά σταθερό σε σχέση με τις πρωτεΐνες ως ουσία στόχος ενώ η ικανότητα υβριδισμού του είναι πολλά υποσχόμενη στην υλοποίηση φθηνής και γρήγορης ανίχνευσης συγκεκριμένων τμημάτων DNA.[7] Έτσι λοιπόν, ενώ η επανάσταση στην ανίχνευση του DNA ήρθε με την ανάπτυξη των PCR (Polymerase Chain Reaction) test, η ανάπτυξη καινοτόμων, μικρών, φθηνών και γρήγορων αναλυτικών συσκευών με εύκολο χειρισμό θεωρείται εξίσου σημαντική.[10]

Στην παρούσα εργασία ο βιοαισθητήρας που μελετάται έχει ως ουσία- στόχο τμήμα του αγελαδινού DNA. Γι' αυτό το λόγο θα παρουσιαστούν συνοπτικά τύποι αισθητήρων που ανιχνεύουν DNA από κάθε κατηγορία που αναφέρθηκε όσον αφορά στον διαχωρισμό τους με βάση τον τύπο του μεταλλάκτη(βλ. Σχήμα 4).

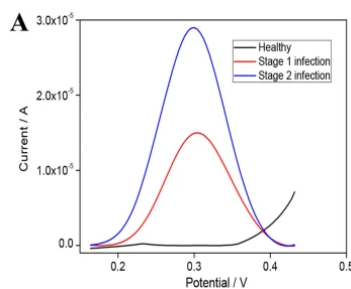


Σχήμα 4 Σχηματική Αναπαράσταση Βιοαισθητήρων που βασίζονται στον Υβριδισμό του DNA[10]

2.2.1. Ηλεκτροχημικοί Βιοαισθητήρες Ανίχνευσης DNA

Οι ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες βασίζονται στην παρατήρηση αλλαγών σε ρεύμα, δυναμικό, αγωγιμότητα ή ηλεκτρομαγνητικό πεδίο λόγω της αλληλεπίδρασης του μορίου στόχου με τα βιομόρια αναγνώρισης στην επιφάνεια ανίχνευσης. Στα θετικά τους συγκαταλέγονται η σταθερότητα, η επιλεκτικότητα και η ευαισθησία τους γι' αυτό και χρησιμοποιούνται σε πληθώρα εφαρμογών. [11]

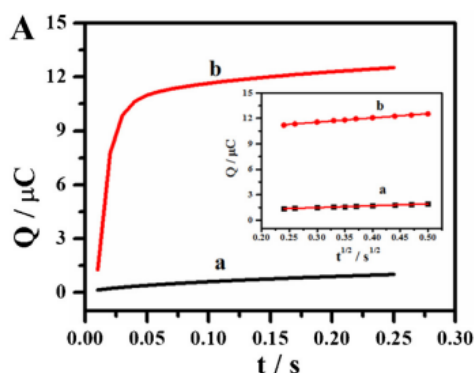
Πρώτο παράδειγμα τέτοιου βιοαισθητήρα είναι με χρήση κολλοειδών χρυσών νανοσωματιδίων ως ανιχνευτών.[12] Η αναγνώριση του DNA γίνεται με διαφορική παλμική βολταμμετρία (Differential Pulse Voltammetry- DPV). Πιο συγκεκριμένα, αυτό που μετράται είναι η ηλεκτροχημική αναγωγή των ιόντων χρυσού Au(3) σε Au(0). Η ποσότητα των νανοσωματιδίων χρυσού είναι ανάλογη του DNA στόχου που ανιχνεύεται και αυτό εκφράζεται όπως φαίνεται και στο σχήμα 5 στην καμπύλη ρεύματος-τάσης.



Σχήμα 5 Από εφαρμογή ανίχνευσης DNA που συνδέεται με ασθένεια φυτών[12]

Ένα δεύτερο παράδειγμα είναι βιοαισθητήρας με χρήση νανοσωλήνων άνθρακα με πολλαπλά τοιχώματα (Multi-Walled Carbon Nanotubes - MWCNT). Πάνω στους νανοσωλήνες γίνεται η ακινητοποίηση τμημάτων DNA που λειτουργούν ως ανιχνευτές. Ως θετικό της συγκεκριμένης εφαρμογής αναφέρεται ότι η συγκεκριμένη διάταξη επιτρέπει την ευκολότερη μεταφορά του ηλεκτρικού φορτίου. Η ανίχνευση του παραγόμενου ηλεκτρικού σήματος γίνεται και πάλι με διαφορική παλμική βολταμετρία.[13]

Πιο συγκεκριμένα το DNA ανίχνευσης επισυνάπτεται πάνω στο τροποποιημένο ηλεκτρόδιο με ομοιοπολικό δεσμό. Παρουσία του DNA στόχου μέσω μιας σειράς αντιδράσεων, συμβαίνει τελικά μία αντίδραση πολυμερισμού, τα προϊόντα της οποίας καταλύουν αντίδραση μεταξύ H_2O_2 και υδροκινόνης που παράγει ηλεκτροχημικό σήμα που ανιχνεύει η DPV. Αντίθετα όταν δεν υπάρχει το DNA στόχος, η συγκεκριμένη σειρά αλυσιδωτών αντιδράσεων δεν πραγματοποιείται και δεν μετρείται κάποιο σήμα.[13] Τα αποτελέσματα φαίνονται στο σχήμα 6.



Σχήμα 6 Καμπύλη ρεύματος (a)απουσία και (b) παρουσία του DNA στόχου[13]

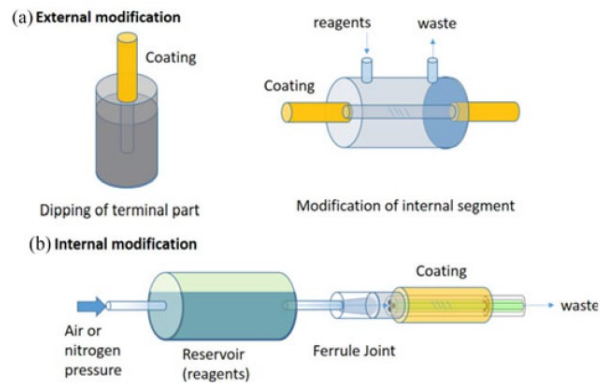
Τα μειονεκτήματα των συγκεκριμένων αισθητήρων αφορούν κυρίως τους περιορισμούς που έχουν όσον αφορά το εύρος των θερμοκρασιών στο οποίο μπορούν να λειτουργήσουν, πράγμα που μπορεί να είναι ανασταλτικός παράγοντας στην επιλογή τους εφόσον αρκετές εφαρμογές που σχετίζονται με ανίχνευση DNA θέλουν προσεκτική και συγκεκριμένη ρύθμιση της θερμοκρασίας, η μικρή διάρκεια ζωής τους και αστάθειες που μπορεί να προκληθούν λόγω του ότι χρειάζονται διαρκή παροχή από κάποια πηγή τάσης ή ρεύματος.[7]

2.2.2 Οπτικοί Βιοαισθητήρες Ανίχνευσης DNA

Οι οπτικοί βιοαισθητήρες βασίζονται στην παρατήρηση αλλαγών στη φάση, την πολικότητα, την συχνότητα κ.α. μετά την αλληλεπίδραση με τον αναλύτη. Αναλόγως με τον μηχανισμό που χρησιμοποιείται χωρίζονται σε βιοαισθητήρες απορρόφησης στους οποίους μετριέται αλλαγή στο πλάτος του φωτός παρουσία και απουσία του αναλύτη, βιοαισθητήρες φθορισμού, βιοαισθητήρες με βάση τη φωταύγεια κ.α.[10]

Πρώτο παράδειγμα τέτοιου βιοαισθητήρα ανίχνευσης DNA είναι ο βιοαισθητήρας που βασίζεται στη χρήση οπτικών ινών ως επιφάνεια στην οποία έπειτα από κατάλληλη τροποποίηση θα αλληλεπιδράσουν οι ανιχνευτές με το επιθυμητό μόριο ανίχνευσης, δηλαδή το DNA.

Η τροποποίηση της οπτικής ίνας μπορεί να γίνει είτε εσωτερικά είτε εξωτερικά όπως παρουσιάζεται και στο σχήμα 7. Εσωτερικά επιτυγχάνεται με διήθηση στις οπές της μικροδομημένης οπτικής ίνας με εφαρμογή πίεσης ενώ εξωτερικά με βύθιση της εξωτερικής αισθητήριας περιοχής της ίνας σε κατάλληλο διάλυμα. Και στις δύο περιπτώσεις σκοπός είναι η τροποποίηση με αναγνωριστικά στοιχεία που μπορούν να αλληλεπιδρούν με επιλεκτικό τρόπο με το DNA στόχο και συνήθως το ρόλο αυτό παίζουν μικρά τμήματα DNA ολιγονουκλεοτιδίων ή πεπτιδικά νουκλεϊκά οξέα (peptide nucleic acid-PNA) δηλαδή τεχνητά νουκλεϊκά οξέα που μιμούνται το DNA(βλ. Σχήμα 8).[14]

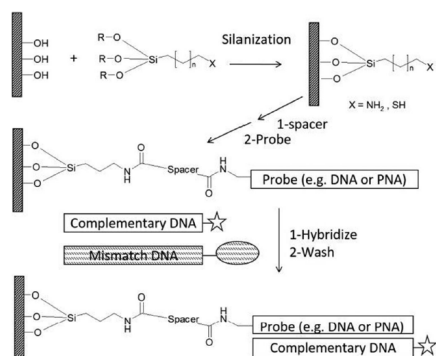


Σχήμα 7 (α)εξωτερική και (β) εσωτερική τροποποίηση της οπτικής ίνας[14]

Στη συνέχεια οι οπτικές ίνες συνδέουν το φως από μία ευρυζωνική πηγή με την αισθητήρια περιοχή και από εκεί με έναν δέκτη όπου παρακολουθείται η επιλεκτική συμπεριφορά του αισθητήρα ως προς το μήκος κύματος.[14]

Πιο συγκεκριμένα για τη μεθοδολογία αναγνώρισης του DNA υπάρχουν διαφορετικές προσεγγίσεις, τόσο labelled δηλαδή με τη χρήση ουσιών επισήμανσης όσο και label-free δηλαδή χωρίς τη χρήση αυτών.

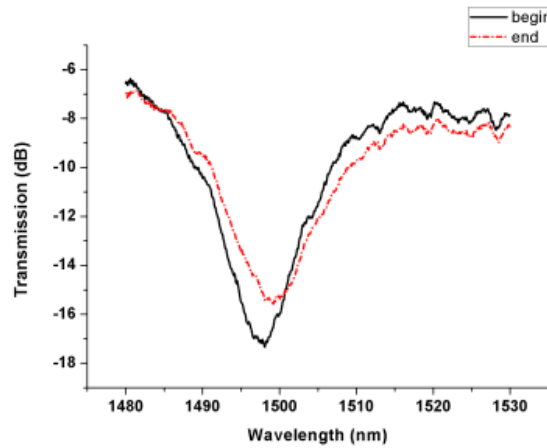
Στην πρώτη περίπτωση απαιτείται η χρήση φθορίζουσών βαφών για την ενσωμάτωση των οποίων απαιτείται ειδικό βήμα που αυξάνει το κόστος και την πολυπλοκότητα. Στη συνέχεια αφότου διεγερθούν σε κατάλληλο μήκος κύματος το στοιχείο βιοαναγνώρισης πάνω στην επιφάνεια της οπτικής ίνας και το δείγμα που περιέχει το DNA, η αλληλεπίδρασή τους στην περίπτωση ύπαρξης του DNA θα δώσει το παραγόμενο και μετρήσιμο σήμα φθορισμού. [14]



Σχήμα 8 Σχηματική Αναπαράσταση της Εναπόθεσης ανιχνευτών πάνω στην οπτική ίνα και του Υβριδισμού με συμπληρωματικό DNA[14]

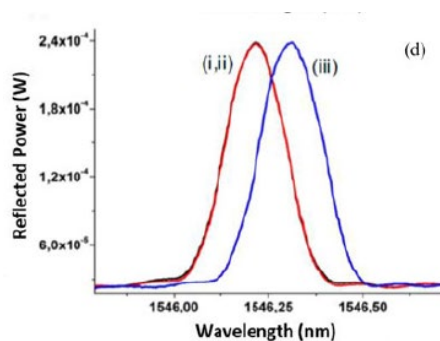
Στη δεύτερη περίπτωση περιλαμβάνεται αισθητήρας που για τη μέτρηση εκμεταλλεύεται τη μεταβολή του δείκτη διάθλασης που σχετίζεται με την παρουσία και τη συγκέντρωση του στόχου και μπορεί να γίνει με πολύ μικρούς όγκους δείγματος.[15]

Ως μεταλλάκτης χρησιμοποιείται το πλέγμα (grating) πάνω στην οπτική ίνα που έχει μια περιοδική αλλαγή στο δείκτη διάθλασης, επομένως λειτουργεί ως φίλτρο μήκους κύματος που επηρεάζει το φάσμα του σήματος που διαδίδεται μέσω της ίνας. Οι ιδιότητες του φίλτρου εξαρτώνται από την περιοδικότητα, το μήκος του πλέγματος και το προφίλ του δείκτη διάθλασης. Οι αλλαγές, λοιπόν, του δείκτη διάθλασης στην περιοχή γύρω από το πλέγμα επηρεάζουν τις ιδιότητές του και συνεπώς το φιλτράρισμα του φωτός που διαδίδεται από την ίνα. Έτσι, η αναγνώριση του DNA προκύπτει με παρακολούθηση της φασματικής απόκρισης του πλέγματος.[15] Στο σχήμα 9 φαίνεται η μετατόπιση αυτή της κορυφής συντονισμού.



Σχήμα 9 Μετατόπιση της κορυφής συντονισμού πριν(μαύρο) και μετά(κόκκινο) τον υβριδισμό[15]

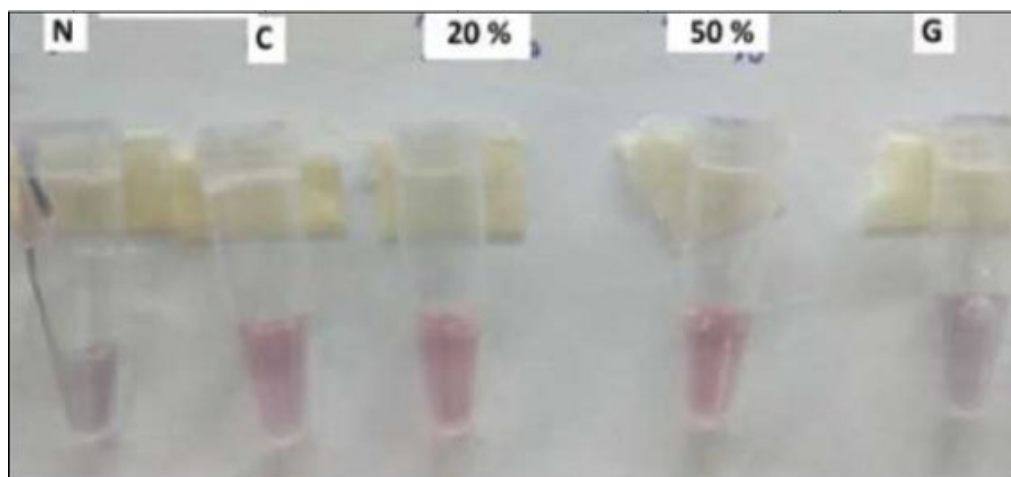
Ωστόσο δεν είναι πάντα ιδιαίτερα εύκολο να αναγνωριστεί αυτή η αλλαγή του δείκτη διάθλασης καθώς μπορεί να είναι πολύ μικρή. Για να ενισχυθεί η αλλαγή που φαίνεται προτείνεται η εσωτερική τροποποίηση της οπτικής ίνας με νανοσωματίδια χρυσού [14] και ακολούθως στο σχήμα 10 φαίνονται τα αποτελέσματα που ελήφθησαν πριν και μετά τον υβριδισμό σε συγκεκριμένη εφαρμογή με οπτική ίνα τροποποιημένη με PNAs όπου δεν παρατηρείται μετατόπιση στο μήκος κύματος χωρίς την προσθήκη των νανοσωματιδίων καθώς η κόκκινη και η μαύρη γραφική συμπίπτουν. Η μπλε αφορά τη διήθηση νανοσωματιδίων χρυσού που πράγματι οδηγεί σε αποτέλεσμα.



Σχήμα 10 Η αλλαγή στο μήκος κύματος του φωτός από ανάκλαση από την οπτική ίνα πριν την προσθήκη DNA(i), μετά την προσθήκη DNA(ii), μετά τη διήθηση νανοσωματιδίων χρυσού(iii)[14]

Σε άλλη εφαρμογή που αναπτύχθηκε οπτικός βιοαισθητήρας για την ανίχνευση του DNA χρησιμοποιήθηκαν χρυσά νανοσωματίδια συζευγμένα με ολιγονουκλεοτίδια του DNA προς ανίχνευση και δημιουργήθηκε ένα υδατικό διάλυμα αυτών στο οποίο έγινε προσθήκη διαλύματος DNA προς ανίχνευση. Η αρχή λειτουργίας του συγκεκριμένου βιοαισθητήρα βασίζεται στην αλλαγή χρώματος που προκαλούνται ή όχι ανάλογα με την παρουσία του DNA προς ανίχνευση όπως φαίνεται και στο σχήμα 11.[16]

Πιο συγκεκριμένα, στο διάλυμα το οποίο αρχικά είχε ροζ-κόκκινο χρώμα λόγω της κορυφής της οπτικής απορρόφησης στα 520-525 nm από τη διέγερση των ελεύθερων ηλεκτρονίων της ζώνης αγωγιμότητας, προστέθηκε HCl το οποίο προκαλεί τη συσσωμάτωση των νανοσωματιδίων χρυσού. Έτσι λοιπόν, στην περίπτωση παρουσίας του DNA τα τροποποιημένα νανοσωματίδια προχώρησαν στη διαδικασία υβριδισμού και δε συσσωματώθηκαν με αποτέλεσμα το χρώμα να παραμείνει το ίδιο. Στην περίπτωση όμως που δεν ανιχνεύτηκε το DNA συσσωματώθηκαν, μετατοπίζοντας την κορυφή απορρόφησης σε μήκη κύματος μεγαλύτερα των 570 nm και το χρώμα του διαλύματος έγινε μωβ όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα(σχήμα 11).[16]



Σχήμα 11 : Από αριστερά προς τα δεξιά: N: αρνητικός έλεγχος με νερό, C: θετικός έλεγχος με 100% αγελαδινό DNA, 20%-50%: κατσικίσιο γάλα νοθευμένο με 20% και 50% αντίστοιχα αγελαδινό γάλα, G:αρνητικός έλεγχος με 100% κατσικίσιο γάλα[16]

Επειδή τα αποτελέσματα βασίζονται στην παρατήρηση χρωματικής αλλαγής η οποία μπορεί να μην είναι πάντα εμφανής με γυμνό μάτι, η ακρίβεια του βιοαισθητήρα μπορεί να ενισχυθεί με τη χρήση φασματογράφου απορρόφησης.[16]

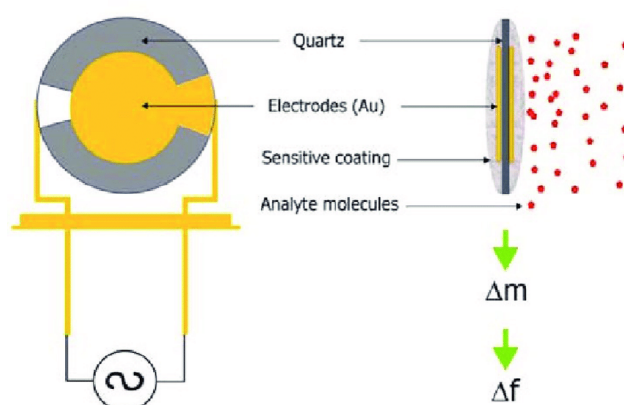
Στα μειονεκτήματα αυτού του τύπου βιοαισθητήρων συμπεριλαμβάνεται η σχετικά χαμηλή ευαισθησία που έχουν συχνά, η παροχή συνήθως μόνο ποιοτικών αποτελεσμάτων, το γεγονός ότι επηρεάζονται πολύ εύκολα από περιβαλλοντικές συνθήκες όπως εξωτερικές πηγές φωτισμού και η περιορισμένη διάρκεια ζωής τους.[10]

2.2.3 Μηχανικός Βιοαισθητήρας Ανίχνευσης DNA

Οι μηχανικοί βιοαισθητήρες ανίχνευσης DNA ανιχνεύουν διαφορές σε μηχανικές και φυσικές παραμέτρους όπως οι δυνάμεις και η μάζα που προκαλούνται από την αλληλεπίδραση των βιομορίων. [7]

Στα θετικά τους συγκαταλέγεται η εξαιρετική ανάλυση μάζας που μπορεί να γίνει, ο ποσοτικός προσδιορισμός δυνάμεων σε κυτταρικό επίπεδο, ο γρήγορος χρόνος ανίχνευσης, η ανίχνευση ουσιών και στην υγρή και στην αέρια φάση και το ότι δεν απαιτείται επισήμανση (labelling).

Ένα παράδειγμα τέτοιου βιοαισθητήρα είναι ο βιοαισθητήρας μικροϊσορροπίας κρυστάλλων χαλαζία(Quartz Crystal Microbalance- QCM biosensor) που φαίνεται και στο σχήμα 12. Πρόκειται για τεχνολογία υψηλής ευαισθησίας που στηρίζεται στην παρακολούθηση της αλλαγής της μάζας στην επιφάνεια των κρυστάλλων χαλαζία. Αυτό επιτυγχάνεται μετρώντας τις αλλαγές της συχνότητας συντονισμού των κρυστάλλων.[17]



Σχήμα 12 Αρχή λειτουργίας QCM βιοαισθητήρα[17]

Για την δημιουργία του αισθητήρα χρειάζονται οι κρύσταλλοι χαλαζία επικαλυμμένοι με ηλεκτρόδια χρυσού που βρίσκονται και στο εμπόριο, ηλεκτρονικό κύκλωμα ταλάντωσης, σταθεροποιητής τάσης, θερμικό σύστημα ελέγχου και τα κύτταρα ανίχνευσης.[17]

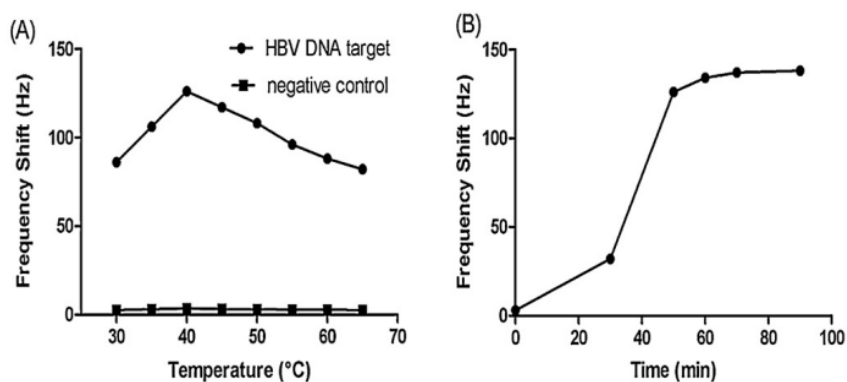
Η διαδικασία που ακολουθείται περιγράφεται συνοπτικά ακολούθως. Αφότου οι κρύσταλλοι καθαριστούν, πλυθούν και ξηραθούν, απαιτείται η συναρμολόγηση των κυττάρων ανίχνευσης. Για το λόγο αυτό αφήνονται πάνω στα ηλεκτρόδια των κρυστάλλων χαλαζία σε συγκεκριμένη θερμοκρασία και για συγκεκριμένη ώρα. Στη συνέχεια γίνεται πλύση των ηλεκτροδίων προκειμένου να αφαιρεθούν τα μη προσδεμένα κύτταρα. Σε αυτή τη διαδικασία παρακολουθείται σε πραγματικό χρόνο και καταγράφεται η αλλαγή της συχνότητας συντονισμού των κρυστάλλων.[17]

Αφότου σταθεροποιηθεί η συχνότητα, υπό συγκεκριμένη θερμοκρασία προστίθενται κυκλικοί ανιχνευτές (probes) και κλώνοι εκκινήτων (primers) στα κύτταρα ανίχνευσης. Στη συγκεκριμένη φάση πραγματοποιείται ένα βήμα ενίσχυσης της αλληλουχίας στόχου το οποίο αυξάνει και ιδιαίτερα το κόστος της διαδικασίας. Τα παράγωγα αυτής της αντίδρασης ενίσχυσης προστίθενται στα κύτταρα ανίχνευσης και καταγράφεται η μετατόπιση της συχνότητας πριν και μετά από αυτή τη διαδικασία.[17]

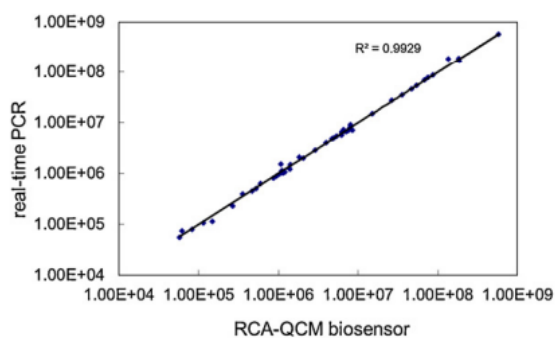
Ουσιαστικά η μετρούμενη απόκριση βασίζεται στο ότι η μάζα των μορίων που δεσμεύονται στη χρυσή επιφάνεια των ηλεκτροδίων ποικίλλει ανάλογα με την αλλαγή συχνότητας του βιοαισθητήρα.

Για να ενισχυθεί η ειδικότητα του αισθητήρα ο κυκλικός ανιχνευτής (probe) έχει τρεις διακριτές περιοχές: δύο συμπληρωματικές αλληλουχίες DNA στόχων που βρίσκονται στο 5' και 3' άκρο και μια ειδική περιοχή που μπορεί να υβριδιστεί με τους κλώνους των εκκινήτων. Μόνο αν τα άκρα του κυκλικού ανιχνευτή υβριδιστούν με τις ακολουθίες στόχους του DNA μπορούν να ενωθούν και τα δύο άκρα του και να δημιουργηθεί ο κυκλικός ανιχνευτής, διαφορετικά δεν αναγνωρίζεται η αλληλουχία ώστε να παραχθεί το ενισχυμένο σήμα.[17]

Ακολουθώς φαίνονται τα αποτελέσματα ενός τέτοιου αισθητήρα για την ανίχνευση DNA υπατίτιδας Β(βλ. Σχήμα 13) καθώς και η σύγκριση του με το real-time PCR (βλ. Σχήμα 14).



Σχήμα 13 Αλλαγή συχνότητας συναρτήσει της θερμοκρασίας (Α) και συναρτήσει του χρόνου(Β)[17]



Σχήμα 14 Σύγκριση QCM biosensor με real-time PCR[17]

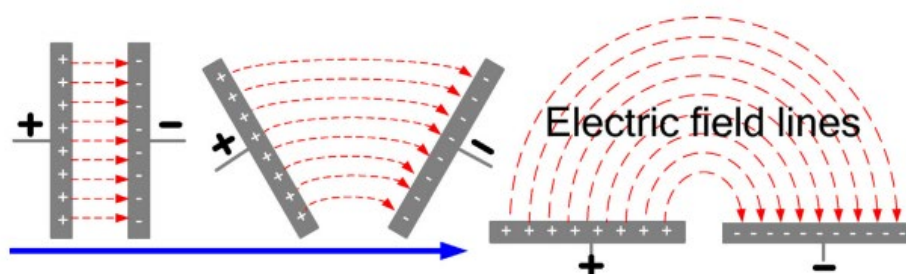
Στα μειονεκτήματά των μηχανικών βιοαισθητήρων συμπεριλαμβάνεται η χαμηλή ευαισθησία τους σε ορισμένες εφαρμογές που αφορούν την ανίχνευση DNA καθώς και το ότι παρέχουν συνήθως ποσοτικά αποτελέσματα.

3.Βιοαισθητήρας Ενδοδιαπλεκόμενων Ηλεκτροδίων (Interdigital Electrodes Biosensor- IDE Biosensor)

3.1 Περιγραφή δομής

Στη σημερινή εποχή υπάρχει έντονα η ανάγκη για ανάπτυξη γρήγορων διαγνωστικών προσεγγίσεων ακριβείας, πράγμα που έχει ως συνέπεια την ευρεία ανάπτυξη των βιοαισθητήρων. Η προνομιακή λειτουργία των interdigital αισθητήρων δηλαδή των βιοαισθητήρων ενδοδιαπλεκόμενων ή interdigital ή interdigitated ηλεκτροδίων τους κάνει ιδιαίτερα ελκυστικούς σε πληθώρα εφαρμογών.[18] Πιο συγκεκριμένα, κάποια από τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά τους είναι το μικρό τους μέγεθος, η γρήγορη απόκρισή τους, η έλλειψη ακτινοβολίας και το χαμηλό κόστος κατασκευής τους. Γι' αυτό το λόγο, η μέτρηση αλλαγών στις ηλεκτρικές ιδιότητες των interdigital ηλεκτροδίων προσφέρεται ως μια φθηνή εναλλακτική για διαγνωστική και όχι μόνο χρήση.[19]

Οι interdigital αισθητήρες έχουν αρχή λειτουργίας ίδια με αυτή των πυκνωτών παράλληλων πλακών. Στο σχήμα 15 φαίνεται η μετατροπή ενός πυκνωτή παράλληλων πλακών σε interdigital πυκνωτή. [20]



Σχήμα 15 Μετάβαση από πυκνωτή παράλληλων πλακών σε Interdigital Πυκνωτή[20]

Ο τελευταίος περιλαμβάνει πολλαπλά επίπεδα ηλεκτρόδια σε δομή χτενιού που αλληλοδιεισδύουν, γεγονός που δίνει τη δυνατότητα να εξαχθεί ισχυρότερο σήμα σε σχέση με το αντίστοιχο σήμα που λαμβάνεται από ένα μόνο ζεύγος ηλεκτροδίων. Με την εφαρμογή διαφορετικών δυναμικών πεδίων σε κάθε ηλεκτρόδιο του χτενιού, παράγεται πεδίο μεταξύ των θετικών και αρνητικών ηλεκτροδίων το οποίο διογκώνεται λόγω της αντίθετης πολικότητάς τους. Η φύση αυτού του παραγόμενου

ηλεκτρομαγνητικού πεδίου ποικίλει ανάλογα με την απόσταση μεταξύ των χτενίων.[19]

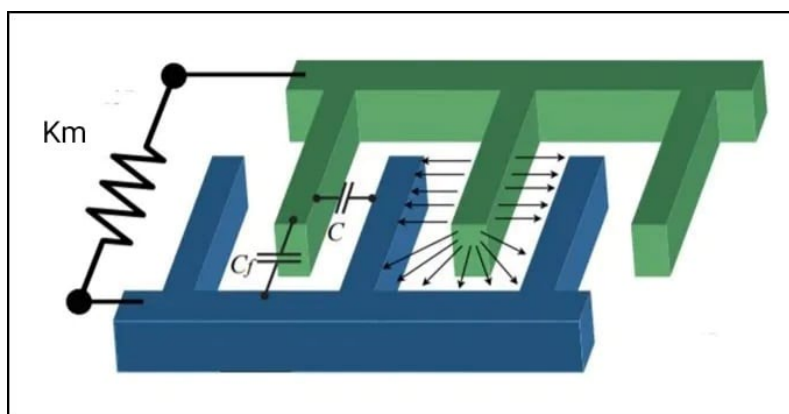
Για λόγους σύμβασης, θεωρείται πως τα δυο ηλεκτρόδια είναι ηλεκτρόδια διέγερσης και αναφοράς αντίστοιχα. Στην πράξη, τα δείγματα που είναι υπό εξέταση έρχονται σε επαφή ή σε πολύ κοντινή απόσταση με την επιφάνεια ανίχνευσης, δηλαδή με την επιφάνεια των ηλεκτροδίων. Έτσι, οι γραμμές του ηλεκτρομαγνητικού πεδίου που παράγεται και «ταξιδεύει» από το ένα ηλεκτρόδιο στο άλλο, διεισδύουν στο εσωτερικό του υπό εξέταση δείγματος. Όσον αφορά στο βαθμό διείσδυσης, εξαρτάται, κυρίως, από την απόσταση που έχουν τα ηλεκτρόδια μεταξύ τους. Στη συνέχεια, το διογκούμενο πεδίο αφού διεισδύσει στο υπό εξέταση δείγμα, προκαλεί μια ηλεκτρική μετατόπιση εξαιτίας των ιοντικών και των φαραδικών (χαμηλών συχνοτήτων) ρευμάτων που ρέουν μεταξύ των διεπαφών ηλεκτροδίου-ηλεκτρολύτη. Έτσι, μέσω της διακύμανσης του ηλεκτρικού πεδίου προκαλείται μεταβολή του φορτίου που συσσωρεύεται μεταξύ των ηλεκτροδίων, το οποίο κατά συνέπεια αλλάζει την χωρητικότητα του πυκνωτή. Η αλλαγή αυτή έχει ιδιαίτερη σημασία, καθώς μέσω αυτής μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα για το υπό εξέταση δείγμα.[19]

Με βάση τη ροή ρεύματος μπορούμε να τους διακρίνουμε σε δύο κατηγορίες: τους φαραδικούς (faradaic) και τους μη φαραδικούς (non faradaic). Στους πρώτους η ροή ρεύματος είναι αποτέλεσμα ηλεκτρονικής μεταφοράς και βασίζονται συχνά στη ηλεκτροχημική φασματοσκοπία σύνθετης αντίστασης μετρώντας την αντίσταση μεταφοράς ηλεκτρονίων και τη χωρητικότητα διπλής στρώσης (double layer capacitance) μέσα σε ένα εύρος συχνοτήτων. Στους δεύτερους η διαδικασία ροής ρεύματος λογίζεται ως αποτέλεσμα της χωρητικής φύσης ενός ηλεκτροδίου και η εξαγωγή συμπεράσματος για το υπό εξέταση δείγμα βασίζεται σε αλλαγές στη χωρητικότητα μεταξύ των interdigital ηλεκτροδίων ως ένδειξη φαινομένων μοριακών συνδέσεων στην επιφάνεια τους.[18]

Εδώ φυσικά πρέπει να αναφερθεί η ιδιαίτερη σημασία της σχεδίασης δηλαδή της γεωμετρίας των ηλεκτροδίων στις ιδιότητες του πυκνωτή. Γι' αυτό το λόγο χρειάζεται αναλόγως με την εφαρμογή και το επιθυμητό αποτέλεσμα να ρυθμίζονται

προσεκτικά το πλάτος, η απόσταση των ηλεκτροδίων, η ενεργός περιοχή των ηλεκτροδίων κ.α.[19]

Η χωρητικότητα ενός interdigital πυκνωτή αποτελεί ένα πολύπλοκο μέγεθος αφού στην πραγματικότητα πρόκειται για το άθροισμα δυο διαφορετικών χωρητικοτήτων που αναπτύσσονται από τα ηλεκτρόδια. Η πρώτη χωρητικότητα αφορά αυτή που σχηματίζεται από τα ενδοδιαπλεκόμενα χτένια των ηλεκτροδίων ενώ η δεύτερη αφορά τη χωρητικότητα που αναπτύσσεται από την άκρη των δακτύλων με το τοίχωμα του δεύτερου σετ των ηλεκτροδίων αντίστοιχα, όπως φαίνεται στην Εικόνα 16. Οι δυο χωρητικότητες συμβολίζονται με C και C_f αντίστοιχα και ο παρακάτω υπολογισμός είναι θεωρητικός



Σχήμα 16 Βοήθημα για τον θεωρητικό υπολογισμό της χωρητικότητας interdigital πυκνωτή όπου K_m σταθερά ελατηρίου που αντιπροσωπεύει την ακαμψία του μηχανισμού των δυο χτενίων, C και C_f οι προαναφερθείσες χωρητικότητες

$$C_{\text{tot}} = C + C_f \quad (1.1)$$

Όπου η χωρητικότητα C δίνεται από τη βασική σχέση:

$$C_{\text{sensor}} = n \cdot \varepsilon \cdot \frac{l \cdot t}{d} \quad (1.2)$$

Οι αισθητήρες ενδοδιαπλεκόμενων ηλεκτροδίων μπορούν να διακριθούν σε δύο κατηγορίες λειτουργίας ανάλογα με το μέγεθος που μετριέται για την ανίχνευση και ανάλυση του μορίου στόχου: τους βιοαισθητήρες σύνθετης αντίστασης και τους βιοαισθητήρες χωρητικότητας.[18]

3.1.1 Βιοαισθητήρες Σύνθετης Αντίστασης

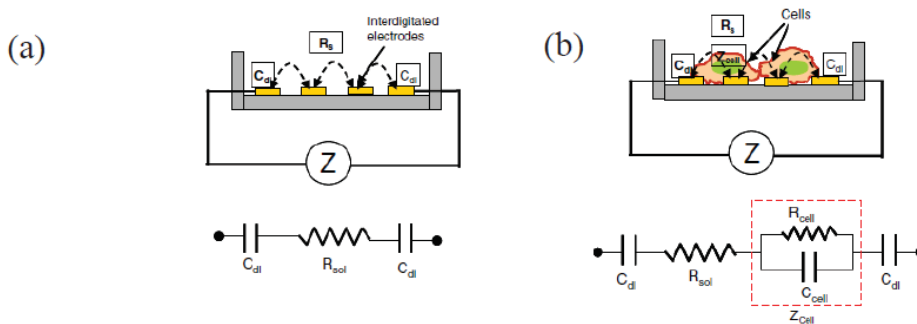
Πολλοί βιοαισθητήρες που χρησιμοποιούνται ευρέως βασίζονται σε φθορίζουσες βαφές (fluorescent dyes) και επισήμανση (labelling). Για την ανάγνωση των αποτελεσμάτων σε περίπτωση χρήσης αυτών όμως, απαιτούνται ακριβά όργανα υψηλής ακρίβειας ενώ ταυτόχρονα πολλές φορές οι φθορίζουσες ουσίες αλληλεπιδρούν με τον βιοαισθητήρα επηρεάζοντας σημαντικά τη διαδικασία ανίχνευσης και δίνοντας αναληθή αποτελέσματα. Η label-free λειτουργία των βιοαισθητήρων σύνθετης αντίστασης με ενδοδιαπλεκόμενα ηλεκτρόδια, σε συνδυασμό με τη δυνατότητά τους να γίνουν μικροί σε μέγεθος και με χαμηλό κόστος κάνει τη χρήση τους ιδιαίτερα ελκυστική.

Οι βιοαισθητήρες αυτοί μπορούν να βασίσουν την λειτουργία τους στην ανίχνευση σύνθετης αντίστασης ή στην ανίχνευση σύνθετης αντίστασης υποστρώματος ηλεκτρικού κυττάρου (Electrical Cell-substrate Impedance Sensing, ECIS). Συγκεκριμένα, τα κύτταρα που τοποθετούνται επάνω στα ηλεκτρόδια τείνουν να σχηματίζουν μονωτικές διηλεκτρικές μεμβράνες οι οποίες εμποδίζουν την ροή του ρεύματος. Η τελική τιμή της σύνθετης αντίστασης μεταξύ των ηλεκτροδίων εξαρτάται από διάφορους παράγοντες ανάλογα με την εφαρμογή όπως ο αριθμός των κυττάρων που εναποτίθεται επάνω σε κάθε ηλεκτρόδιο, η αλληλεπίδραση των κυττάρου καθώς και οι μορφολογικές και κινητικές τους αλλαγές. [18]

Σε παράδειγμα μέτρησης με ηλεκτροχημική φασματοσκοπία σύνθετης αντίστασης για την ανίχνευση καρκινικών κυττάρων όπως φαίνεται και στο Σχήμα 17, η ολική σύνθετη αντίσταση του αισθητήρα όταν δεν υπάρχει η εναπόθεση μορίων αποτελείται αποκλειστικά από τους πυκνωτές των ηλεκτροδίων (C_{dl}) και από την ωμική αντίσταση του διαλύματος (R_{sol}). Αντίθετα όταν τοποθετηθούν μόρια στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου, παρατηρείται και η συνεισφορά τους στην τελική τιμή της ολικής σύνθετης αντίστασης. Η συνεισφορά αυτή μοντελοποιείται με μια αντίσταση R_{cell} που συνδέεται παράλληλα με μια χωρητικότητα C_{cell} . Σημειώνεται πως η παρουσία των μορίων επηρεάζουν και το ιοντικό περιβάλλον των ηλεκτροδίων ή της διεπαφής του διαλύματος αφού διαφοροποιούνται η R_{sol} και η C_{sol} πράγμα που οδηγεί σε περαιτέρω αύξηση της σύνθετης αντίστασης των ηλεκτροδίων και της

αντίστασης του. Η ολική σύνθετη αντίσταση Z_{cell} ως αποτέλεσμα της παραλληλίας των R_{cell} και C_{cell} υπολογίζεται ως εξής:

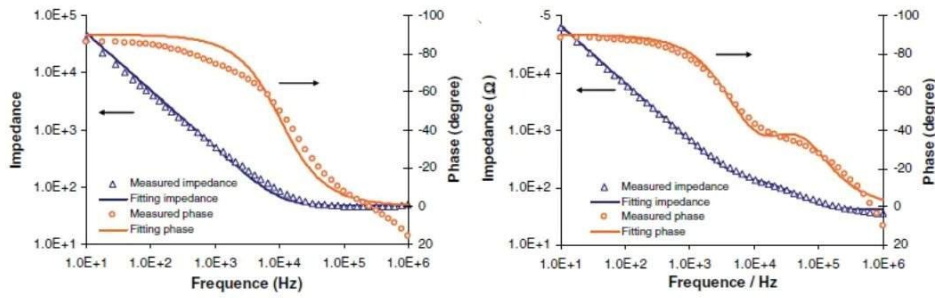
$$Z_{cell} = \sqrt{R_{cell}^2 + \frac{1}{(2\pi f C_{cell})^2}} \quad (1.3) \quad [18]$$



Σχήμα 17 Σχηματική αναπαράσταση και ισοδύναμο κύκλωμα διάταξης απουσία κυττάρων (a) και παρουσία κυττάρων (b)[18]

Με βάση λοιπόν τη μέτρηση της σύνθετης αντίστασης μπορούν να αναλυθούν στο συγκεκριμένο παράδειγμα διάφορες φάσεις της κυτταρικής δραστηριότητας. Με την προσθήκη των κυττάρων οι δύο ωμικές αντιστάσεις αρχίζουν να αυξάνονται με την R_{sol} να είναι αρχικά μεγαλύτερη από την R_{cell} καθώς η ανάπτυξη των κυττάρων είναι σχετικά αργή. Σε αυτό το σημείο πραγματοποιείται και η προσκόλληση των κυττάρων στον αισθητήρα οπότε και η χωρητική τιμή της ολικής σύνθετης αντίστασης είναι ψηλή μην αφήνοντας έτσι ρεύμα να περάσει. Καθώς τα κύτταρα αναπτύσσονται η R_{cell} γίνεται μεγαλύτερη από την R_{sol} ενώ αντίθετα η C_{cell} αρχίζει να μειώνεται. Τελικά στη διαδικασία πολλαπλασιασμού των κυττάρων η R_{cell} γίνεται μέγιστη και η C_{cell} ελάχιστη. [18]

Όλες αυτές οι πληροφορίες αποτυπώνονται μετρώντας μέσω του αισθητήρα τη σύνθετη αντίσταση των ηλεκτροδίων όπως φαίνεται στο Σχήμα 18.



Σχήμα 18 Αναπαράσταση Σύνθετης Αντίστασης απουσία(αριστερά) και παρουσία(δεξιά) των κυττάρων[18]

3.1.2 Βιοαισθητήρες Χωρητικότητας

Οι βιοαισθητήρες χωρητικότητας θεωρούνται κατάλληλοι για την ανίχνευση ή τη μέτρηση συγκεκριμένων πρωτεϊνών ή βιομορίων.[18] Σε μερικές περιπτώσεις, τα βιομόρια ανιχνεύονται λόγω των ιδιοτήτων τους όπως για παράδειγμα η σχέση αντιγόνου-αντισώματος ή η συμπληρωματικότητα του DNA, και τότε ονομάζονται χωρητικοί βιοαισθητήρες συγγένειας (Affinity biosensors).[21], [22]

Όταν γίνεται χρήση του βιοαισθητήρα χωρητικότητας ο αναλύτης μπορεί να ρυθμιστεί απευθείας σε ένα δείγμα. Οι τρεις βασικοί άξονες στους οποίους βασίζεται η μέτρηση είναι η ρύθμιση των ιδιοτήτων του διηλεκτρικού, η κατανομή του φορτίου και η αλλαγή της αγωγιμότητας όταν ο αναλύτης βρίσκεται στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου.[18]

Στους χωρητικούς βιοαισθητήρες συγγένειας όπως αυτός του σχήματος 19 γίνεται χρήση ακινητοποιημένων στοιχείων αναγνώρισης όπως αντισώματα σε λεπτές στρώσεις πάνω στο ηλεκτρόδιο. Η χρήση των interdigital πυκνωτών έναντι άλλου τύπου πυκνωτών έγκειται στην αύξηση της ενεργούς επιφάνειας. Η βασική εξίσωση για τον υπολογισμό της χωρητικότητας είναι η ακόλουθη:

$$C = \epsilon_0 \cdot \epsilon_r \cdot \frac{A}{d} \quad (1.4) [18]$$

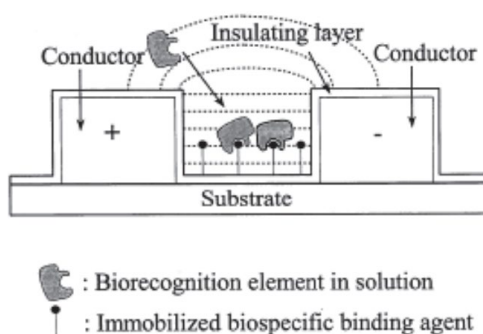
όπου ϵ_0 είναι η διαπερατότητα του κενού, ϵ_r είναι η σχετική διαπερατότητα του υλικού μεταξύ των πλακών, A είναι η επιφάνεια της πλάκας του ηλεκτροδίου, d είναι η απόσταση μεταξύ των πλακών.

Η βασική αρχή για την μέτρηση των interdigital χωρητικών αισθητήρων βασίζεται στην αλλαγή της διηλεκτρικής σταθεράς του interdigital πυκνωτή. Η χωρητικότητα του interdigital αισθητήρα δίνεται από την παρακάτω σχέση :

$$C_{\text{sensor}} = n \cdot \varepsilon \cdot \frac{l \cdot t}{d} \quad (1.5)$$

όπου n είναι ο αριθμός των δακτύλων, ε είναι η διαπερατότητα μεμβράνης επικάλυψης, l είναι το μήκος των μεσοδακτυλικών ηλεκτροδίων, t είναι το πάχος των interdigital ηλεκτροδίων, d είναι η απόσταση μεταξύ των ηλεκτροδίων.[18], [19]

Ωστόσο, ο τύπος αυτός δε μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό της χωρητικότητας στην περίπτωση που χρησιμοποιηθούν ηλεκτρόδια νανοκλίμακας.

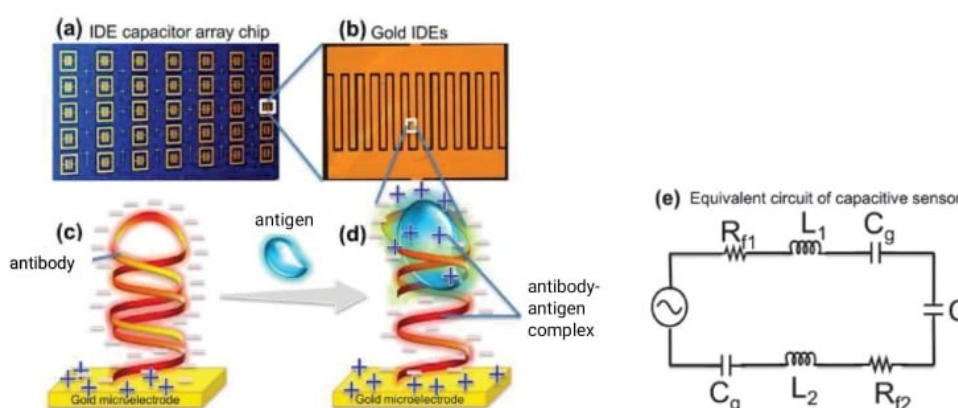


Σχήμα 19 Χωρητικός βιοαισθητήρας συγγένειας ενδοδιαπλεκόμενων ηλεκτροδίων[18]

Σε κάθε περίπτωση, ένας ιδανικός αισθητήρας θα πρέπει να είναι σταθερός και να παρουσιάζει υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα. Στην προκειμένη περίπτωση, η επιτυχημένη ανάπτυξη του βιοαισθητήρα ισοδυναμεί με ακριβείς και έγκυρες μετρήσεις της χωρητικότητας. Η επιφάνεια του πυκνωτή είναι εν γένει ασθενώς φορτισμένη. Έτσι, μετά την τοποθέτηση των κυττάρων αυξάνεται η χωρητικότητά της επιφάνεια του πυκνωτή. Όπως αναλύθηκε παραπάνω, τα κύτταρα τα οποία εναποτίθενται επάνω στην επιφάνεια του πυκνωτή χρησιμοποιούνται για την αναγνώριση των μορίων-στόχων. Έτσι, με τη μέτρηση της χωρητικότητας του πυκνωτή μπορεί να διαπιστωθεί τότε έχει συμβεί ένωση των ακινητοποιημένων μορίων (πχ του αντισώματος) με τον αντίστοιχο στόχο τους (πχ με το αντίστοιχο αντιγόνο) στην επιφάνεια του αισθητήρα .[21], [23]

Στο παράδειγμα του Σχήματος 20 εξετάστηκαν αλλαγές στη διηλεκτρική διαπερατότητα μορίων από καρκινικό όγκο με χρήση βιοαισθητήρα χωρητικότητας η διάταξη του οποίου περιλαμβάνει μονοεπίπεδο κυματοδηγό μικροκυμάτων, δύο παράλληλα συνεστραμμένα πηνία και δύο interdigital πυκνωτές σε δομή χτενιού(interdigitated comb capacitor- IDC Capacitor). Η διάταξη μοντελοποιείται όπως φαίνεται στο ισοδύναμο κύκλωμα.

Παρατηρήθηκε μετατόπιση της συχνότητας συντονισμού όταν τα κύτταρα εναποτίθενται στους IDC πυκνωτές.



Σχήμα 20 (α) Συστοιχία ID πυκνωτών σε τσιπ, (β) Ενδεικτικός ID πυκνωτής, (γ) Η εναπόθεση του αντισώματος επάνω στην επιφάνεια του ID πυκνωτή, (δ) το συμπλεγμα αντισώματος-αντιγόνου που δημιουργεί το κατανεμημένο φορτίο, (ε) Ισοδύναμο κύκλωμα του ID αισθητήρα[18]

Όπως φαίνεται στην παραπάνω εικόνα, η αντιστάσεις R_{f1} και R_{f2} αντιπροσωπεύουν τις αντιστάσεις μεταξύ των χτενίων του ηλεκτροδίου. Επίσης τα L_1 και L_2 αναπαριστούν τις αυτεπαγωγές της μαγνητικής σύζευξης μεταξύ των δαχτύλων των ηλεκτροδίων ενώ το C μοντελοποιεί την δίοδο μεταξύ των μονωμένων ηλεκτροδίων μέσω του υποστρώματος του SiO_2 και του υποστρώματος του πυριτίου. Τα μονωτικά στρώματα στα ηλεκτρόδια συνδέονται μέσω της χωρητικότητας C_g . Η αλλαγή του πάχους της επιφάνειας στα ηλεκτρόδια επηρεάζεται από την ακινητοποίηση των μορίων-ανιχνευτών καθώς και της ένωσης αυτών με τα μόρια-στόχους στην επιφάνεια του αισθητήρα. Όπως είναι φυσικό, η αλλαγή αυτή επηρεάζει τη ρύθμιση των χωρητικών αποκρίσεων και την επιφανειακή αγωγιμότητα του αισθητήρα. [18]

3.2 Χρήση Βιοαισθητήρα Interdigital Ηλεκτροδίων για την Ανίχνευση DNA

Η ανάγκη για ανάπτυξη μεθόδων ανίχνευσης DNA που δεν χρειάζονται σύνθετες διαδικασίες ούτε έχουν υψηλό κόστος και χρόνο αναμονής όπως το κατά τ' άλλα πολύ ακριβές PCR test ή οι οπτικοί βιοαισθητήρες, οδήγησαν στην αναζήτηση νέων εναλλακτικών που θα βασίζονται σε μετρήσεις αλλαγών ηλεκτρικών ιδιοτήτων όπως η αντίσταση και η χωρητικότητα. Η ιδιότητα του DNA για υβριδισμό με βάση τη συμπληρωματικότητα των βάσεων δεν θα μπορούσε να μην βρει εφαρμογή και στους βιοαισθητήρες ενδοδιαπλεκόμενων ηλεκτροδίων. Λόγω της σύνδεσης λοιπόν, συμπληρωματικών αλληλουχιών DNA που παίζουν το ρόλο ανιχνευτή και στόχου αντίστοιχα μπορεί να γίνει ανίχνευση της ύπαρξης πολύ συγκεκριμένων τμημάτων DNA χωρίς μάλιστα να απαιτείται η χρήση επισήμανσης (labelling).[21]

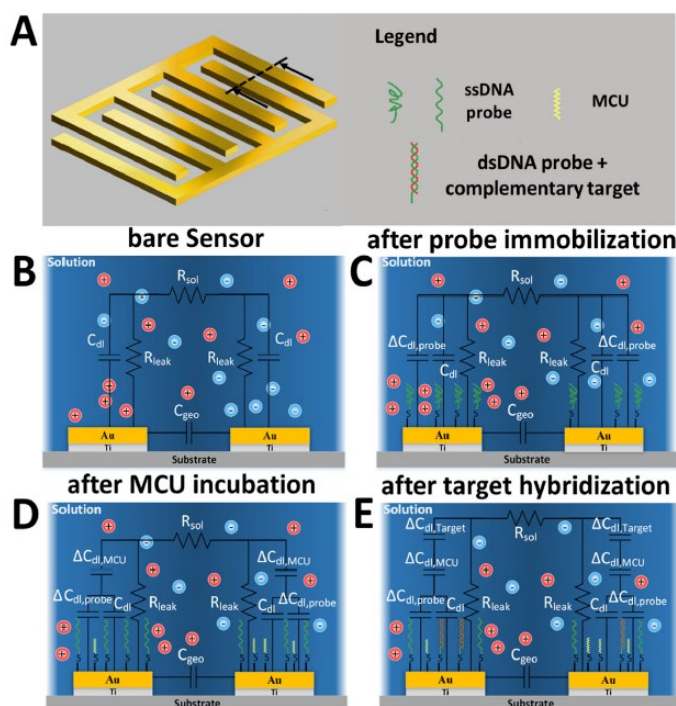
Η δομή και η γεωμετρία των πυκνωτών στους αισθητήρες χωρητικότητας παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, γι' αυτό το λόγο επιλέγονται και interdigital μικροηλεκτρόδια. Αυτά κατασκευάζονται με σύγχρονες τεχνικές όπως η εναπόθεση σε γυαλί ή άλλα στερεά υποστρώματα. Όταν είναι συνδεδεμένα με κυκλώματα μέτρησης πίσω άκρου (back-end measurement circuit) έχουν σημαντικά πλεονεκτήματα σε σχέση με τα συμβατικά ηλεκτρόδια άνθρακα όσον αφορά στις αναλυτικές μετρήσεις όπως η χαμηλή αντίσταση, ο υψηλός λόγος σήματος προς θόρυβο (Signal-to-Noise Ratio SNR), η ταχεία επίτευξη μόνιμης κατάστασης κ.α.[23]

Η λειτουργία τους μπορεί να είναι φαραϊδική είτε μη φαραϊδική, στα πλαίσια όμως αυτής της εργασίας θα εξεταστεί μόνο η δεύτερη περίπτωση καθώς τέτοιος είναι και ο αισθητήρας που αναπτύσσεται στο πειραματικό μέρος.

Στα θετικά τους συγκαταλέγεται η υψηλή ευαισθησία, το χαμηλό κόστος και η ευκολία του χειρισμού. Προσπάθειες γίνονται για την βελτίωση της ειδικότητας και την δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης.

Όπως περιγράφηκε και παραπάνω, η βασική αρχή λειτουργίας του αισθητήρα είναι η σύνδεση της αλλαγής της χωρητικότητας των interdigital ηλεκτροδίων με τα διάφορα στάδια της διαδικασίας ανίχνευσης του DNA.

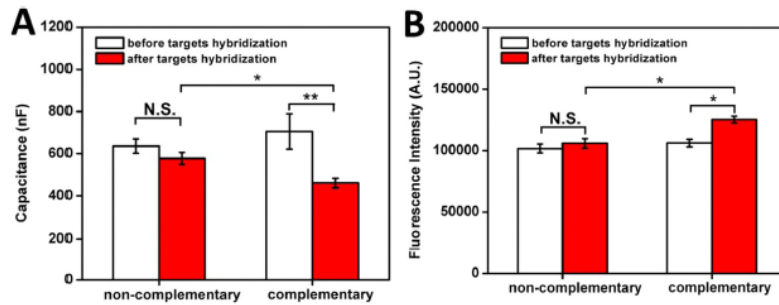
Στο πρώτο στάδιο, αφότου γίνουν πλύσεις της επιφάνειας των ηλεκτροδίων, γίνεται μέτρηση της χωρητικότητας του πυκνωτή προτού ο βιοαισθητήρας υποστεί κάποια αλλαγή. Στη συνέχεια, προσκολλώνται με ομοιοπολικό δεσμό πάνω στην επιφάνεια των ηλεκτροδίων οι τροποποιημένοι με θειούχα ομάδα ανιχνευτές του DNA στόχου, δηλαδή μια αλληλουχία μονόκλωνου DNA (single strand DNA- ssDNA), οι οποίοι και ακινητοποιούνται, έχοντας την ιδιότητα να συνδεθούν με το μονόκλωνο DNA στόχο. Με τη διαδικασία αυτή η χωρητικότητα του πυκνωτή αυξάνεται σημαντικά. Ακολούθως, γίνεται μία μέτρηση εναποθέτοντας μόνο το ρυθμιστικό διάλυμα στο οποίο διαλύεται το DNA στόχος, προκειμένου να διαπιστωθεί το πώς αυτό επηρεάζει τη χωρητικότητα. Στο τελευταίο στάδιο, τοποθετείται το διάλυμα που ενδεχομένως περιέχει το DNA στόχο και μετρείται η χωρητικότητα.[23] Η παραπάνω διαδικασία περιγράφεται και σχηματικά στο σχήμα 21.



Σχήμα 21 (Α) Σχηματική Αναπαράσταση του IDE Βιοαισθητήρα, (Β) Ισοδύναμο Κύκλωμα πριν τη χρήση, (C) Ισοδύναμο κύκλωμα με προσκόλληση των ανιχνευτών DNA, (D) Ισοδύναμο κύκλωμα με προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος, (E) Ισοδύναμο κύκλωμα μετά τον Υβριδισμό με το DNA στόχο [23]

Κατά τα στάδια της σχεδίασης του αισθητήρα, προσδιορίζονται τα όρια στα οποία πρέπει να κυμαίνεται η χωρητικότητα προκειμένου να ταξινομηθεί το δείγμα αναλόγως με την ύπαρξη ή όχι του DNA προς ανίχνευση. Πολλές φορές αναλόγως με την ακολουθία προς ανίχνευση χρειάζεται προσεκτική ρύθμιση της θερμοκρασίας.

Ως παράδειγμα παρουσιάζεται μία εφαρμογή στην οποία φαίνεται η αλλαγή της χωρητικότητας με συμπληρωματικό και με μη συμπληρωματικό DNA, καθώς και η επαλήθευση των αποτελεσμάτων με χρήση φθορισμού (βλ. Σχήμα 22).



Σχήμα 22 Μέτρηση της χωρητικότητας πριν(λευκό) και μετά(κόκκινο) τον υβριδισμό με μη συμπληρωματική(αριστερά) και συμπληρωματική (δεξιά) ακολουθία DNA με τον Χωρητικό Βιοαισθητήρα (A) και με Οπτική Μέθοδο(B)[23]

B. Πειραματικό Μέρος

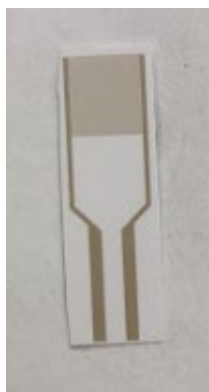
4.Υλικά και Μέθοδος

Στο πειραματικό μέρος της παρούσας εργασίας παρουσιάζεται αναλυτικά όλη η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την ανάπτυξη χωρητικού αισθητήρα interdigital ηλεκτροδίων με σκοπό την ανίχνευση αγελαδινού DNA ως νοθεία σε διαφορετικής προέλευσης γάλα.

4.1. Δομή Βιοαισθητήρα

Ο βιοαισθητήρας που αναπτύχθηκε στα πλαίσια της παρούσας εργασίας χρησιμοποιεί ως βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης ειδικά ολιγονουκλεοτίδια για μιτοχονδριακό DNA αγελάδας και πιο συγκεκριμένα δύο εκκινητές(primers) στους οποίους έχει γίνει τροποποίηση στο 5' άκρο με θειούχα ομάδα: forward primer CAATAACTCAACACAGAATTT και reverse primer CGTGATCTAATGGTAAGGAAT.

Επίσης χρησιμοποιήθηκε ως μεταλλάκτης ο πυκνωτής ενδοδιαπλεκόμενων ηλεκτροδίων της εικόνας 23. Πρόκειται για τον πυκνωτή PW-IDEAU50 ο οποίος περιέχει 70 χρυσά ηλεκτρόδια, πλάτος και διάκενο ηλεκτροδίων 50μm, συνολικό μήκος 7 mm και επιφάνεια 8.45 mm² πάνω στην οποία πραγματοποιείται η σύνδεση με το DNA προς αναγνώριση η οποία προκαλεί αλλαγή στη συνολική χωρητικότητα.



Σχήμα 23 Πυκνωτής ενδοδιαπλεκόμενων χρυσών ηλεκτροδίων

Για την ανίχνευση των αλλαγών στη χωρητικότητα χρησιμοποιήθηκε πρωτότυπο κύκλωμα ανάγνωσης που έχει κατασκευαστεί από το εργαστήριο και φαίνεται στην εικόνα 24.[24], [25]Το κύκλωμα αυτό φέρει LCD οθόνη στην οποία αναγράφονται σε πραγματικό χρόνο οι μετρήσεις της χωρητικότητας. Για την συλλογή των

καταγραφόμενων δεδομένων, το κύκλωμα αναγνώρισης έχει τη δυνατότητα σύνδεσης μέσω USB to TTL μετατροπέα με φορητό υπολογιστή. Τα δεδομένα που μεταδίδονται στον ηλεκτρονικό υπολογιστή μέσω σειριακή επικοινωνίας συλλέχθηκαν μέσω του εξομοιωτή τερματικού ανοικτού κώδικα PuTTY.



Σχήμα 24 Πρωτότυπο κύκλωμα ανάγνωσης

4.2 Προετοιμασία Δειγμάτων

Τα δείγματα DNA δόθηκαν από το εργαστήριο του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής. Πραγματοποιήθηκε εξαγωγή DNA από 1.5 ml φυγοκεντρημένων διαφορετικών γαλακτοκομικών προϊόντων (10 λεπτά στις 12000 x g) με χρήση του κιτ NucleoSpin Food® kit (Macherey-Nagel, GmbH & Co. KG, Germany), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και μια τροποποίηση προσθήκης ολονύκτιας επώασης με το ρυθμιστικό διάλυμα Lysis και την πρωτεϊνάση K στους 65 °C αντί για επώαση 30 λεπτών. Τα δείγματα μετά αποθηκεύτηκαν σε κατάψυξη στους -20 °C.[16]

4.3 Ανάπτυξη Βιοαισθητήρα και Μετρήσεις

Η διαδικασία υλοποίησης του βιοαισθητήρα έγινε σε ορισμένα στάδια που θα αναλυθούν ακολούθως.

4.3.1 Ανασύσταση των εκκινητών

Αρχικά χρειάστηκε να δημιουργηθούν διαλύματα εκκινητών καθώς αυτοί είχαν σταλεί ως αποξηραμένα σφαιρίδια σύμφωνα με τις οδηγίες που φαίνονται στην εικόνα 25.

No	Oligo Name	Sequence (5'->3')	Yield [OD]	Yield [μg]	Yield [nmol]	Conc. [pmol/μl]	Vol for 100 pmol/μl	Tm [°C]	MW [g/mol]	GC-Content	Synthesis Scale [μmol]	Purif.
1	COWREV	[ThioIc6]AAAAAAAAA ACGTGATCTAATGGT AAGGAATA	28,6	695.09	68.49		685	59.9	10148.78	25%	0.05	HPLC
2	COWFORW	[ThioIc6]AAAAAAAAA ACAATAACTCAACAC AGAATTTGC	46,22	1128.22	109.42		1094	60.1	10310.89	24%	0.05	HPLC

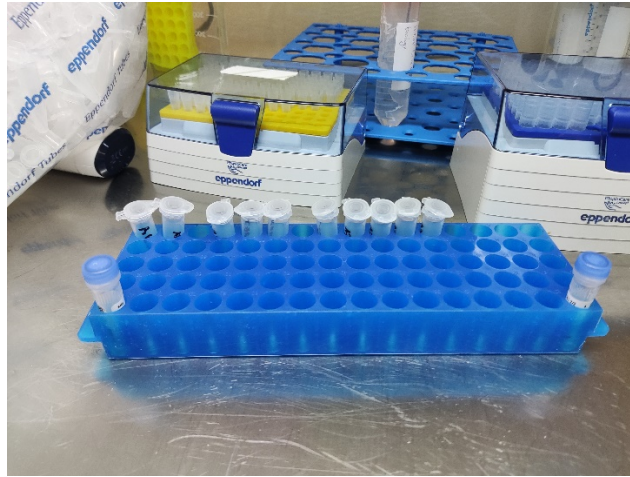
Σχήμα 25 Οδηγίες που αφορούν τους εκκινητές

Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε στον πάγκο καθαρισμού στρωτής ροής (Laminar Flow Cabinet) που φαίνεται στη εικόνα 26.



Σχήμα 25:Laminar Flow Cabinet

Οι εκκινητές βρίσκονταν στα δοχεία που φαίνονται στην εικόνα 26. Εκεί προστέθηκαν στον COWREV εκκινητή 685μl και στον COWFORW εκκινητή 1094 μl αποσταγμένου καθαρού νερού, δημιουργώντας έτσι δύο διαλύματα ίδιων συγκεντρώσεων. Στη συνέχεια τα δύο αυτά διαλύματα χωρίστηκαν σε διαλύματα των 60μl με χρήση



Σχήμα 28 Χωρισμός των εκκινητών σε δοχεία των 60μl

Τόσο πριν την προσθήκη του καθαρού νερού στα δοχεία με τους εκκινητές όσο και μετά την προσθήκη αυτή αλλά και μετά τον διαχωρισμό των primers ανά 60μl όλα τα διαλύματα υπέστησαν ανακίνηση με vortex vibrator (βλ. σχήμα 29) και φυγοκέντρηση με Centrifuge Spinning Machine(βλ. σχήμα 30).



Σχήμα 29 Vortex Vibrator



Σχήμα 30 Centrifuge Spinning Machine

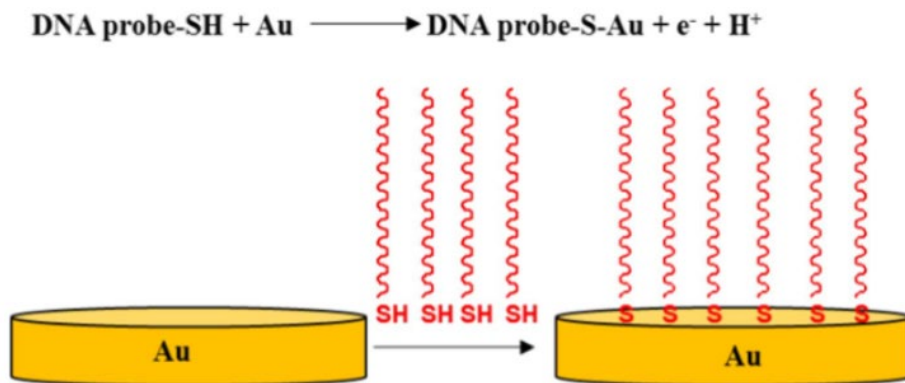
Τα διαλύματα των εκκινητών αποθηκεύτηκαν στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.3.2 Προετοιμασία Πυκνωτών

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, ο αισθητήρας χρησιμοποιεί ως βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης τους δύο εκκινητές, δηλαδή τα ολιγονουκλεοτίδια μιτοχονδριακού DNA. Για να πραγματοποιηθεί λοιπόν ο υβριδισμός μεταξύ των εκκινητών και του αγελαδινού DNA – στόχου, πρέπει προηγουμένως οι πρώτοι να έχουν ακινητοποιηθεί πάνω στην επιφάνεια του interdigital πυκνωτή ώστε η αντίδραση του υβριδισμού να επηρεάσει την χωρητικότητα του βιοαισθητήρα.

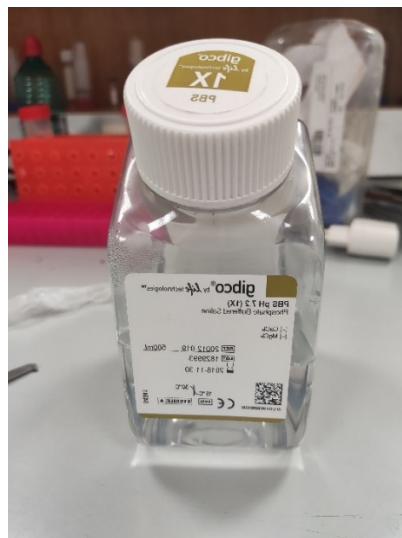
Για το σκοπό αυτό στο πρώτο βήμα της κατασκευής του αισθητήρα, έγιναν δοκιμές για να προσδιοριστεί η διαδικασία με την οποία θα γίνει η σύνδεση των εκκινητών με την επιφάνεια του πυκνωτή. Θεωρητικά, η διαδικασία με την οποία θα ακινητοποιηθούν η εκκινητές πάνω στα ηλεκτρόδια χρυσού (βλ. εικόνα 31) βασίζεται στην αντίδραση συγγένειας μεταξύ της θειούχας ομάδας με την οποία είναι τροποποιημένοι οι εκκινητές και της χρυσής επιφάνειας των ηλεκτροδίων κατά την οποία θα δημιουργηθεί ένας ομοιοπολικός δεσμός μεταξύ χρυσού(Au) και θείου(S).

Αυτός ο ομοιοπολικός δεσμός οδηγεί σε αύξηση της χωρητικότητας του interdigital πυκνωτή.[21]



Σχήμα 31 Ακινητοποίηση εκκινητών πάνω στην επιφάνεια χρυσού[21]

Η γυμνή επιφάνεια του πυκνωτή είναι ασθενώς φορτισμένη(περίπου 18pF). Αρχικά, πραγματοποιήθηκε μέτρηση της χωρητικότητας του πυκνωτή τοποθετώντας στην επιφάνειά του 30μl PBS. Το PBS (Phosphate- Buffered Saline) είναι το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων της εικόνας 32 που χρησιμοποιείται ευρέως σε βιολογικές εφαρμογές, όπως και σε πολλά βήματα της παρούσας εργασίας.



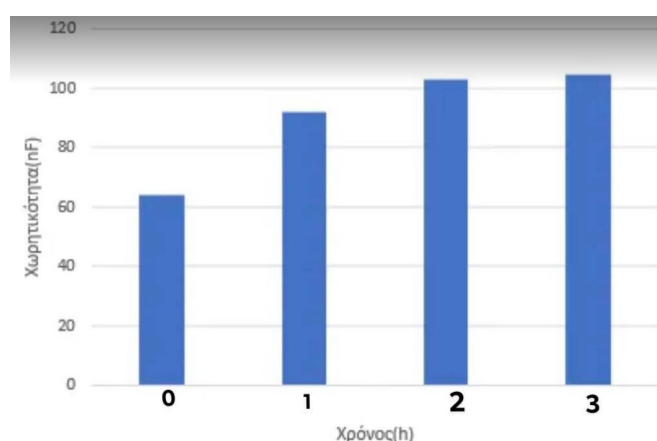
Σχήμα 32 PBS με pH 7.2

Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν πάνω στην επιφάνεια τριών interdigital πυκνωτών 30μl REVCOW εκκινητή (βλ. εικόνα 33) με σκοπό να μετρηθεί η αλλαγή της χωρητικότητας μετά από μία, δύο και τρεις ώρες αντίστοιχα.



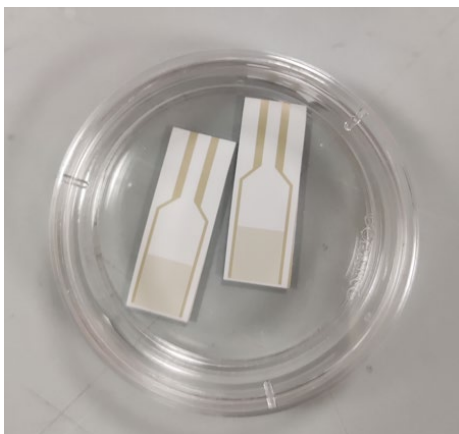
Σχήμα 33 Interdigital Πυκνωτής χρυσών ηλεκτροδίων με 30μl COWREV εκκινητή

Αφότου πέρασε καθένα από τα τρία διαστήματα, ο κάθε πυκνωτής πλύθηκε 2 φορές με 25 μl PBS και αφότου τοποθετήθηκαν 30μl PBS στην επιφάνειά του μετρήθηκε η χωρητικότητα του. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο σχήμα 34. Επειδή η διαφορά που παρατηρήθηκε στη χωρητικότητα δεν ήταν αρκετή ενώ επίσης ορισμένες φορές ο εκκινητής στέγνωσε γρηγορότερα μην αφήνοντας έτσι περιθώρια βελτίωσης με την πάροδο του χρόνου, αναζητήθηκε διαφορετική διαδικασία για την πρόσδεση των εκκινητών στην χρυσή επιφάνεια του πυκνωτή.



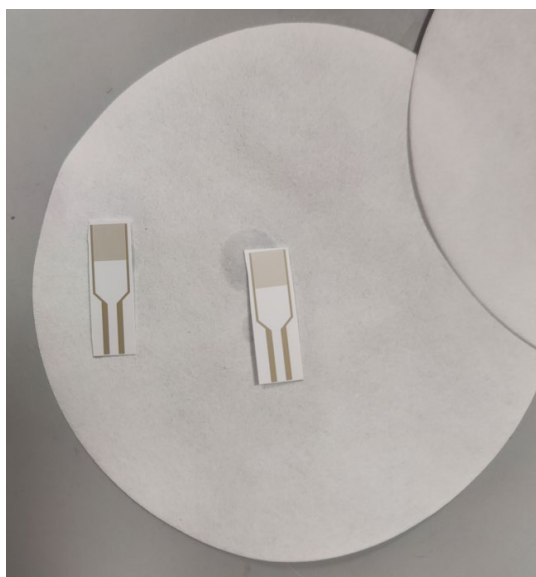
Σχήμα 34 Μετρήσεις χωρητικότητας με την πάροδο 1,2 και 3 ωρών από την εναπόθεση 30 μl COWREV εκκινητή στην επιφάνεια του πυκνωτή

Ακολούθως, δημιουργήθηκε διάλυμα με 50μl εκκινητή και 2ml PBS όπου βυθίστηκαν δύο πυκνωτές όπως φαίνεται στην εικόνα 35. Το τρυβλίο με τους πυκνωτές αποθηκεύτηκε στους +4°C για 15-20 ώρες. Δημιουργήθηκαν διαλύματα μόνο με COWFORW εκκινητή, μόνο με COWREV εκκινητή και με 25μl από τον κάθε εκκινητή προκειμένου να μελετηθούν διαφορές στα αποτελέσματα.

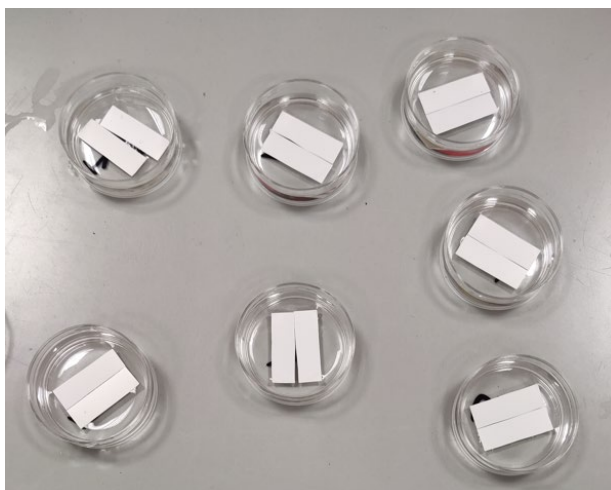


Σχήμα 35 Τρυβλίο με τους πυκνωτές βυθισμένους στο διάλυμα PBS-εκκινητή

Στη συνέχεια οι πυκνωτές βυθίστηκαν για 2-3 λεπτά σε 2ml PBS για να πλυθούν και να αφαιρεθούν μη προσδεδεμένα τμήματα των εκκινητών και στεγνώθηκαν όπως φαίνεται στην εικόνα 36. Η μέτρηση της χωρητικότητας μετά από αυτή την διαδικασία έδειξε πιο αποτελεσματική αλλαγή στην χωρητικότητα και γι' αυτό τον λόγο υιοθετήθηκε για την προετοιμασία των πυκνωτών με μία μόνο διαφοροποίηση στην πορεία. Επειδή οι πυκνωτές πριν την ακινητοποίηση των εκκινητών στη χρυσή επιφάνειά τους είναι υδρόφοβοι, ορισμένες φορές επέπλεαν με αποτέλεσμα να μην γίνεται σωστά η αντίδραση και να μην ανιχνεύεται διαφορά στην χωρητικότητά τους. Για το λόγο αυτό, τοποθετούνταν με την χρυσή επιφάνεια προς τα κάτω ώστε τα ηλεκτρόδια να είναι συνεχώς σε επαφή με το διάλυμα των εκκινητών όπως φαίνεται στην εικόνα 37.



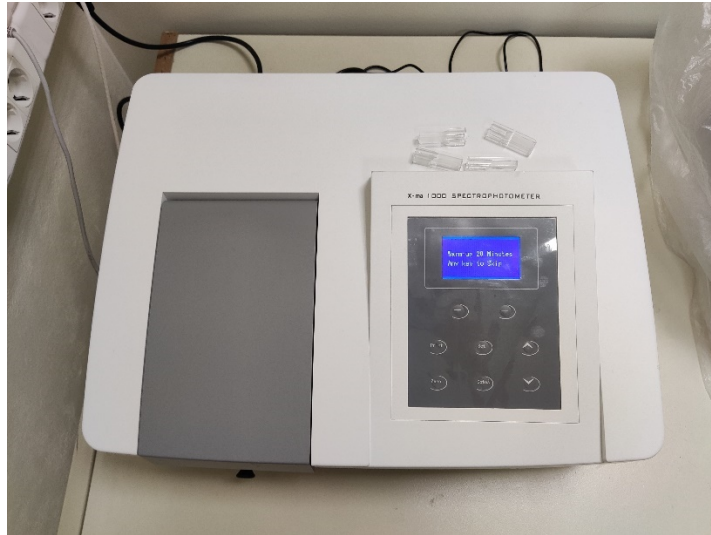
Σχήμα 36 Διαδικασία στεγνώματος πυκνωτών



Σχήμα 37 Τρυβλία με τους πυκνωτές τοποθετημένους ανάποδα ώστε να είναι σε επαφή με τους εκκινητές

4.3.3 Διαδικασία Ανίχνευσης αγελαδινού DNA

Για να πραγματοποιηθούν δοκιμές ανίχνευσης του DNA στόχου από τον βιοαισθητήρα, χρειάστηκε πρώτα να ποσοτικοποιηθεί το DNA που είχε προηγουμένως εξαχθεί. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο (Spectrophotometer) της εικόνας 38.



Σχήμα 38 Spectrophotometer

Για δοχείο χρησιμοποιήθηκε κυψελίδα χαλαζία (quartz cuvette) ώστε να περνάει από μέσα της UV light στα 260nm. Στόχος αυτής της διαδικασίας είναι ο προσδιορισμός της απορρόφησης του δείγματος προς εξέταση ώστε ακολούθως με χρήση του νόμου Beer- Lambert που φαίνεται στην εξίσωση (1.6) να υπολογιστεί η συγκέντρωση του αγελαδινού DNA.

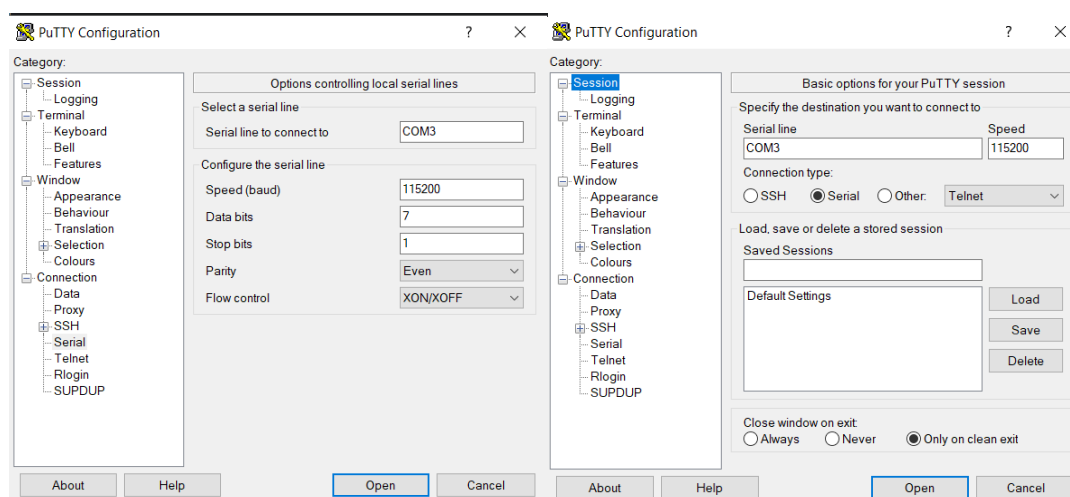
$$A = \varepsilon * c * l \quad (1.6)$$

Όπου A η απορρόφηση, ε μοριακός συντελεστής απορρόφησης, c μοριακή συγκέντρωση και l το μήκος της οπτικής διαδρομής

Έτσι, αρχικά προστίθεται 1ml καθαρού νερού για να ζυγοσταθμιστεί το μηχάνημα, δηλαδή να οριστεί η μηδενική απορρόφηση. Στη συνέχεια αφότου αφαιρεθεί η ποσότητα καθαρού νερού από την κυψελίδα, προστίθεται εκ νέου 1ml καθαρού νερού και 5μl από το δείγμα DNA δίνοντας έτσι έναν συντελεστή αραιώσης 200. Το αποτέλεσμα της μέτρησης για την απορρόφηση του αγελαδινού DNA είναι 0.004 και συνεπώς η συγκέντρωση ανέρχεται σε 40ng/μl.

Για να ερευνηθεί λοιπόν η μεταβολή της χωρητικότητας κατά την ανίχνευση του αγελαδινού DNA στόχου δημιουργείται ένα διάλυμα με 150μl καθαρού νερού και 5μl από το δείγμα του αγελαδινού DNA του οποίου η συγκέντρωση προηγουμένως μετρήθηκε. Το διάλυμα αυτό ανακινήθηκε στον Vortex Vibrator για 10 δευτερόλεπτα

και πέρασε από φυγοκέντριση στο Centrifuge Spinning Machine για 20 δευτερόλεπτα. Για τα πειράματα τοποθετήθηκαν πάνω στον εκάστοτε πυκνωτή 30μl του διαλύματος και μετρήθηκε η μεταβολή χωρητικότητας σε διάστημα 4 λεπτών και 30 δευτερολέπτων. Τα πειράματα έγιναν με δώδεκα interdigital πυκνωτές χρυσών ηλεκτροδίων πάνω στους οποίους είχαν ακινητοποιηθεί είτε μόνο COWREV εκκινητές, είτε μόνο COWFORW εκκινητές, είτε COWREV και COWFORW εκκινητές (τέσσερις στην κάθε περίπτωση) όπως αναλύθηκε παραπάνω. Οι μετρήσεις καταγράφηκαν με τη σύνδεση του κυκλώματος μέτρησης χωρητικότητας με φορητό ηλεκτρονικό υπολογιστή και οι μετρήσεις που έγιναν κάθε ένα δευτερόλεπτο καταγράφηκαν μέσω σειριακής επικοινωνίας με το PuTTY που παραμετροποιήθηκε όπως φαίνεται στην εικόνα 39 σε αρχείο .csv.



Σχήμα 39 Παραμετροποίηση PuTTY για ανάγνωση και καταγραφή δεδομένων που προέρχονται από σειριακή επικοινωνία με το κύκλωμα ανάγνωσης που συνδέεται στην θύρα COM3 του φορητού ηλεκτρονικού υπολογιστή

4.3.4 Αρνητικός Έλεγχος

Για τον αρνητικό έλεγχο, δηλαδή την μελέτη της μεταβολής της χωρητικότητας του πυκνωτή σε περίπτωση που δεν τοποθετηθεί πάνω του το DNA στόχος, έγιναν δοκιμές με καθαρό νερό που χρησιμοποιήθηκε και ως διαλύτης του DNA στόχου καθώς και με κατσικίσιο DNA που εξήχθη -όπως και το αγελαδινό- από κατσικίσια γάλατα του εμπορίου.

4.3.4.1 Αρνητικός Έλεγχος με Καθαρό Νερό

Για τον έλεγχο της μεταβολής χωρητικότητας του interdigital πυκνωτή χρυσών ηλεκτροδίων έγινε δοκιμή σε τρεις πυκνωτές στους οποίους είχε ακινητοποιηθεί είτε COWREV εκκινήτης, είτε COWFORW εκκινήτης, είτε και COWREV και COWFORW εκκινήτης (ένας στην κάθε περίπτωση) τοποθετώντας 30μl καθαρού νερού στην επιφάνεια και κάνοντας μετρήσεις για 2 λεπτά καθώς φάνηκε να έχει σταθεροποιηθεί η τιμή της χωρητικότητας. Οι μετρήσεις λαμβάνονταν κάθε ένα δευτερόλεπτο και καταγράφηκαν μέσω του κυκλώματος ανάγνωσης όπως περιγράφηκε και παραπάνω.

4.3.4.2 Αρνητικός Έλεγχος με μη συμπληρωματικό DNA

Για τον έλεγχο της μεταβολής χωρητικότητας του interdigital πυκνωτή χρυσών ηλεκτροδίων έγινε δοκιμή σε έξι πυκνωτές στους οποίους είχε ακινητοποιηθεί είτε COWREV εκκινήτης, είτε COWFORW εκκινήτης, είτε και COWREV και COWFORW εκκινήτης(δύο στην κάθε περίπτωση) χρησιμοποιώντας μη συμπληρωματικό DNA που εξήχθη από δύο διαφορετικά κατσικίσια γάλατα του εμπορίου.

Αρχικά χρειάστηκε να ποσοτικοποιηθούν τα DNA που βρίσκονταν στα συγκεκριμένα δείγματα όπως έγινε και στην περίπτωση του αγελαδινού DNA με χρήση του quartz cuvette και του Spectrophotometer. Αφότου λοιπόν έγινε η ζυγοστάθμιση του Spectrophotometer, προστέθηκε 1ml καθαρού νερού και 5μl από το εκάστοτε DNA δίνοντας συντελεστή αραιώσης 200. Η απορρόφηση που προέκυψε από τις δύο μετρήσεις ήταν για το πρώτο 0.019 και για το δεύτερο 0.005 και άρα οι ζητούμενες συγκεντρώσεις ήταν 190 ng/μl και 50ng/μl αντίστοιχα. Ακολούθως δημιουργήθηκαν δύο διαλύματα DNA. Για το πρώτο προστέθηκαν 3μl από το πρώτο δείγμα DNA σε 570μl καθαρού νερού και για το δεύτερο 6μl από το δεύτερο δείγμα DNA σε 300 μl καθαρού νερού προκειμένου να επιτευχθεί συγκέντρωση DNA 1ng/μl διαλύματος αντίστοιχη με αυτή της δοκιμής με το αγελαδινό DNA. Κάθε διάλυμα μη συμπληρωματικού DNA που δημιουργήθηκε, ανακινήθηκε με Vortex Vibrator για 10 δευτερόλεπτα και πέρασε από φυγοκέντρωση στο Centrifuge Spinning Machine για 20 δευτερόλεπτα. Σε κάθε πυκνωτή από τους προαναφερθέντες προστέθηκαν 30μl από το διάλυμα στη χρυσή επιφάνεια και πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις χωρητικότητας με το κύκλωμα ανάγνωσης για 4 λεπτά και 30 δευτερόλεπτα, οι οποίες

καταγράφηκαν όπως περιγράφηκε παραπάνω κάθε ένα δευτερόλεπτο με σειριακή σύνδεση με φορητό ηλεκτρονικό υπολογιστή.

4.3.5 Προσδιορισμός Ορίου Ανίχνευσης

Για τον προσδιορισμό του ορίου ανίχνευσης του αισθητήρα έγιναν δοκιμές σε 24 πυκνωτές στους οποίους είχε ακινητοποιηθεί είτε COWREV εκκινήτης, είτε COWFORW εκκινήτης, είτε και COWREV και COWFORW εκκινήτης με διαλύματα χαμηλότερων συγκεντρώσεων του αγελαδινού DNA (δύο πυκνωτές για την κάθε περίπτωση ακινητοποίησης και κάθε αραιωμένο διάλυμα). Συγκεκριμένα, δημιουργήθηκαν τέσσερα διαλύματα με 5μl από το δείγμα αγελαδινού DNA και 300μl, 600μl, 1200μl και 2400μl καθαρού νερού αντίστοιχα και συνεπώς συγκεντρώσεις 0.667, 0.333, 0.167 και 0.083 ng/μl αντίστοιχα. Το καθένα από τα διαλύματα που δημιουργήθηκε ανακινήθηκε με Vortex Vibrator για 10 δευτερόλεπτα και πέρασε από φυγοκέντριση στο Centrifuge Spinning Machine για 20 δευτερόλεπτα. Σε κάθε πυκνωτή από τους προαναφερθέντες προστέθηκαν 30μl από το διάλυμα στη χρυσή επιφάνεια και πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις χωρητικότητας με το κύκλωμα ανάγνωσης για 4 λεπτά και 30 δευτερόλεπτα, οι οποίες καταγράφηκαν όπως περιγράφηκε παραπάνω κάθε ένα δευτερόλεπτο με σειριακή σύνδεση με φορητό ηλεκτρονικό υπολογιστή.

4.3.6 Μελέτη για τη Διάρκεια Ζωής του Αισθητήρα

Για τον προσδιορισμό της διάρκειας ζωής του αισθητήρα έγιναν δοκιμές σε έξι πυκνωτές στους οποίους είχε ακινητοποιηθεί είτε COWREV εκκινήτης, είτε COWFORW εκκινήτης, είτε και COWREV και COWFORW εκκινήτης (δύο σε κάθε περίπτωση) σε διάστημα πέντε ημερών φύλαξης τους στους +4°C. Σε κάθε πυκνωτή προστέθηκαν στη χρυσή επιφάνεια 30μl διαλύματος διαφορετικής συγκέντρωσης. Πιο αναλυτικά, στους πυκνωτές που είχαν ετοιμαστεί με COWFORW-COWREV εκκινήτες προστέθηκε διάλυμα που περιείχε 5μl από το δείγμα του αγελαδινού DNA και 150μl καθαρού νερού, δηλαδή συγκέντρωση 1.333ng/μl DNA, στους πυκνωτές που είχαν ετοιμαστεί με COWREV εκκινήτη προστέθηκε διάλυμα που περιείχε 5μl από το δείγμα του αγελαδινού DNA και 300μl καθαρού νερού, δηλαδή συγκέντρωση 0.667ng/μl DNA και στους πυκνωτές που είχαν ετοιμαστεί με COWFORW εκκινήτη προστέθηκε διάλυμα που περιείχε 5μl από το δείγμα του αγελαδινού DNA και 600μl

καθαρού νερού, δηλαδή συγκέντρωση 0.333ng/μl DNA. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν κάθε ένα δευτερόλεπτο για συνολικό διάστημα 4:30 λεπτών και καταγράφηκαν με σειριακή σύνδεση του κυκλώματος ανάγνωσης με φορητό ηλεκτρονικό υπολογιστή.

4.3.7 Μελέτη για την Δυνατότητα Επαναχρησιμοποίησης του Αισθητήρα

Για τον μελέτη της δυνατότητας επαναχρησιμοποίησης του αισθητήρα έγιναν δοκιμές σε έξι πυκνωτές στους οποίους είχε ακινητοποιηθεί είτε COWREV εκκινητής, είτε COWFORW εκκινητής, είτε και COWREV και COWFORW εκκινητής (δύο στην κάθε περίπτωση) και οι οποίοι είχαν ήδη χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση αγελαδινού DNA. Αφότου χρησιμοποιήθηκαν με τη διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω, τοποθετήθηκαν σε 2ml PBS για 10 λεπτά προκειμένου να γίνει πλύση του DNA που είχε προσκολληθεί στην επιφάνειά τους λόγω υβριδισμού και επανατοποθετήθηκαν στο διάλυμα PBS-εκκινητή στο οποίο βρίσκονταν και πριν τη δοκιμή. Στη συνέχεια αποθηκεύτηκαν για 15-20 ώρες στους +4°C. Η διαδικασία με την οποία ελέγχθηκε η δυνατότητά τους να ανιχνεύσουν εκ νέου το DNA στόχο είναι η ίδια που θα γινόταν εάν δεν είχαν ξαναχρησιμοποιηθεί.

5. Αποτελέσματα και Συζήτηση

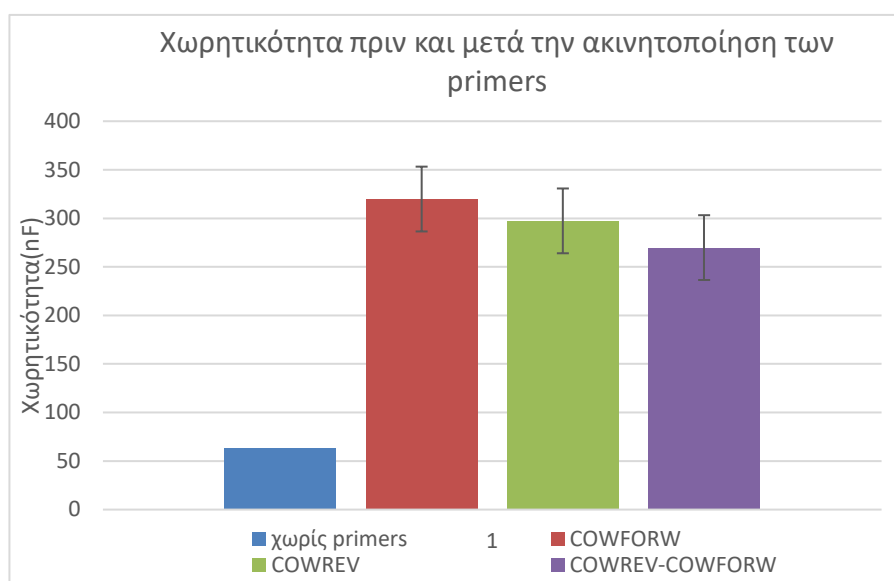
Ο βιοαισθητήρας interdigital χρυσών ηλεκτροδίων που αναπτύχθηκε στη συγκεκριμένη εργασία, βασίζει τη λειτουργία του στον υβριδισμό μεταξύ των ακινητοποιημένων στην επιφάνειά του εκκινητών και του αγελαδινού DNA στόχου. Για την μελέτη της λειτουργίας του έγιναν όλες οι προαναφερθείσες μετρήσεις κατά τις οποίες, όπως αναλύθηκε, αναμένεται να παρατηρηθεί αύξηση της χωρητικότητας μετά την ακινητοποίηση των εκκινητών στην επιφάνεια των πυκνωτών λόγω των ομοιοπολικών δεσμών θείου-χρυσού και μείωση της χωρητικότητας του πυκνωτή μετά την αντίδραση συγγένειας, δηλαδή τον υβριδισμό των εκκινητών με την αλληλουχία του αγελαδινού DNA στόχου.

Αρχικά στον πίνακα 1, φαίνονται το πως μεταβλήθηκε η χωρητικότητα 36 πυκνωτών μετά την ακινητοποίηση είτε COWFORW, είτε COWREV, είτε COWREV και COWFORW εκκινητών (12 στην κάθε περίπτωση) , καθώς και η μέση τιμή της τελικής χωρητικότητας και η τυπική απόκλιση αυτής σε κάθε περίπτωση και η μέση τιμή του ποσοστού(%) της τελικής χωρητικότητας σε σχέση με την αρχική ($C_{\text{τελ}}/C_{\text{αρχ}}$).

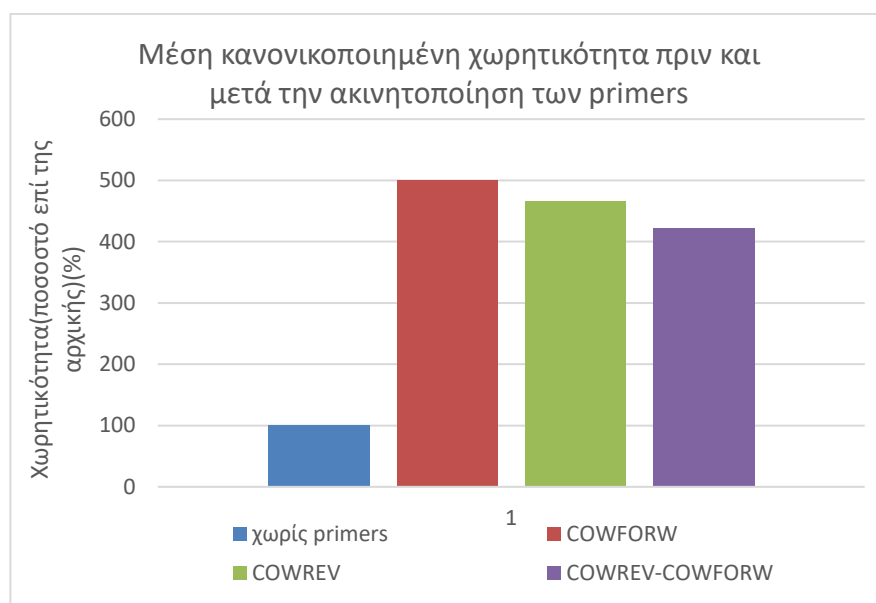
	C(nF) με COWFORW	C(nF) με COWREV	C(nF) με COWFORW και COWREV
1	355.268	266.667	299.222
2	336.736	275.833	247.509
3	347.456	258.333	254.132
4	337.514	222.514	248.166
5	348.551	331.256	241.947
6	270.751	369.17	260.751
7	258.423	369.232	280.444
8	289.334	337.594	303.409
9	302.567	289.009	270.998
10	312.244	345.221	263.344
11	356.332	245.551	306.313
12	322.915	257.921	261.776
Μέση τιμή	319.841	297.358	269.834
Μέση τιμή $C_{\text{αφτ}}/C_{\text{πρτ}}$ (%)	500.534	465.35	422.276
Τυπική απόκλιση	33.371	50.651	22.598

Πίνακας 1: Συγκεντρωτικός πίνακας Μεταβολής Χωρητικότητας μετά την ακινητοποίηση των εκκινητών

Στις εικόνες 40 και 41 παρουσιάζεται και η σημαντικά η μέση τιμή της τελικής χωρητικότητας σε σχέση με την αρχική τόσο σε κανονικές όσο και σε κανονικοποιημένες τιμές αντίστοιχα.



Σχήμα 40 Τιμή μέσης χωρητικότητας πριν και μετά την ακινητοποίηση των εκκινητών

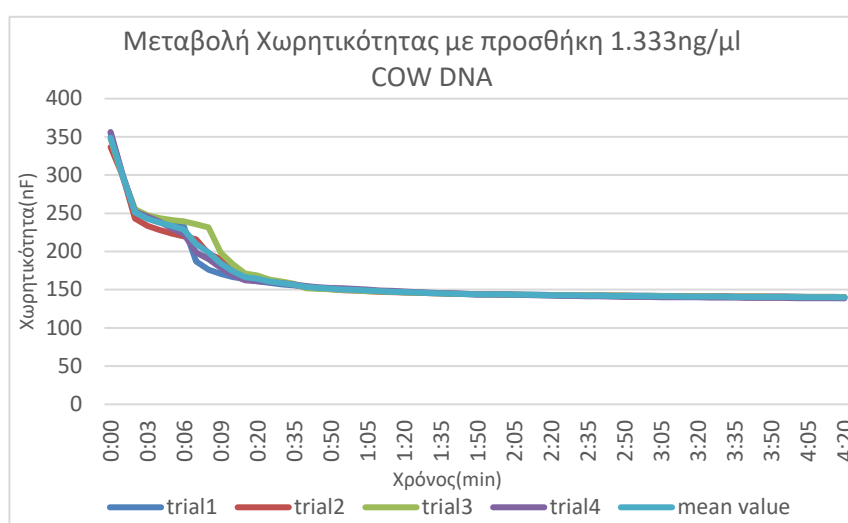


Σχήμα 41 Τιμή μέσης κανονικοποιημένης χωρητικότητας πριν και μετά την ακινητοποίηση των εκκινητών

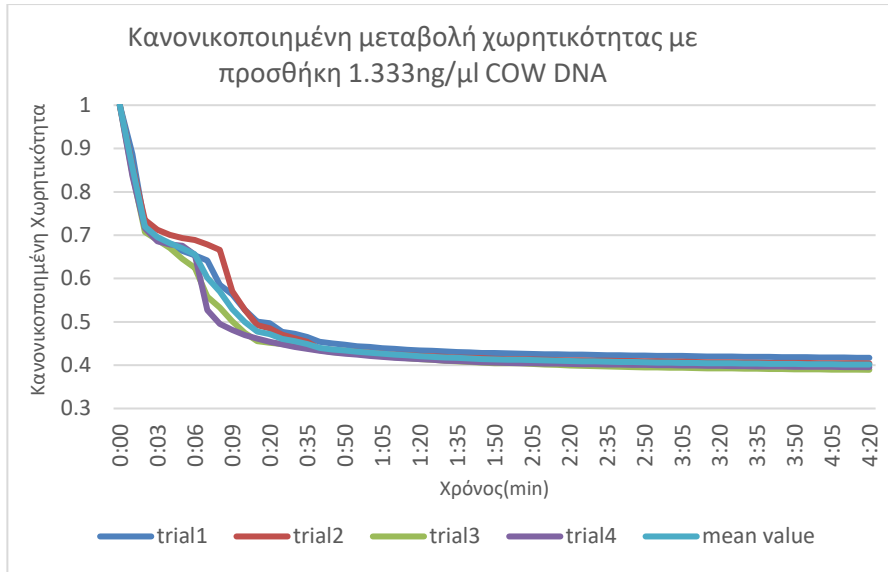
Φαίνεται λοιπόν πως πράγματι με αυτή τη μέθοδο, επιτυγχάνεται σημαντικότερη αλλαγή της χωρητικότητας σε σχέση με την πάροδο 1-3 ώρες με 30μl εκκινητή στην επιφάνεια του πυκνωτή καθώς η μέση τιμή του ποσοστού της τελικής χωρητικότητας προς την αρχική για κάθε τύπου εκκινητή που ακινητοποιείται στην επιφάνεια του πυκνωτή είναι 462.72%.

Επειδή όπως παρατηρούμε υπάρχει διακύμανση στη μέση τιμή της χωρητικότητας περίπου 78nF, προκειμένου να γίνει καλύτερα η σύγκριση μεταξύ των αποκρίσεων των πυκνωτών χρησιμοποιούνται οι κανονικοποιημένες τιμές των χωρητικότητων δηλαδή οι λόγοι $C_{τελ}/C_{αρχ}$.

Όσον αφορά τα πειράματα για την ανίχνευση του αγελαδινού DNA, η διαδικασία ξεκίνησε από το διάλυμα που περιείχε 5μl από το δείγμα αγελαδινού DNA συγκέντρωσης 40ng/μl και 150μl καθαρό νερό, καταλήγοντας έτσι σε μία συγκέντρωση DNA στο υπό εξέταση δείγμα 1.333ng/μl. Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν παρουσιάζονται στα σχήματα 42-44 τόσο για τις κανονικές όσο και για τις κανονικοποιημένες τιμές της χωρητικότητας για πυκνωτές στους οποίους ακινητοποιήθηκαν μόνο COWREV, είτε μόνο COWFORW, είτε COWREV και COWFORW εκκινητές. Στο συγκεκριμένο πείραμα έγιναν τέσσερις δοκιμές για κάθε τύπου ακινητοποίηση και είναι φανερό ιδίως στα διαγράμματα κανονικοποιημένης μεταβολής της χωρητικότητας ότι η μεταβολή που υπέστησαν οι πυκνωτές στη χωρητικότητά τους είναι πολύ κοντινή. Από το διάγραμμα του σχήματος 45 όπου αναπαρίσταται η μέση κανονικοποιημένη μεταβολή της χωρητικότητας και για τους τρεις τύπους ακινητοποίησης μαζί, παρατηρούμε ότι η τελική τιμή της χωρητικότητας ανέρχεται κατά μέσο όρο περίπου στο 40% της αρχικής, ενώ και οι τρεις τύποι ακινητοποίησης δίνουν παρόμοια αποτελέσματα.

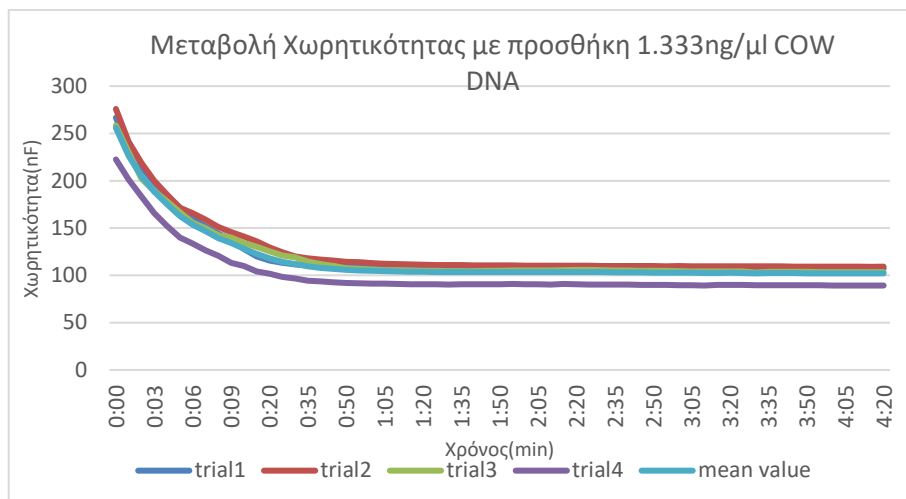


(a)

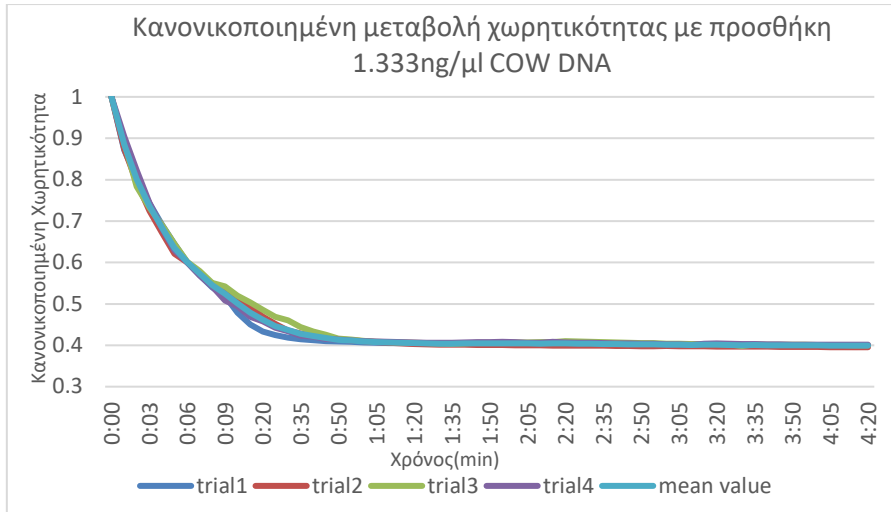


(b)

Σχήμα 42 (a) Μεταβολή Χωρητικότητας,(b) Κανονικοποιημένη Μεταβολή Χωρητικότητας πυκνωτών με ακινητοποιημένο COWFORW εκκινητή με προσθήκη διαλύματος με συγκέντρωση 1.333ng/μl COW DNA

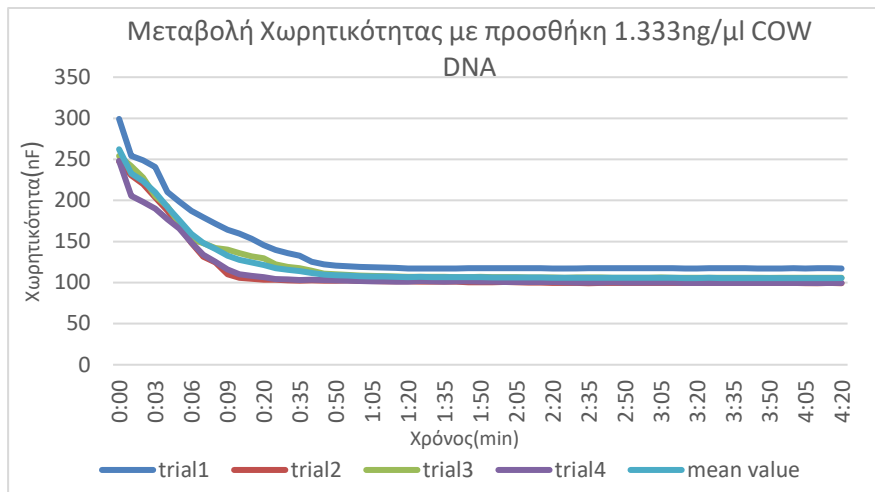


(a)

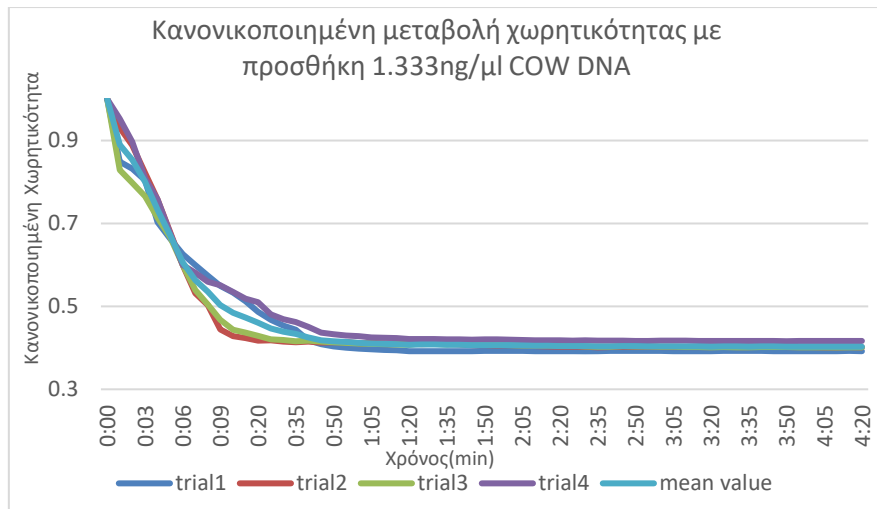


(b)

Σχήμα 43 (α) Μεταβολή Χωρητικότητας, (b) Κανονικοποιημένη Μεταβολή Χωρητικότητας πικνωτών με ακινητοποιημένο COWREV εκκινητή με προσθήκη διαλύματος με συγκέντρωση 1.333ng/μl COW DNA

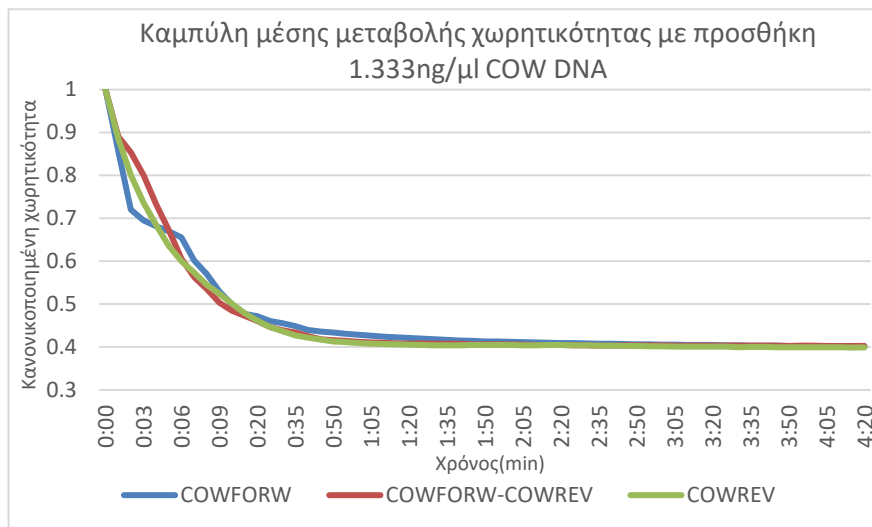


(a)



(b)

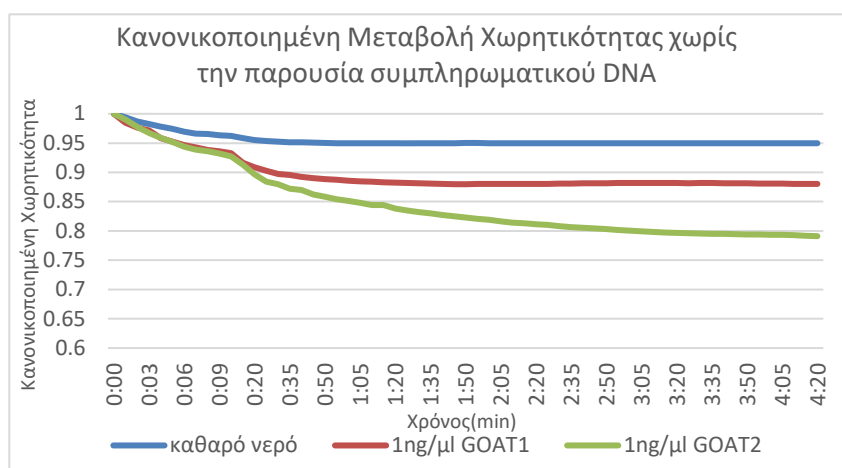
Σχήμα 44 (α) Μεταβολή Χωρητικότητας, (b) Κανονικοποιημένη Μεταβολή Χωρητικότητας πυκνωτών με ακινητοποιημένο COWREV-COWFORW εκκινητή με προσθήκη διαλύματος με συγκέντρωση 1.333ng/μl COW DNA



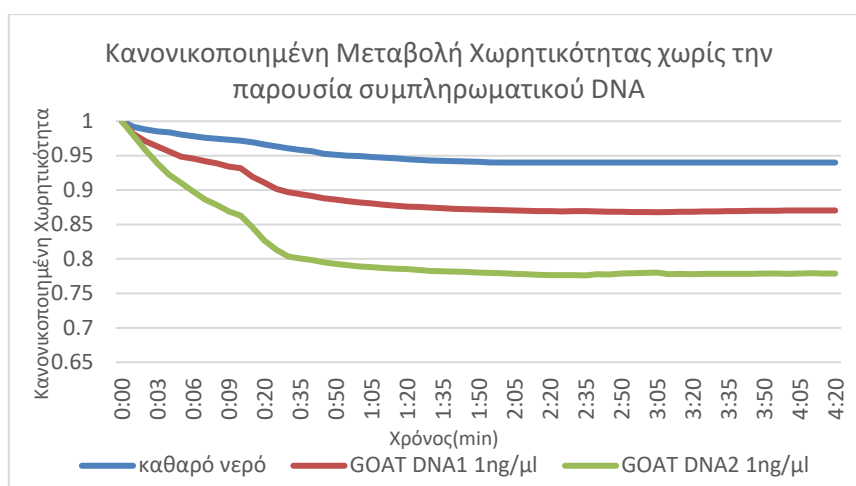
Σχήμα 45 Συγκεντρωτικό διάγραμμα Κανονικοποιημένης Μεταβολής Χωρητικότητας πυκνωτών με ακινητοποιημένο α) COWFORW (μπλε), β) COWREV-COWFORW (κόκκινο) και γ) COWREV (πράσινο) εκκινητή με προσθήκη διαλύματος με συγκέντρωση 1.333ng/μl COW DNA

Στη συνέχεια ακολούθησε ο αρνητικός έλεγχος με σκέτο τον διαλύτη του DNA που χρησιμοποιήθηκε στις δοκιμές, δηλαδή το καθαρό νερό, καθώς και με καταικίσιο DNA από δύο διαφορετικές πηγές γάλακτος του εμπορίου. Κάτι τέτοιο, είναι

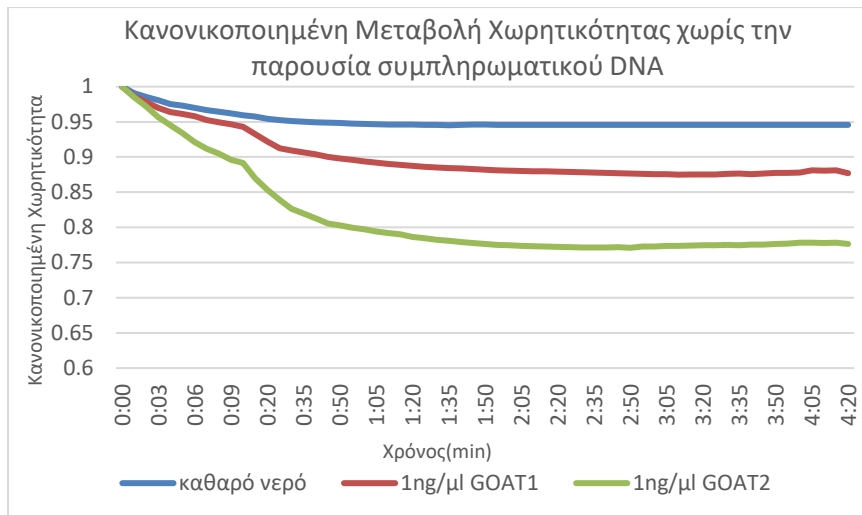
απαραίτητο προκειμένου να είναι προς αξιολόγηση η μεταβολή της χωρητικότητας παρουσία του αγελαδινού DNA στόχου και ο προσδιορισμός του ορίου ανίχνευσης.



Σχήμα 46 Κανονικοποιημένη Μεταβολή Χωρητικότητας πυκνωτών με ακινητοποιημένο COWFORW εκκινητή με προσθήκη 30μl α)καθαρού νερού(μπλε), β)πρώτου διαλύματος GOAT DNA συγκέντρωσης 1ng/μl(κόκκινο) και γ)δεύτερου διαλύματος GOAT DNA συγκέντρωσης 1ng/μl(πράσινο)



Σχήμα 47 Κανονικοποιημένη Μεταβολή Χωρητικότητας πυκνωτών με ακινητοποιημένο COWREV εκκινητή με προσθήκη 30μl α)καθαρού νερού(μπλε), β)πρώτου διαλύματος GOAT DNA συγκέντρωσης 1ng/μl(κόκκινο) και γ)δεύτερου διαλύματος GOAT DNA συγκέντρωσης 1ng/μl(πράσινο)

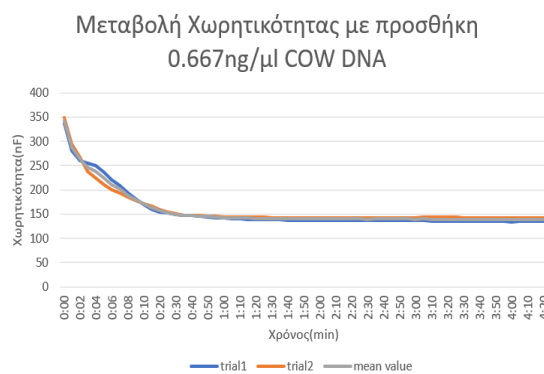


Σχήμα 48 Κανονικοποιημένη Μεταβολή Χωρητικότητας πυκνωτών με ακινητοποιημένο COWREV-COWFORW εκκινητή με προσθήκη 30μl α)καθαρού νερού(μπλε), β)πρώτου διαλύματος GOAT DNA συγκέντρωσης 1ng/μl(κόκκινο) και γ)δεύτερου διαλύματος GOAT DNA συγκέντρωσης 1ng/μl(πράσινο)

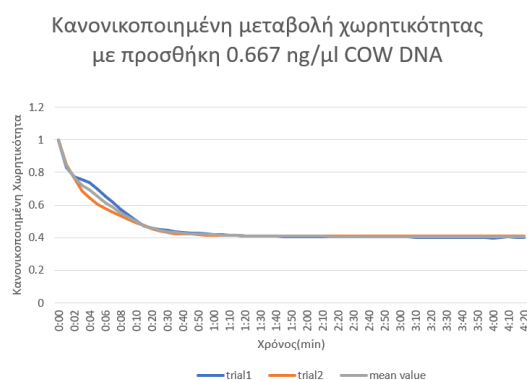
Όπως φαίνεται και στα σχήματα 46-48 και για τις τρεις περιπτώσεις ακινητοποίησης, η μέγιστη μεταβολή συμβαίνει για το δεύτερο διάλυμα με κατσίκισιο DNA συγκέντρωσης 1ng/μl και η χωρητικότητα στη χειρότερη περίπτωση φτάνει το 77.15% της αρχικής της τιμής. Κάτι τέτοιο μπορεί να οφείλεται και στους αυτοϋβριδισμούς που συμβαίνει στην αλυσίδα DNA των εκκινητών και πρόκειται για πολύ μικρότερη και διακριτή αλλαγή σε σχέση με αυτή που προκύπτει έπειτα από υβριδισμό με το DNA στόχο.

Στη συνέχεια έγιναν τα πειράματα για τον προσδιορισμό του ορίου ανίχνευσης, χρησιμοποιώντας διαλύματα αγελαδινού DNA σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις και ελήφθησαν τα αποτελέσματα που φαίνονται στα σχήματα.

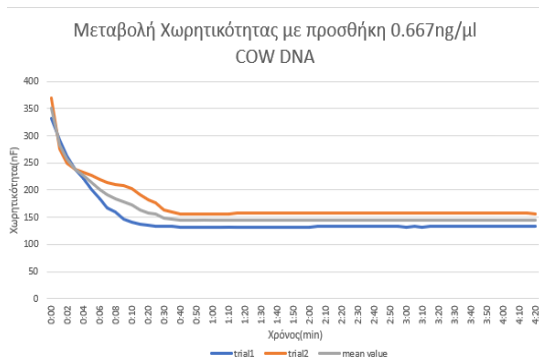
- Διάλυμα συγκέντρωσης 0.667ng/μl COW DNA



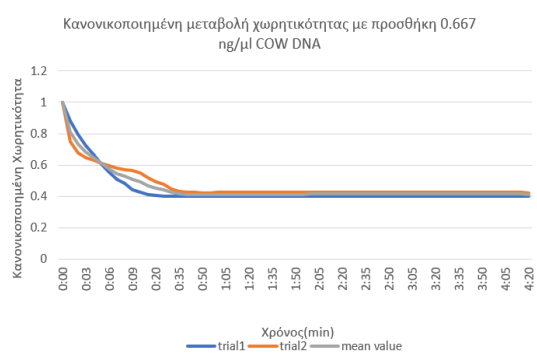
(a)



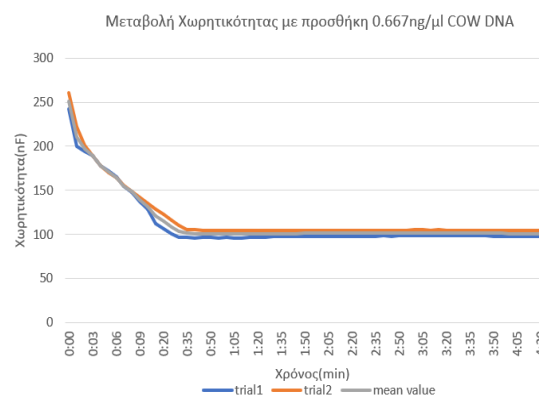
(b)



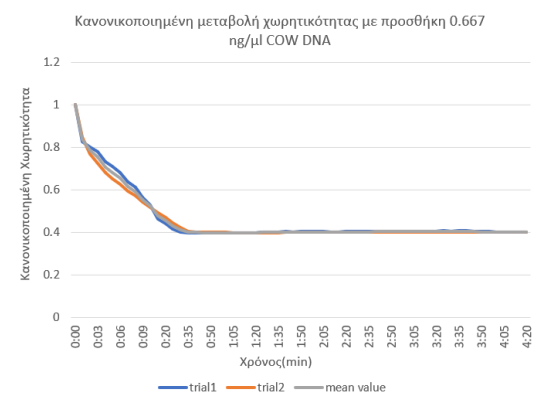
(c)



(d)

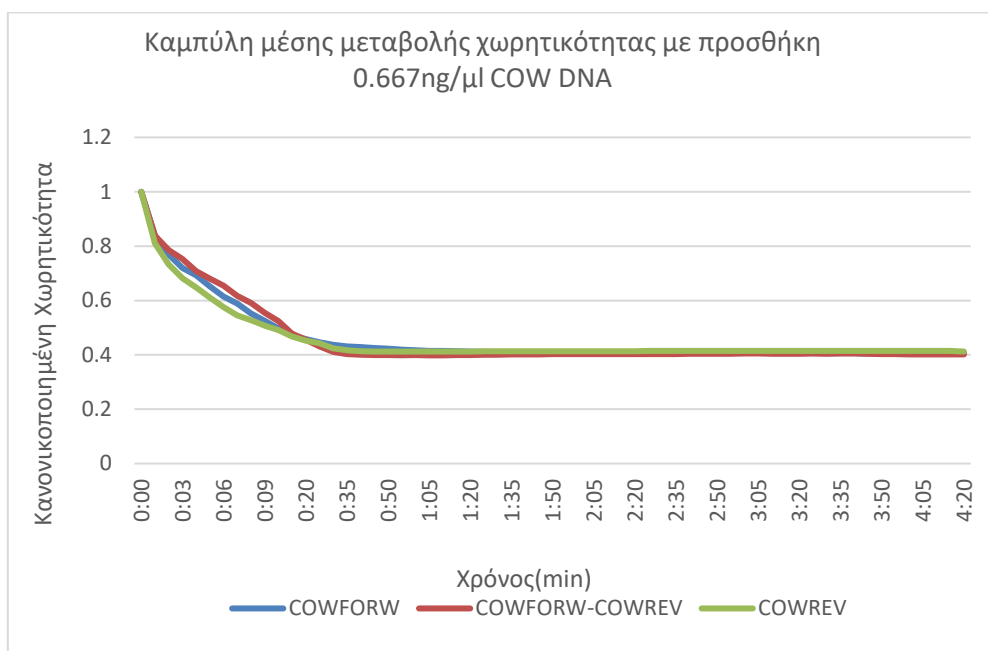


(e)



(f)

Σχήμα 49 ((a),(c),(e)) Μεταβολή Χωρητικότητας,((b),(d),(f)) Κανονικοποιημένη Μεταβολή Χωρητικότητας πυκνωτών με ακινητοποιημένο ((a),(b)) COWFORW, ((c),(d)) COWREV, ((e),(f)) COWFORW-COWREV εκκινήτη με προσθήκη διαλύματος με συγκέντρωση 0.667ng/μl COW DNA

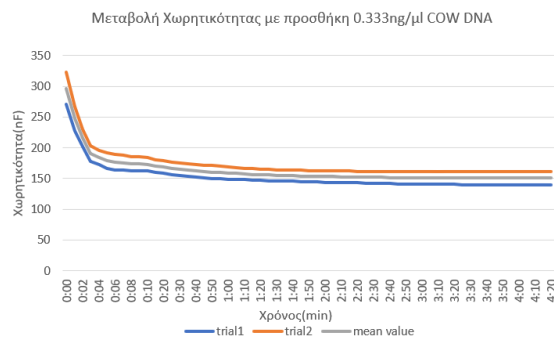


Σχήμα 50 Συγκεντρωτικό Διάγραμμα Κανονικοποιημένης Μεταβολής Χωρητικότητας πυκνωτών με ακινητοποιημένο α)COWFORW(μπλε), β) COWREV-COWFORW(κόκκινο) και γ)

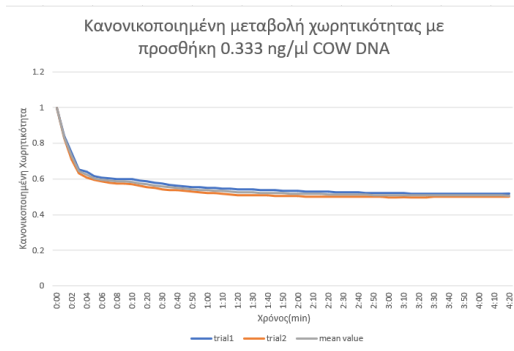
COWREV(πράσινο) εκκινητή με προσθήκη διαλύματος με συγκέντρωση 0.667ng/μl COW DNA

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι οι πυκνωτές, ανεξαρτήτως του εκκινητή ο οποίος έχει ακινητοποιηθεί στην επιφάνειά τους, δείχνουν παρόμοια συμπεριφορά με την προσθήκη 30μl του διαλύματος συγκέντρωσης 0.667ng/μl COW DNA και η τελική χωρητικότητά τους ανέρχεται περίπου στο 40% της αρχικής τιμής της, ενώ ιδίως μετά το πρώτο λεπτό από την εναπόθεση του διαλύματος DNA η τελική τιμή της χωρητικότητας παραμένει σχετικά σταθερή.

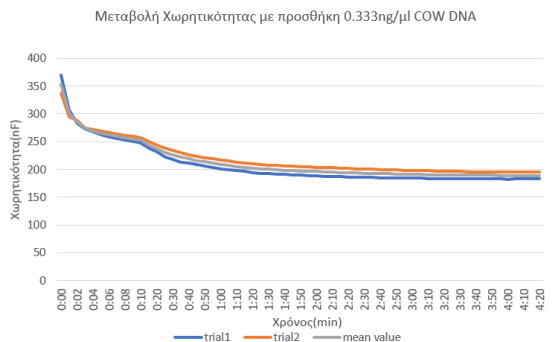
- Διάλυμα συγκέντρωσης 0.333ng/μl COW DNA



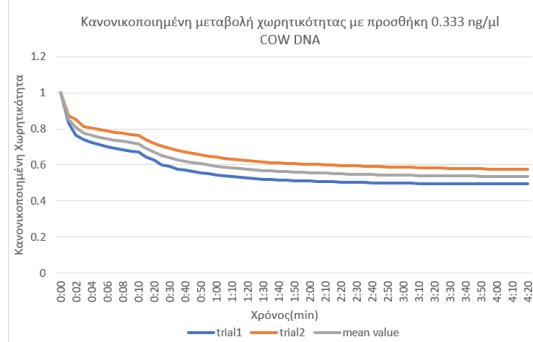
(a)



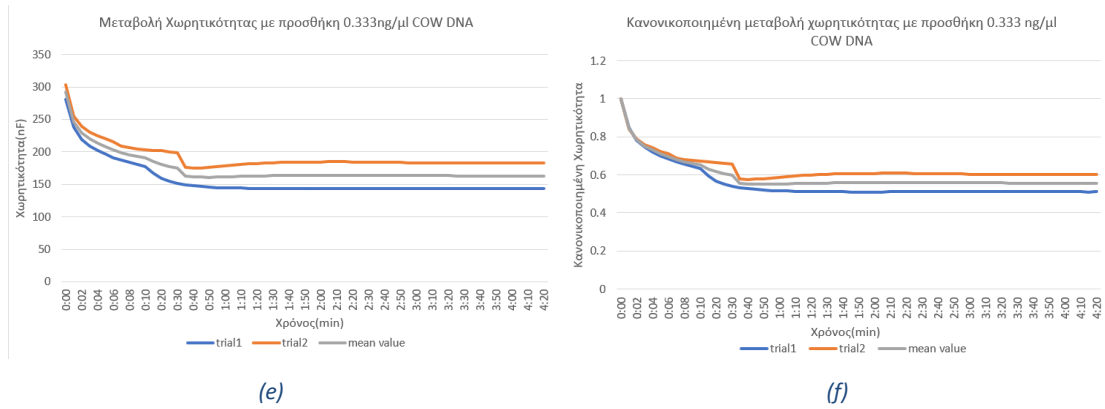
(b)



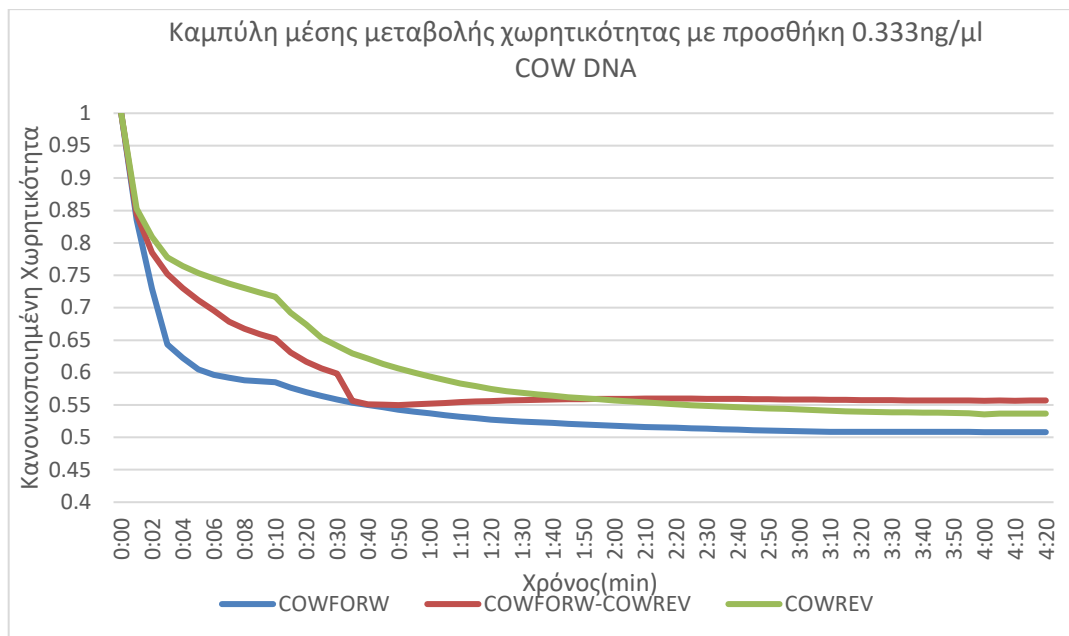
(c)



(d)



Σχήμα 51 ((a),(c),(e)) Μεταβολή Χωρητικότητας, ((b),(d),(f)) Κανονικοποιημένη Μεταβολή Χωρητικότητας πυκνωτών με ακινητοποιημένο ((a),(b)) COWFORW, ((c),(d)) COWREV, ((e),(f)) COWFORW-COWREV εκκινητή με προσθήκη διαλύματος με συγκέντρωση 0.333ng/μl COW DNA

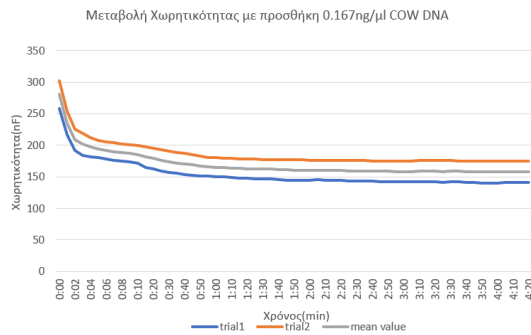


Σχήμα 52 Συγκεντρωτικό Διάγραμμα Κανονικοποιημένης Μεταβολής Χωρητικότητας πυκνωτών με ακινητοποιημένο α)COWFORW(μπλε),β) COWREV-COWFORW(κόκκινο) και γ) COWREV(πράσινο) εκκινητή με προσθήκη διαλύματος με συγκέντρωση 0.333ng/μl COW DNA

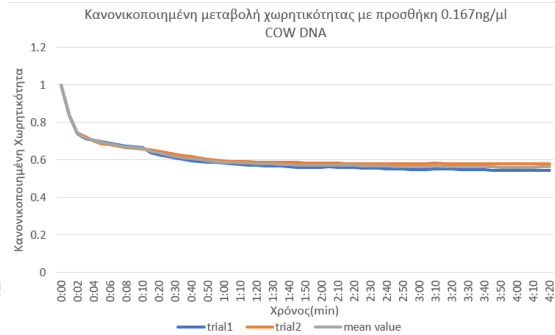
Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι οι πυκνωτές, ανεξαρτήτως του εκκινητή ο οποίος έχει ακινητοποιηθεί στην επιφάνειά τους, δείχνουν παρόμοια συμπεριφορά με την προσθήκη 30μl του διαλύματος συγκέντρωσης 0.333ng/μl COW DNA ωστόσο με μεγαλύτερη διαφορά σε σχέση με τις δύο προηγούμενες δοκιμές. Η τελική χωρητικότητά τους ανέρχεται περίπου στο 50-55% της αρχικής τιμής της, ενώ ιδίως

μετά το δεύτερο λεπτό από την εναπόθεση του διαλύματος DNA η τελική τιμή της χωρητικότητας παραμένει σχετικά σταθερή.

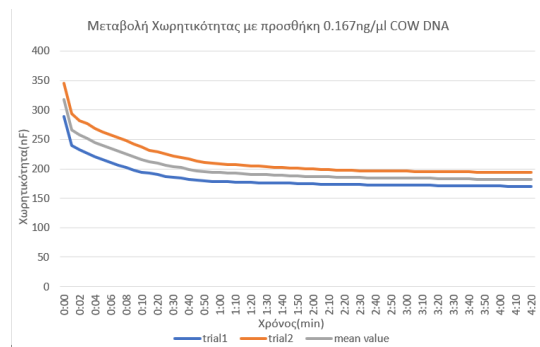
- Διάλυμα συγκέντρωσης 0.167ng/μl COW DNA



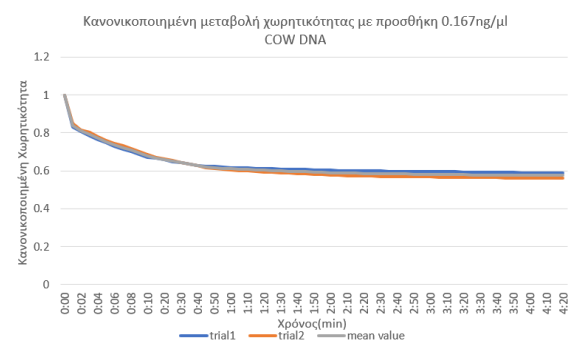
(a)



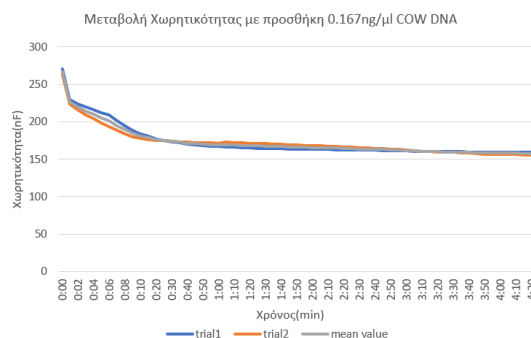
(b)



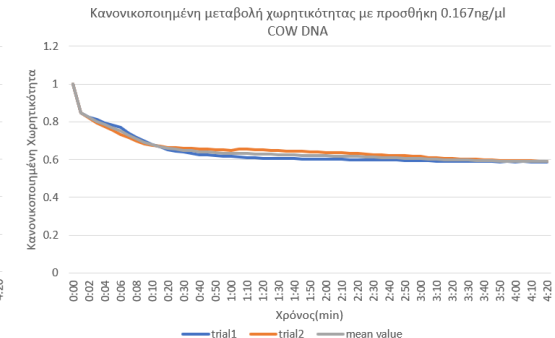
(c)



(d)

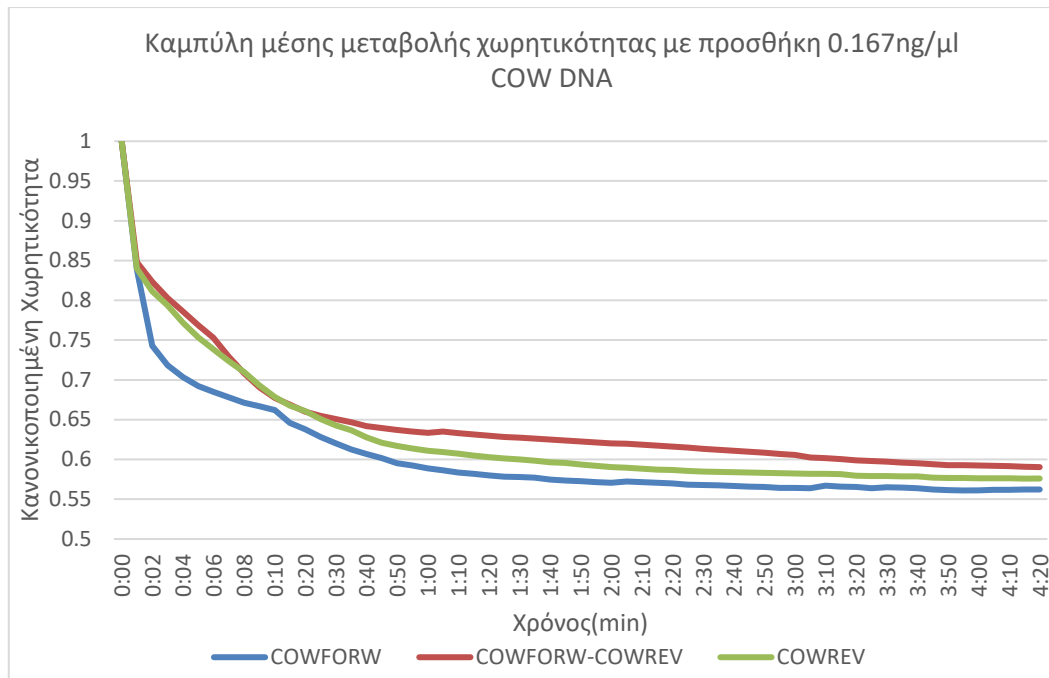


(e)



(f)

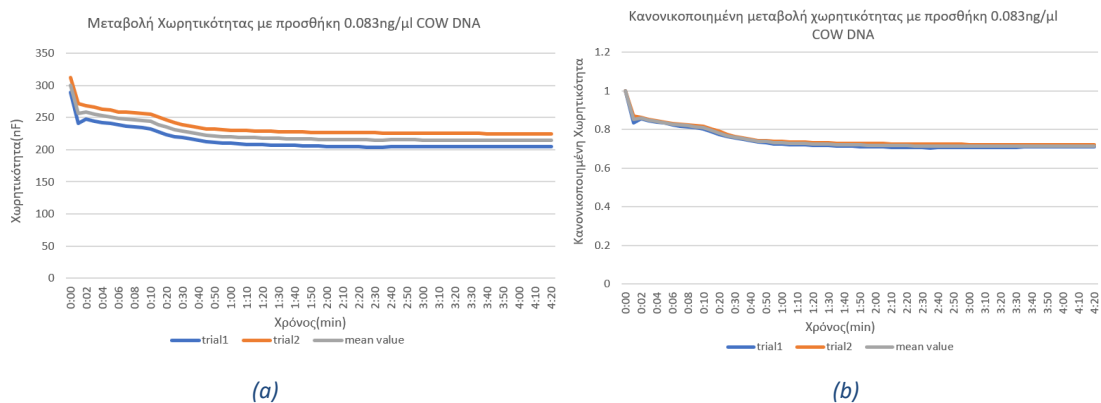
Σχήμα 53 ((a),(c),(e)) Μεταβολή Χωρητικότητα, ((b),(d),(f)) Κανονικοποιημένη Μεταβολή Χωρητικότητα πυκνωτών με ακινητοποιημένο ((a),(b)) COWFORW, ((c),(d)) COWREV, ((e),(f)) COWFORW-COWREV εκκινητή με προσθήκη διαλύματος με συγκέντρωση 0.167ng/μl COW DNA

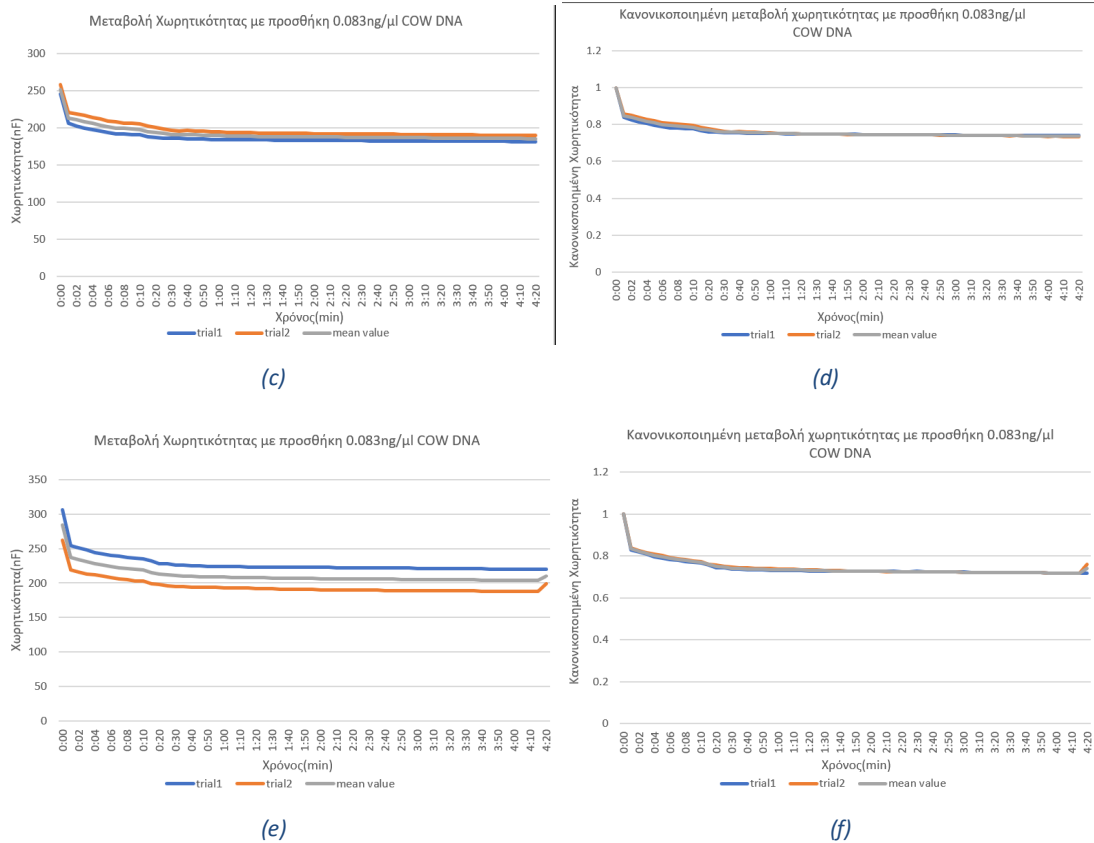


Σχήμα 54 Συγκεντρωτικό Διάγραμμα Κανονικοποιημένης Μεταβολής Χωρητικότητας πυκνωτών με ακινητοποιημένο α) COWFORW (μπλε), β) COWREV-COWFORW (κόκκινο) και γ) COWREV (πράσινο) εκκινητή με προσθήκη διαλύματος με συγκέντρωση 0.167ng/μl COW DNA

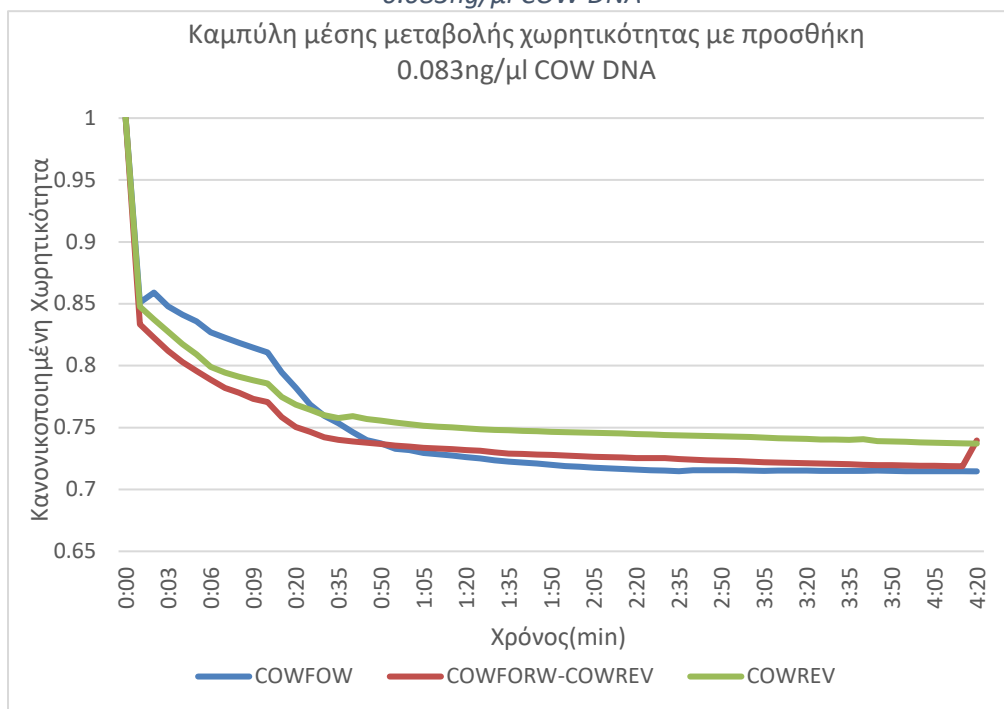
Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι οι πυκνωτές, ανεξαρτήτως του εκκινητή ο οποίος έχει ακινητοποιηθεί στην επιφάνειά τους, δείχνουν παρόμοια συμπεριφορά με την προσθήκη 30μl του διαλύματος συγκέντρωσης 0.167ng/μl COW DNA ωστόσο με μεγαλύτερη διαφορά σε σχέση με τις δύο πρώτες δοκιμές. Η τελική χωρητικότητα τους ανέρχεται περίπου στο 56-60% της αρχικής τιμής της. Η σταθεροποίηση της τελικής τιμής συμβαίνει συνήθως μετά το 3^ο λεπτό αλλά παρατηρείται ότι σε σχέση με τις προηγούμενες δοκιμές έχουμε μεγαλύτερη διακύμανση στην τελική τιμή.

- Διάλυμα συγκέντρωσης 0.083ng/μl COW DNA





Σχήμα 55 ((a),(c),(e)) Μεταβολή Χωρητικότητας, ((b),(d),(f)) Κανονικοποιημένη Μεταβολή Χωρητικότητας πυκνωτών με ακινητοποιημένο ((a),(b)) COWFORW, ((c),(d)) COWREV, ((e),(f)) COWFORW-COWREV εκκινητή με προσθήκη διαλύματος με συγκέντρωση 0.083ng/μl COW DNA

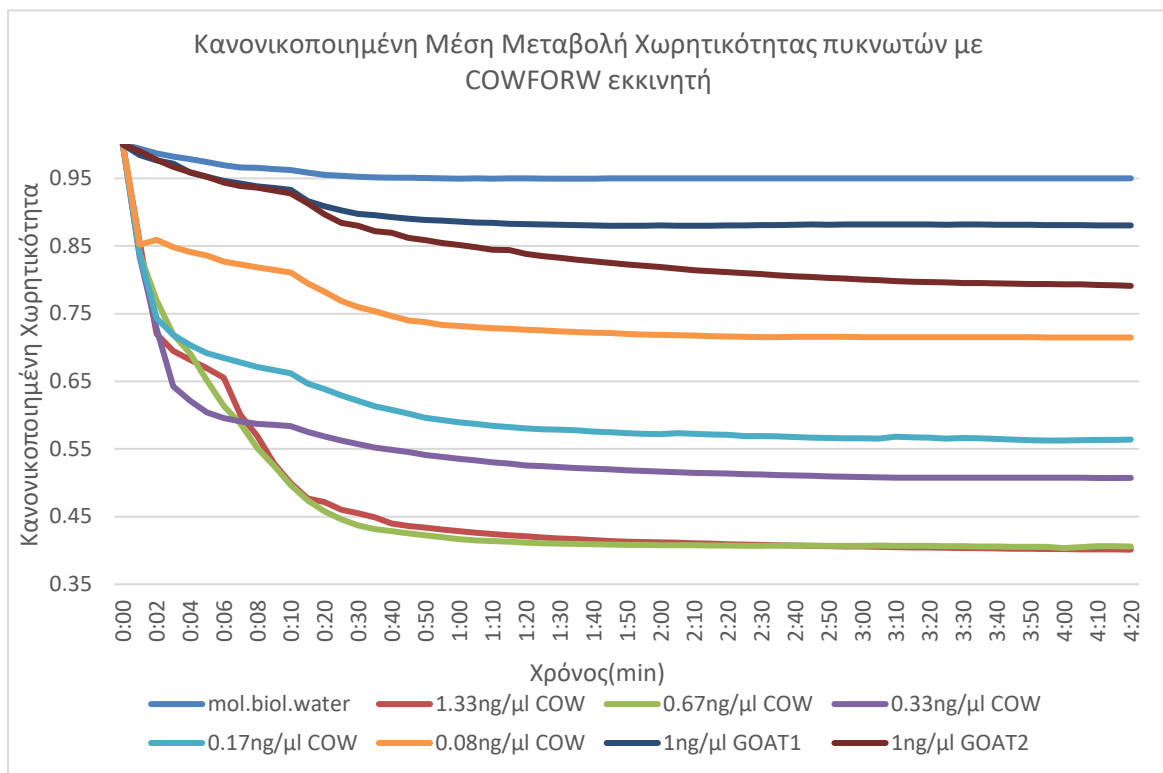


Σχήμα 56 Συγκεντρωτικό Διάγραμμα Κανονικοποιημένης Μεταβολής Χωρητικότητας πυκνωτών με ακινητοποιημένο α)COWFORW(μπλε), β) COWREV-COWFORW(κόκκινο) και γ)

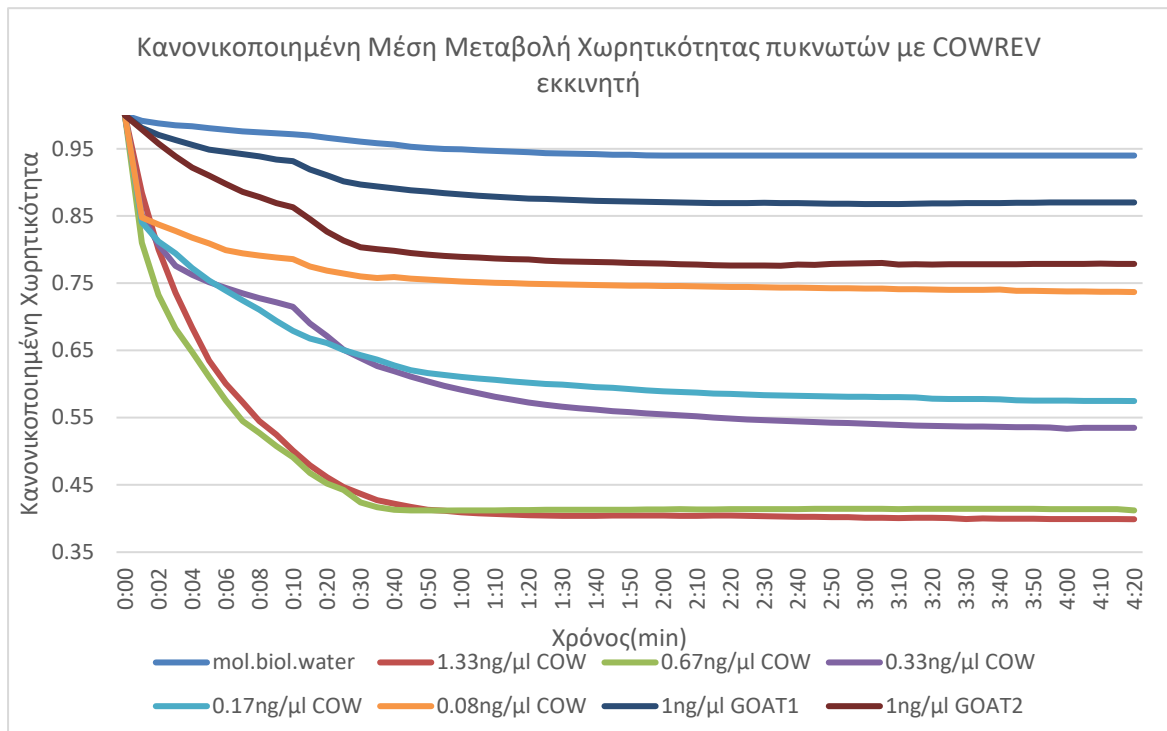
COWREV(πράσινο) εκκινητή με προσθήκη διαλύματος με συγκέντρωση 0.083ng/μl COW DNA

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι οι πυκνωτές, ανεξαρτήτως του εκκινητή ο οποίος έχει ακινητοποιηθεί στην επιφάνειά τους, δείχνουν παρόμοια συμπεριφορά με την προσθήκη 30μl του διαλύματος συγκέντρωσης 0.083ng/μl COW DNA. Η τελική χωρητικότητά τους ανέρχεται περίπου στο 72-75% της αρχικής τιμής της που είναι σχετικά κοντά στη μεταβολή της χωρητικότητας με την προσθήκη μη συμπληρωματικού DNA γι' αυτό το λόγο και το πείραμα σταμάτησε σε αυτή τη συγκέντρωση. Η σταθεροποίηση της τελικής τιμής συμβαίνει συνήθως μετά το 3^ο λεπτό.

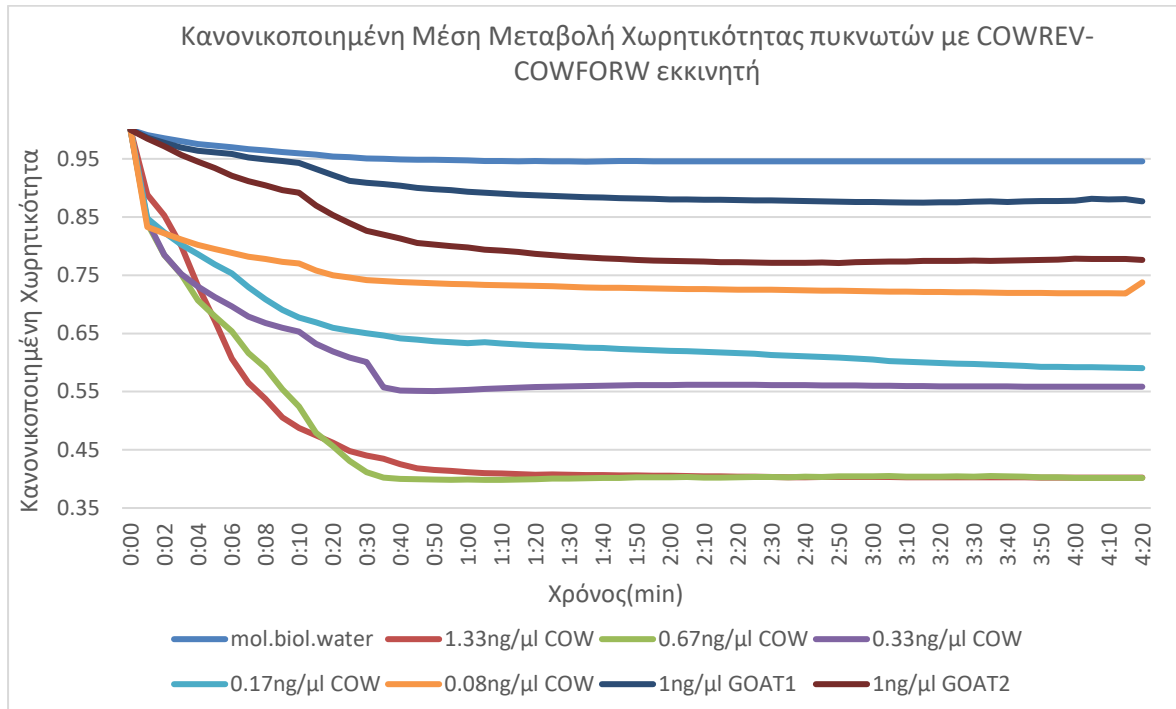
Ακολουθούν συγκεντρωτικά διαγράμματα όπου αναπαρίσταται συγχρόνως η μέση κανονικοποιημένη μεταβολή της χωρητικότητας κατά την προσθήκη 30μl από τις ουσίες αρνητικού ελέγχου (καθαρό νερό, κατακίσιο DNA δύο διαφορετικών πηγών του εμπορίου) και από τα διαλύματα διαφορετικών συγκεντρώσεων αγελαδινού DNA για πυκνωτές στους οποίους ακινητοποιήθηκε είτε COWFORW (βλ. σχήμα 57), είτε COWREV (βλ. σχήμα 58), είτε COWFORW-COWREV (βλ. σχήμα 59) εκκινητής.



Σχήμα 57 Συγκεντρωτικό διάγραμμα κανονικοποιημένης μέσης μεταβολής χωρητικότητας πυκνωτών με COWFORW εκκινητή



Σχήμα 58 Συγκεντρωτικό διάγραμμα κανονικοποιημένης μέσης μεταβολής χωρητικότητας πυκνωτών με COWREV εκκινητή



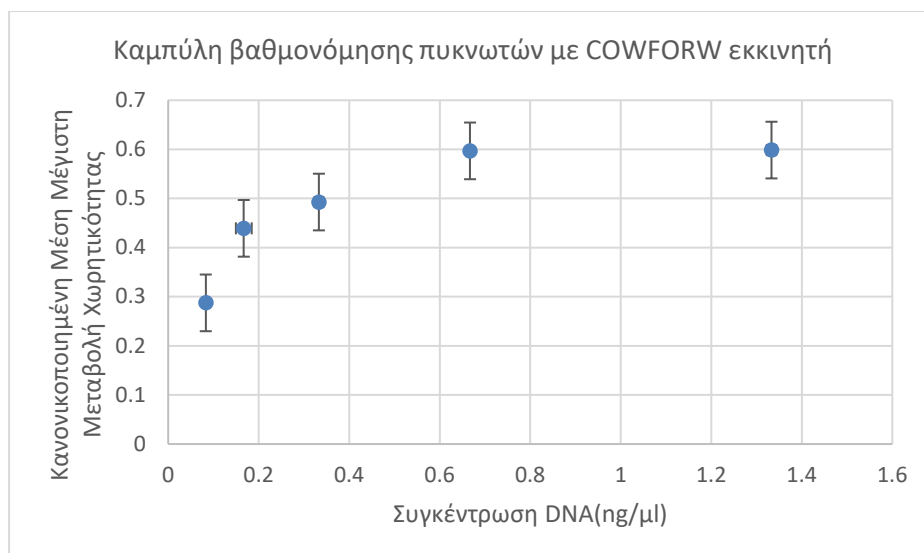
Σχήμα 59 Συγκεντρωτικό διάγραμμα κανονικοποιημένης μέσης μεταβολής χωρητικότητας πυκνωτών με COWFORW-COWREV εκκινητή

Από τα συγκεντρωτικά διαγράμματα, είναι εμφανές ότι υπάρχει διαχωρισμός στη μεταβολή της χωρητικότητας αναλόγως σε πρώτο στάδιο με την ύπαρξη ή όχι του DNA στόχου και σε δεύτερο στάδιο με τη συγκέντρωση στην οποία βρίσκεται το DNA στόχος στο υπ' εξέταση δείγμα. Ήδη μάλιστα από τα πρώτα δέκα δευτερόλεπτα μπορεί να γίνει αυτός ο διαχωρισμός καθώς παρατηρείται μεγάλη διαφορά στην κλίση των καμπυλών μεταβολής.

Για τον διαχωρισμό των εν δυνάμει υπ'εξέταση δειγμάτων πρέπει να δημιουργηθεί η καμπύλη βαθμονόμησης των πυκνωτών ανάλογα με τον εκκινητή που έχει ακινητοποιηθεί στην επιφάνεια τους. Η καμπύλη βαθμονόμησης αναπαριστά την μέση κανονικοποιημένη μέγιστη μεταβολή της χωρητικότητας αναλόγως με τη συγκέντρωση του DNA στόχου στο δείγμα καθώς και το σχετικό σφάλμα σύμφωνα με την τυπική απόκλιση της μέσης τιμής. Τα αποτελέσματα φαίνονται στα σχήματα 60-62 που συνοδεύονται και από τους σχετικούς πίνακες δεδομένων.

ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ COW DNA (NG/ML)	ΜΕΓΙΣΤΗ ΜΕΣΗ ΜΕΤΑΒΟΛ Η ΧΩΡΗΤΙΚΟ- ΤΗΤΑΣ (M.M.M.X.) (NF)	ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ M.M.M.X. (NF)	ΤΥΠΙΚΗ ΑΒΕΒΑΙΟΤΗ- ΤΑ ΜΕΣΗΣ ΤΙΜΗΣ	ΚΑΝΟΝΙΚΟΠΟΙ- ΗΜΕΝΗ ΜΕΓΙΣΤΗ ΜΕΣΗ ΜΕΤΑΒΟΛΗ ΧΩΡΗΤΙΚΟΤΗΤΑ Σ	ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ ΚΑΝΟΝΙ- ΚΟΠΟΙΗ- ΜΕΝΗΣ M.M.M.X.
1.333	208.947	8.249	4.1245	0.599	0.010
0.667	204.728	1.538	1.0875	0.597	0.005
0.333	146.518	15.740	11.1299	0.493	0.010
0.167	122.806	4.797	3.3919	0.439	0.017
0.083	86.377	1.044	0.7382	0.287	0.007

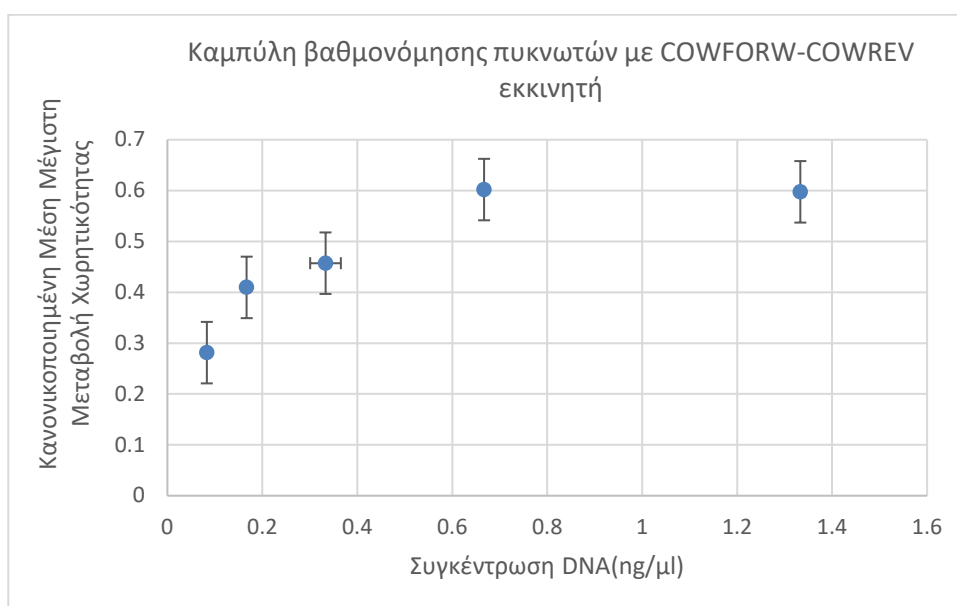
Πίνακας 2 Μέγιστη Μέση Μεταβολή Χωρητικότητας Πυκνωτών με COWFORW εκκινητές



Σχήμα 60 Καμπύλη Βαθμονόμησης πυκνωτών με COWFORW εκκινητή

ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ COW DNA (NG/ML)	ΚΑΝΟΝΙΚΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΜΕΓΙΣΤΗ ΜΕΣΗ ΜΕΤΑΒΟΛΗ ΧΩΡΗΤΙΚΟΤΗΤΑΣ (Μ.Μ.Μ.Χ)	ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ ΚΑΝΟΝΙΚΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ Μ.Μ.Μ.Χ	ΤΥΠΙΚΗ ΑΒΕΒΑΙΟΤΗΤΑ ΚΑΝΟΝΙΚΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ ΜΕΣΗΣ ΜΕΤΑΒΟΛΗΣ ΧΩΡΗΤΙΚΟΤΗΤΑΣ
1.333	0.598	0.0087	0.00435
0.667	0.602	0.0013	0.0009
0.333	0.457	0.0323	0.0228
0.167	0.410	0.0015	0.0011
0.083	0.281	0.0001	0.0001

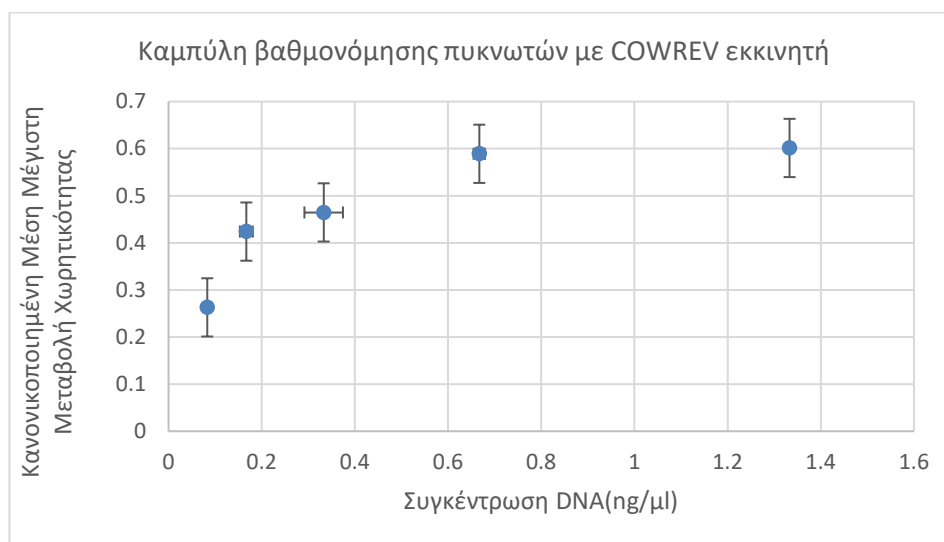
Πίνακας 3 Μέγιστη Μέση Μεταβολή Χωρητικότητας Πυκνωτών με COWFORW-COWREV εκκινητές



Σχήμα 61 Καμπύλη Βαθμονόμησης πυκνωτών με COWFORW-COWREV εκκινητή

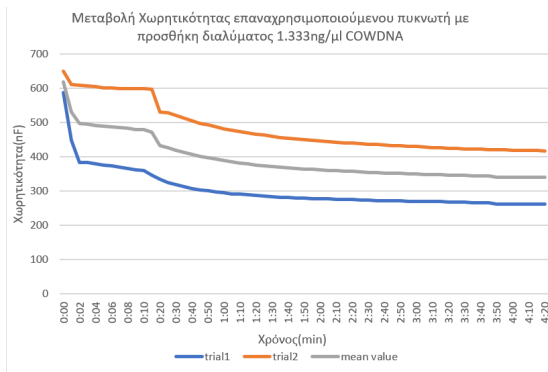
ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ COW DNA (NG/ML)	ΚΑΝΟΝΙΚΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΜΕΓΙΣΤΗ ΜΕΣΗ ΜΕΤΑΒΟΛΗ ΧΩΡΗΤΙΚΟΤΗΤΑΣ (Μ.Μ.Μ.Χ)	ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ ΚΑΝΟΝΙΚΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ Μ.Μ.Μ.Χ	ΤΥΠΙΚΗ ΑΒΕΒΑΙΟΤΗΤΑ ΚΑΝΟΝΙΚΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ ΜΕΣΗΣ ΜΕΤΑΒΟΛΗΣ ΧΩΡΗΤΙΚΟΤΗΤΑΣ
1.333	0.602	0.0021	0.0011
0.667	0.589	0.0122	0.0086
0.333	0.465	0.0413	0.0292
0.167	0.424	0.0139	0.0098
0.083	0.263	0.0023	0.0016

Πίνακας 4 Μέγιστη Μέση Μεταβολή Χωρητικότητας Πυκνωτών με COWREV εκκινητές

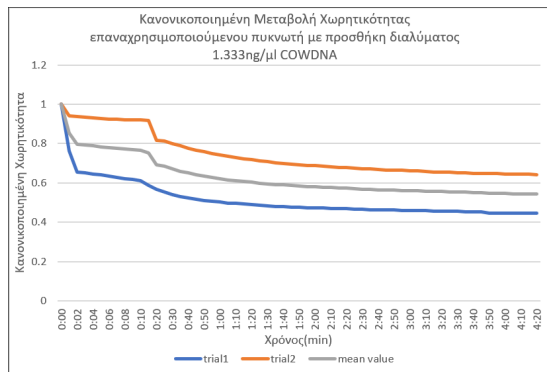


Σχήμα 62 Καμπύλη Βαθμονόμησης πυκνωτών με COWREV εκκινητή

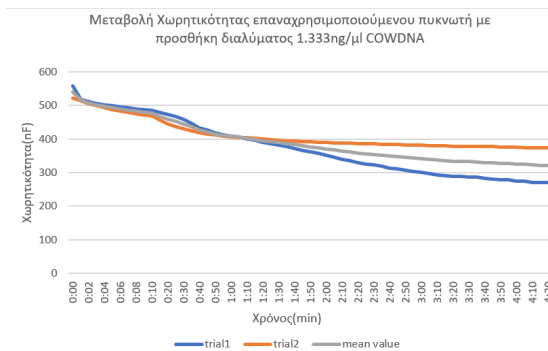
Στη συνέχεια, έγιναν τα πειράματα για την δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης των πυκνωτών. Στα διαγράμματα του σχήματος 63 παρουσιάζονται η κανονική και η κανονικοποιημένη μεταβολή της χωρητικότητας για δύο πυκνωτές κάθε τύπου εκκινητών καθώς και ο μέσος όρος αυτών.



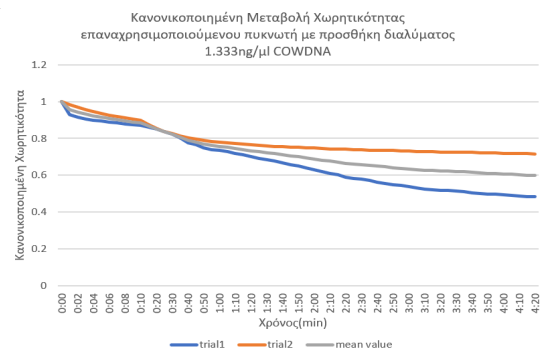
(a)



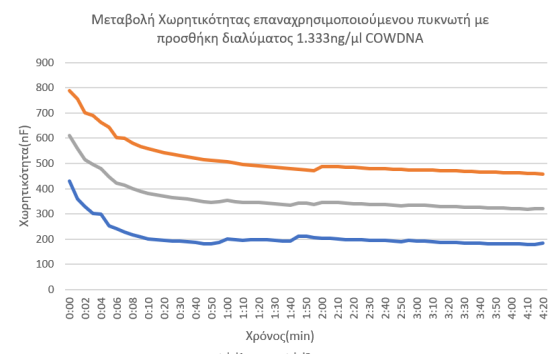
(b)



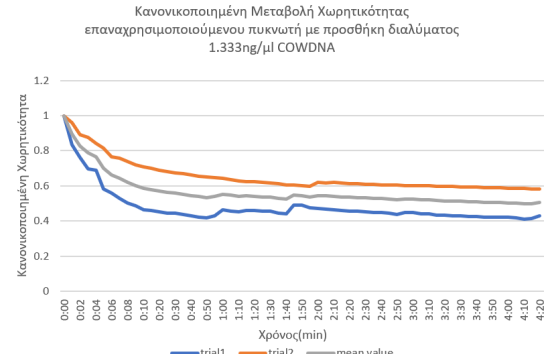
(c)



(d)



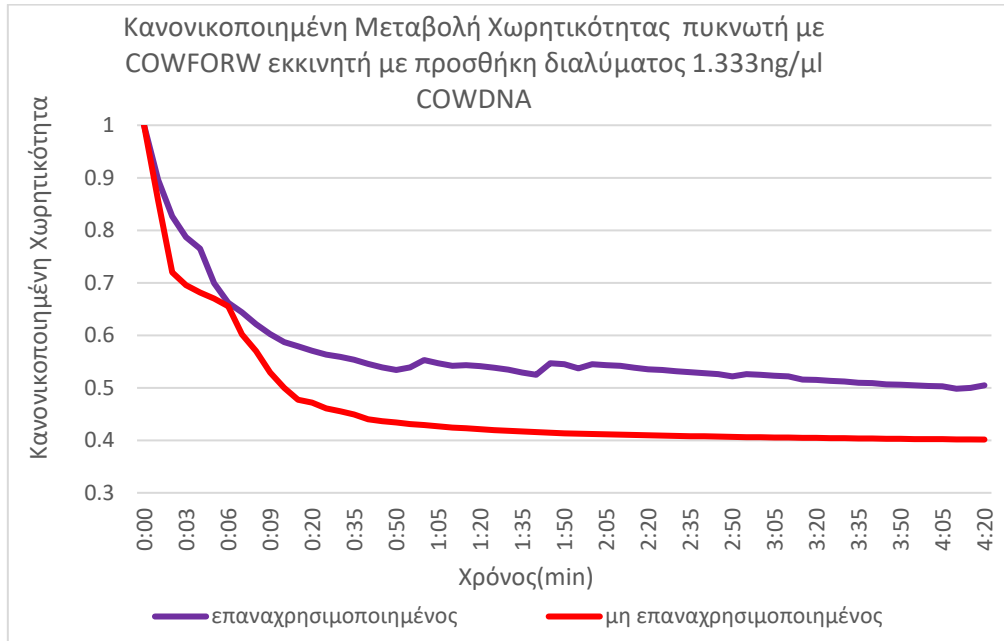
(e)



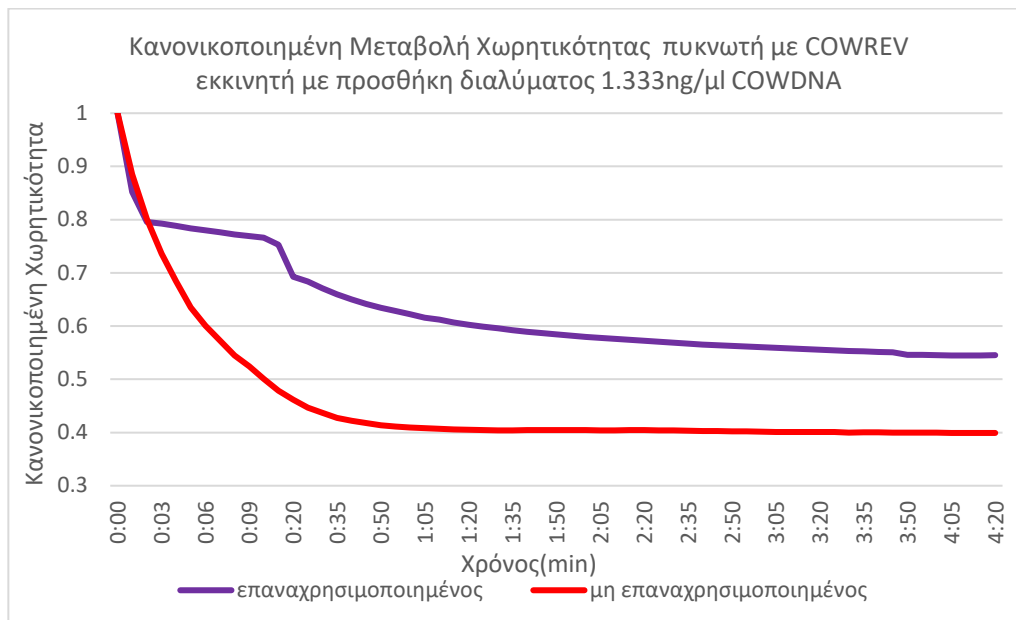
(f)

Σχήμα 63 ((a),(c),(e)) Μεταβολή Χωρητικότητας, ((b),(d),(f)) Κανονικοποιημένη Μεταβολή Χωρητικότητας πυκνωτών με ακινητοποιημένο ((a),(b)) COWREV, ((c),(d)) COWFORW-COWREV, ((e),(f)) COWFORW εκκινήτη με προσθήκη διαλύματος με συγκέντρωση 1.333ng COWDNA

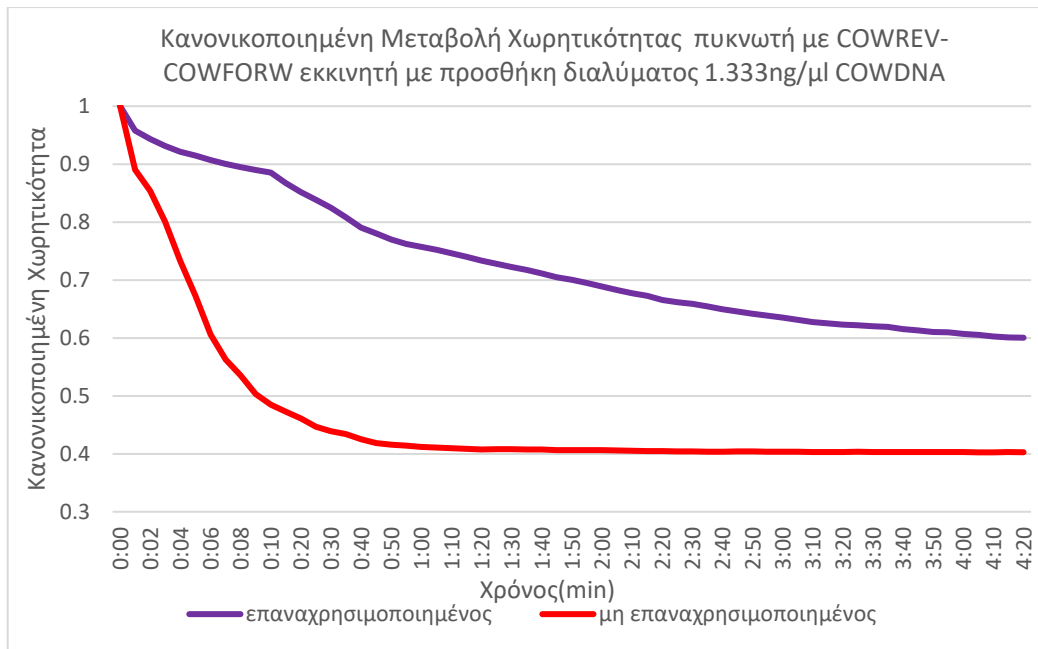
Στα διαγράμματα 64-66 αναπαρίσταται συγκριτικά η μέση κανονικοποιημένη μεταβολή της χωρητικότητας για τους πυκνωτές που χρησιμοποιούνται πρώτη φορά σε σχέση με αυτούς που χρησιμοποιούνται δεύτερη φορά για κάθε τύπου εκκινητές.



Σχήμα 64 Κανονικοποιημένη Μεταβολή Χωρητικότητας πυκνωτή που χρησιμοποιείται πρώτη(κόκκινο) ή δεύτερη(μωβ) φορά με COWFORW εκκινητή με προσθήκη διαλύματος 1.333ng/μl COWDNA



Σχήμα 65 Κανονικοποιημένη Μεταβολή Χωρητικότητας πυκνωτή που χρησιμοποιείται πρώτη(κόκκινο) ή δεύτερη(μωβ) φορά με COWREV εκκινητή με προσθήκη διαλύματος 1.333ng/μl COWDNA



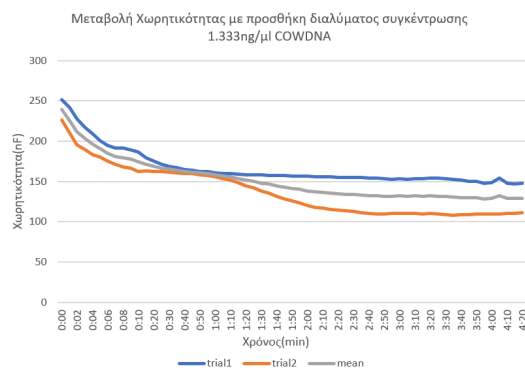
Σχήμα 66 Κανονικοποιημένη Μεταβολή Χωρητικότητας πυκνωτή που χρησιμοποιείται πρώτη(κόκκινο) ή δεύτερη(μωβ) φορά με COWREV-COWFORW εκκινητή με προσθήκη διαλύματος 1.333ng/μl COWDNA

Είναι φανερό ότι υπάρχει σημαντική διαφορά στην απόκριση του πυκνωτή κατά τη δεύτερη προσπάθεια χρήσης του. Στην περίπτωση που στον πυκνωτή είχαν ακινητοποιηθεί μόνο COWFORW εκκινητές παρατηρείται πιο κοντινή συμπεριφορά σε σχέση με αυτή του πυκνωτή που χρησιμοποιείται πρώτη φορά. Ωστόσο κάτι τέτοιο, πιθανώς δεν οφείλεται στους εκκινητές, καθώς όπως παρατηρείται οι αποκρίσεις των πυκνωτών δεν επηρεάζονται σε σημαντικό βαθμό από τους εκκινητές που ακινητοποιήθηκαν στην επιφάνειά τους. Ο λόγος στον οποίο οφείλεται η καλύτερη απόκριση είναι ενδεχομένως το γεγονός πως στους συγκεκριμένους πυκνωτές έγινε πιο επιτυχημένη πλύση μετά την πρώτη χρήση με αποτέλεσμα στην εκ νέου βύθισή τους στο διάλυμα των εκκινητών να προσομοιαστεί καλύτερα η διαδικασία λειτουργίας του αισθητήρα την πρώτη φορά που ετοιμάζεται.

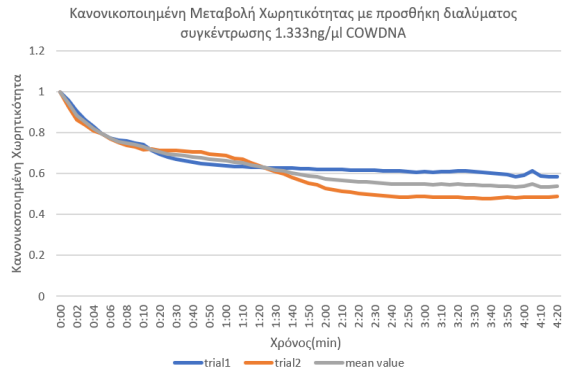
Όσον αφορά τον ποιοτικό χαρακτηρισμό του υπό εξέταση δείγματος σχετικά με το αν περιέχει το αγελαδινό DNA στόχο, η απόκριση που δίνουν οι πυκνωτές που χρησιμοποιούνται δεύτερη φορά είναι διακριτή σε σχέση με τον αρνητικό έλεγχο όπως αυτός ορίστηκε από τα δείγματα του καθαρού νερού και των δύο μη συμπληρωματικών κατσίκισιων DNA. Συνεπώς αν και όχι τόσο καλή, η συγκεκριμένη

απόκριση των πυκνωτών δείχνει ότι θα μπορούσε να διαπιστωθεί με μικρότερη ευαισθησία η παρουσία του αγελαδινού DNA στόχου.

Τέλος εξετάστηκε η απόδοση των πυκνωτών έπειτα από αποθήκευσή τους στους +4 για πέντε μέρες. Επειδή, όπως φάνηκε στα διαγράμματα δοκιμών με αγελαδινό DNA διαφορετικών αραιώσεων, η ακινητοποίηση διαφορετικών εκκινητών στην επιφάνεια των πυκνωτών δεν επηρεάζει σε σημαντικό βαθμό την απόκρισή τους, σε πυκνωτές διαφορετικών εκκινητών εναποτέθηκαν διαλύματα διαφορετικών συγκεντρώσεων αγελαδινού DNA. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στα σχήματα 65-70.

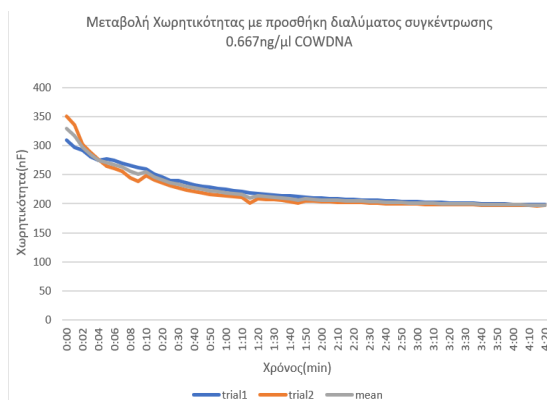


(α)

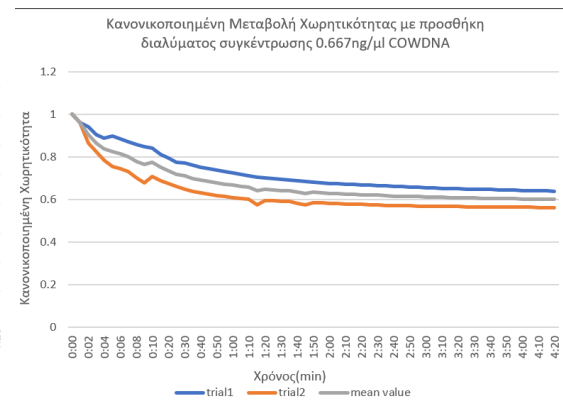


(b)

Σχήμα 67 (α) Μεταβολή Χωρητικότητας,(b) Κανονικοποιημένη Μεταβολή Χωρητικότητας πυκνωτών με ακινητοποιημένο COWFORW-COWREV εκκινητή με προσθήκη διαλύματος συγκέντρωσης 1.333ng/μl COWDNA μετά από αποθήκευση 5 ημερών

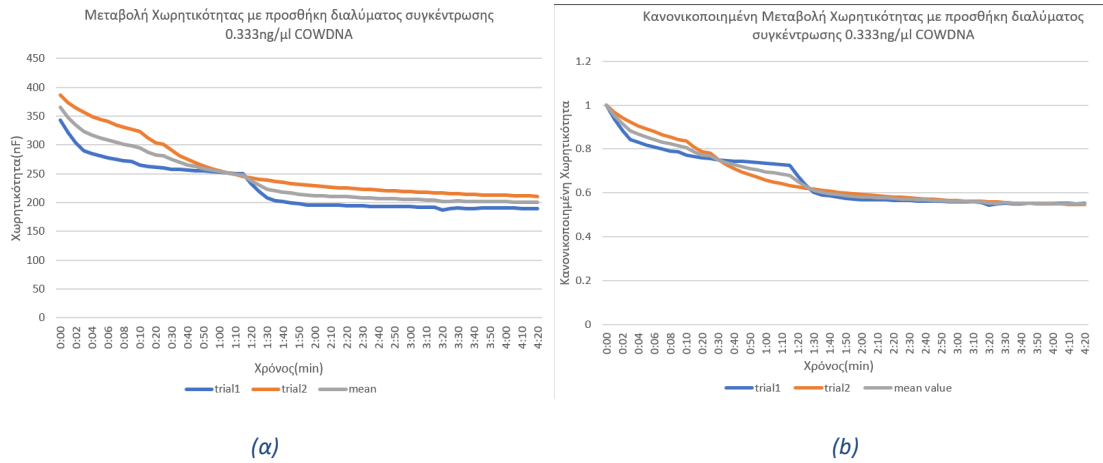


(α)

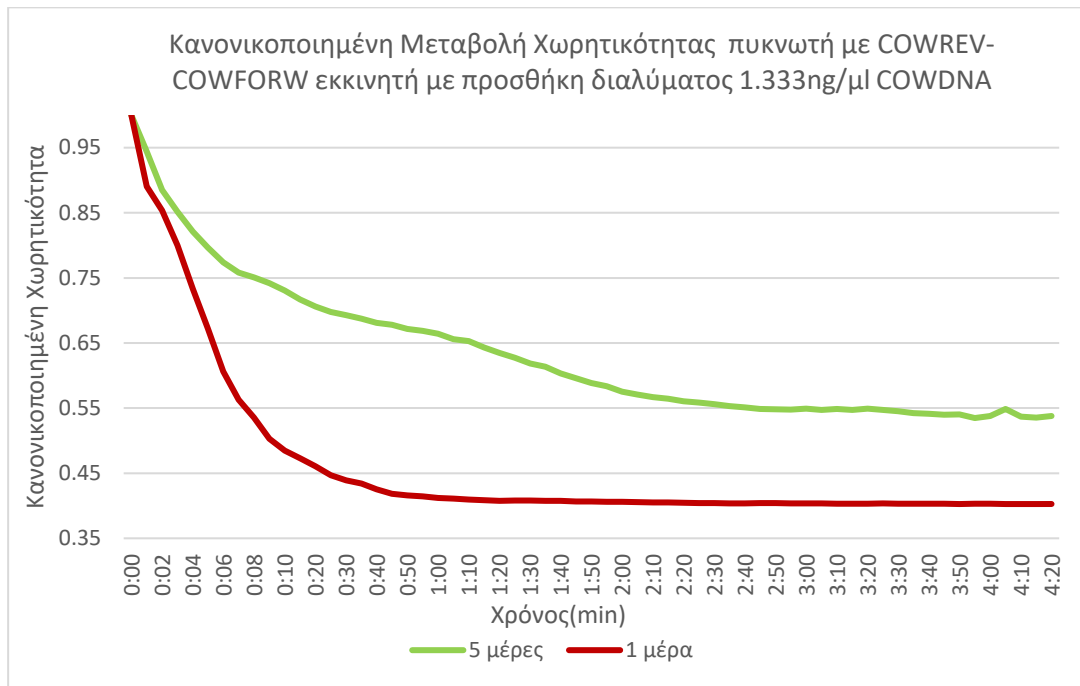


(b)

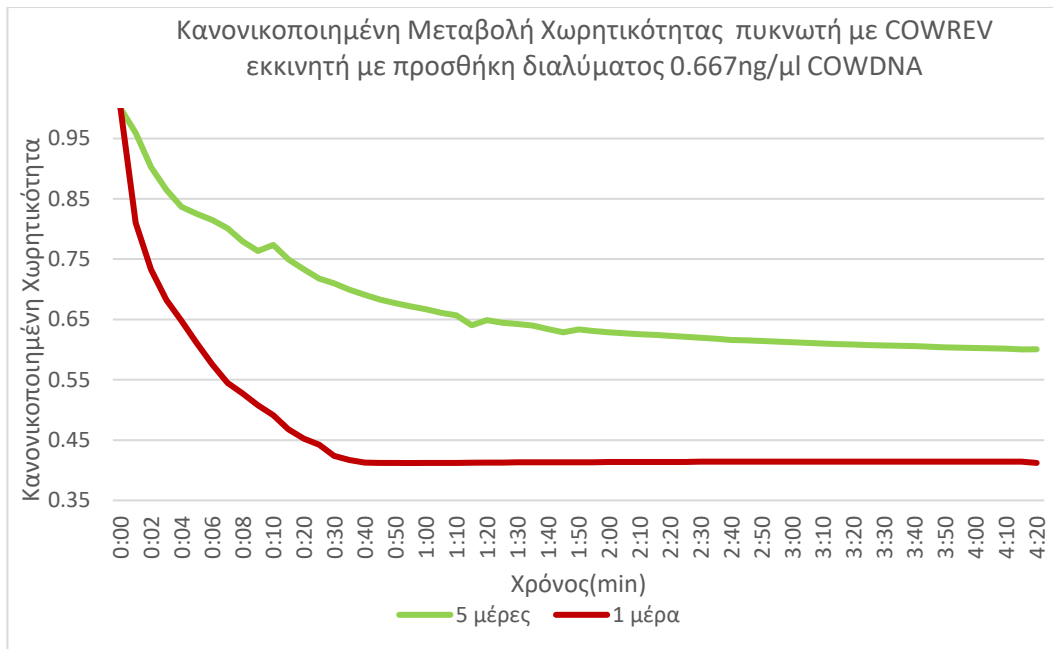
Σχήμα 68 (α) Μεταβολή Χωρητικότητας,(b) Κανονικοποιημένη Μεταβολή Χωρητικότητας πυκνωτών με ακινητοποιημένο COWREV εκκινητή με προσθήκη διαλύματος συγκέντρωσης 0.667ng/μl COWDNA μετά από αποθήκευση 5 ημερών



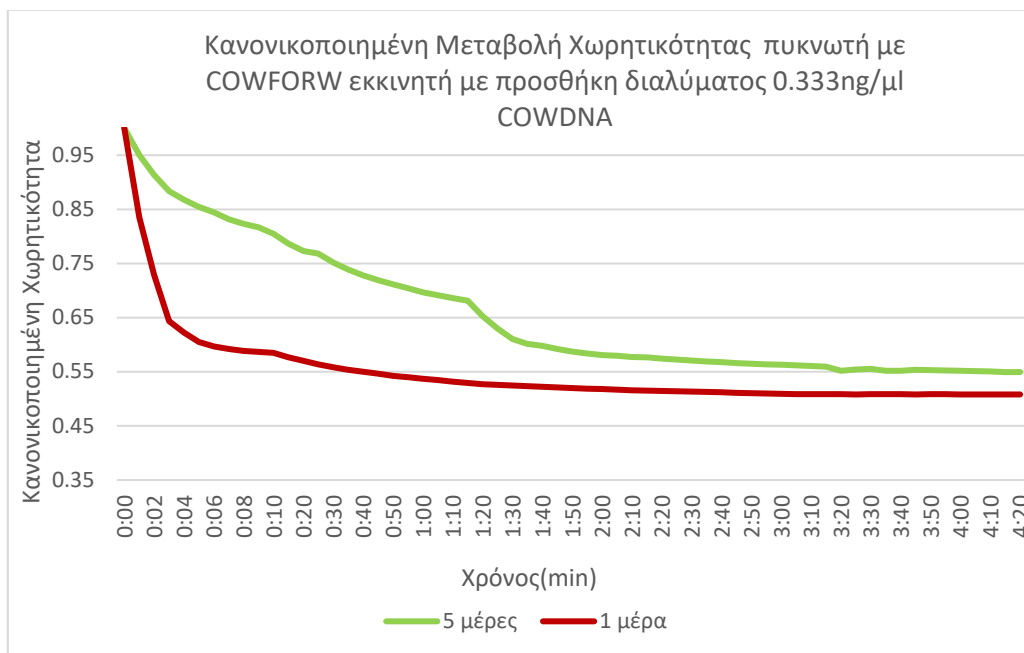
Σχήμα 69 (α) Μεταβολή Χωρητικότητας, (b) Κανονικοποιημένη Μεταβολή Χωρητικότητας πυκνωτών με ακινητοποιημένο COWFORW εκκινητή με προσθήκη διαλύματος συγκέντρωσης 0.333ng/μl COWDNA μετά από αποθήκευση 5 ημερών



Σχήμα 70 Κανονικοποιημένη Μεταβολή Χωρητικότητας πυκνωτή με COWREV-COWFORW εκκινητή με προσθήκη διαλύματος 1.333ng/μl COWDNA μετά από 1 ημέρα (κόκκινο) και μετά από 5 ημέρες(πράσινο) αποθήκευσης



Σχήμα 71 Κανονικοποιημένη Μεταβολή Χωρητικότητας πυκνωτή με COWREV εκκινητή με προσθήκη διαλύματος 0.667ng/μl COWDNA μετά από 1 ημέρα (κόκκινο) και μετά από 5 ημέρες(πράσινο) αποθήκευσης



Σχήμα 72 Κανονικοποιημένη Μεταβολή Χωρητικότητας πυκνωτή με COWFORW εκκινητή με προσθήκη διαλύματος 0.333ng/μl COWDNA μετά από 1 ημέρα (κόκκινο) και μετά από 5 ημέρες(πράσινο) αποθήκευσης

Η διαφορά μεταξύ της απόκρισης των πυκνωτών μετά από μία και μετά από πέντε μέρες αποθήκευσης είναι σημαντική. Οι πυκνωτές, στην επιφάνεια των οποίων είχε ακινητοποιηθεί COWFORW εκκινητής και αποθηκεύτηκαν για 5 ημέρες

παρουσιάζουν μεταβολή της χωρητικότητας πιο κοντινή σε σχέση με αυτούς που αποθηκεύτηκαν μία μέρα, παρότι ελέγχθηκαν σε μικρότερη συγκέντρωση DNA σε σχέση με τις άλλες δύο κατηγορίες. Επίσης παρατηρείται ότι η μετάβαση προς μία σταθερή τιμή γίνεται πιο αργά για τον πυκνωτή που έχει αποθηκευτεί 5 ημέρες σε σχέση με αυτόν που έχει αποθηκευτεί μία. Παρότι όμως παρατηρείται μικρότερη μέση μεταβολή της κανονικοποιημένης χωρητικότητας, αυτή είναι χαμηλότερη από 60% και συνεπώς αρκεί για να χαρακτηριστεί το δείγμα σχετικά με το αν περιέχει το DNA στόχο ή όχι.

6. Επίλογος

6.1. Σύνοψη και Συμπεράσματα

Στην παρούσα εργασία περιγράφηκε αναλυτικά η διαδικασία δημιουργίας χωρητικού βιοαισθητήρα με χρήση interdigital πυκνωτών για την ανίχνευση αγελαδινού DNA ως νοθεία σε κατσικίσιο γάλα.

Όπως φάνηκε από τα διαγράμματα μεταβολής της χωρητικότητας, ο interdigital πυκνωτής χρυσών ηλεκτροδίων παρουσιάζει εμφανώς διαφορετική απόκριση παρουσία και απουσία του αγελαδινού DNA στόχου. Πιο συγκεκριμένα, για μεταβολή της χωρητικότητας μικρότερη του 20% θα μπορούσε ένα δείγμα να χαρακτηριστεί αρνητικό στον έλεγχο νοθείας με αγελαδινό γάλα ενώ για μεταβολές μεγαλύτερες του 25% να χαρακτηριστεί θετικό με όριο ανίχνευσης τα 0.083ng/μl. Η δυνατότητα του όμως δεν περιορίζεται μόνο στον ποιοτικό χαρακτηρισμό του υπό εξέταση δείγματος καθώς φαίνεται να έχει και δυνατότητα ημι-ποσοτικού χαρακτηρισμού της ποσότητας του αγελαδινού DNA στόχου που βρίσκεται στο υπό εξέταση δείγμα.

Ιδιαίτερα θετικό χαρακτηριστικό του προτεινόμενου βιοαισθητήρα αποτελεί η γρήγορη απόκριση στην ανίχνευση του αγελαδινού DNA ακόμα και στη χαμηλή συγκέντρωση των 0.083ng/μl, καθώς παρατηρείται ήδη από τα πρώτα δέκα δευτερόλεπτα ουσιαστική διαφοροποίηση στην κλίση της καμπύλης μεταβολής της χωρητικότητας παρουσία και απουσία του DNA στόχου, ενώ ιδίως όσο μεγαλώνει η συγκέντρωση οδηγείται ο πυκνωτής σε αρκετά σταθερή τελική τιμή χωρητικότητας μετά από σύντομο χρονικό διάστημα μικρότερο των τεσσάρων λεπτών.

Το χαμηλό όριο ανίχνευσής του σημαίνει ότι ενδεχομένως μπορεί να χρησιμοποιηθεί και με χρήση απευθείας δείγματος από γάλα. Με αυτόν τον τρόπο, η διαδικασία ανίχνευσης της νοθείας θα απλουστευθεί ακόμα περισσότερο καθώς δε θα απαιτείται το βήμα της εξαγωγής του DNA από τα δείγματα.

Όσον αφορά τη δυνατότητα αποθήκευσής του, φαίνεται -ακόμα και με την υπεραπλουστευμένη διαδικασία αποθήκευσης που περιγράφηκε- να δύναται να δώσει ποιοτικά αποτελέσματα σε σχέση με την παρουσία ή όχι του αγελαδινού DNA με μικρότερο ωστόσο όριο ανίχνευσης σε σχέση με το αρχικό.

Όσον αφορά τη δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης, αν και η διαφορά της απόκρισης των πυκνωτών που επαναχρησιμοποιήθηκαν με αυτή των πυκνωτών που χρησιμοποιήθηκαν πρώτη φορά είναι σημαντική, ενδεχομένως να μπορούν να χρησιμοποιηθούν για ποιοτικό χαρακτηρισμό του υπό εξέταση δείγματος με μικρότερο όριο ανίχνευσης. Αξίζει πάντως να σημειωθεί, ότι σε περίπτωση που ακολουθούταν κάποια διαφορετική διαδικασία για την πλύση των πυκνωτών αφότου χρησιμοποιήθηκαν την πρώτη φορά προκειμένου να απομακρυνθεί πιο αποτελεσματικά το DNA που προχώρησε σε υβριδισμό με τους εκκινητές, ίσως τα αποτελέσματα να ήταν καλύτερα.

Τέλος, είναι σημαντικό να αναφερθεί το χαμηλό κόστος της προτεινόμενης διάταξης σε συνδυασμό με την ευκολία χειρισμού, καθώς τα δύο αυτά χαρακτηριστικά είναι ζητούμενα στην ανάπτυξη βιοαισθητήρων. Όσον αφορά το χαμηλό κόστος, αξίζει να παρατηρηθεί η ομοιότητα στην απόκριση των πυκνωτών ανεξαρτήτως των εκκινητών οι οποίοι ακινητοποιήθηκαν στην επιφάνειά τους, δείχνοντας πως αρκεί να χρησιμοποιηθεί ένας από τους εκκινητές για την ανίχνευση του DNA στόχου.

6.2 Προτάσεις για μελλοντικές έρευνες

Ξεκινώντας με βάση τη διάταξη που προτάθηκε παραπάνω μπορούν μελλοντικά να γίνουν πολλές βελτιώσεις για την κατασκευή ενός αξιόπιστου, φθηνού, γρήγορου και εύκολου στο χειρισμό βιοαισθητήρα.

Αρχικά, προτείνεται να γίνουν πειράματα απευθείας σε δείγματα γάλακτος, παραλείποντας το βήμα της εξαγωγής του DNA διότι κάτι τέτοιο θα απλοποιούσε πολύ τη διαδικασία και θα μείωνε σημαντικά το κόστος.

Κατά δεύτερον, προτείνεται η χρήση πεπτιδικών νουκλεϊκών οξέων (Peptide Nucleic Acid- PNA) στην θέση των εκκινητών ως ανιχνευτές. Οι PNAs είναι αρκετά πιο σταθεροί σε σχέση με τους εκκινητές και έχουν ακόμα υψηλότερη ευαισθησία και

ειδικότητα και θα μπορούσαν να βελτιώσουν την απόδοση του αισθητήρα, όπως επίσης και να μειώσουν το όριο ανίχνευσής του.

Κατά τρίτον, προτείνεται η αναζήτηση βελτιωμένων τεχνικών αποθήκευσης και πλύσης των πυκνωτών καθώς φαίνεται να έχουν δυνατότητα αποθήκευσης και επαναχρησιμοποίησης.

Γ. Βιβλιογραφία

- [1] A. Poonia, A. Jha, R. Sharma, H. B. Singh, A. K. Rai, and N. Sharma, "Detection of adulteration in milk: A review," *International Journal of Dairy Technology*, vol. 70, no. 1. Blackwell Publishing Ltd, pp. 23–42, Feb. 01, 2017. doi: 10.1111/1471-0307.12274.
- [2] T. Azad and S. Ahmed, "Common milk adulteration and their detection techniques," *International Journal of Food Contamination*, vol. 3, no. 1. BioMed Central Ltd., 2016. doi: 10.1186/s40550-016-0045-3.
- [3] R. Nagraik, A. Sharma, D. Kumar, P. Chawla, and A. P. Kumar, "Milk adulterant detection: Conventional and biosensor based approaches: A review," *Sensing and Bio-Sensing Research*, vol. 33. Elsevier B.V., Aug. 01, 2021. doi: 10.1016/j.sbsr.2021.100433.
- [4] Y. Liu, E. E. D. Todd, Q. Zhang, J. R. Shi, and X. J. Liu, "Recent developments in the detection of melamine," *Journal of Zhejiang University: Science B*, vol. 13, no. 7. pp. 525–532, Jul. 2012. doi: 10.1631/jzus.B1100389.
- [5] S. P. Sakti, N. Chabibah, S. P. Ayu, M. C. Padaga, and A. Aulanni'Am, "Development of QCM biosensor with specific cow milk protein antibody for candidate milk adulteration detection," *J Sens*, vol. 2016, 2016, doi: 10.1155/2016/1807647.
- [6] E. F. Renny, D. K. Daniel, A. I. Krastanov, C. A. Zachariah, and R. Elizabeth, "Enzyme based sensor for detection of urea in milk," *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, vol. 19, no. 2, pp. 198–201, 2005, doi: 10.1080/13102818.2005.10817216.
- [7] K. V., "DNA Biosensors-A Review," *J Bioeng Biomed Sci*, vol. 07, no. 02, 2017, doi: 10.4172/2155-9538.1000222.
- [8] G. N. Hlongwane, D. Dodoo-Arhin, D. Wamwangi, M. O. Daramola, K. Moothi, and S. E. Iyuke, "DNA hybridisation sensors for product authentication and tracing: State of the art and challenges," *South African Journal of Chemical Engineering*, vol. 27. Elsevier B.V., pp. 16–34, Jan. 01, 2019. doi: 10.1016/j.sajce.2018.11.002.
- [9] A. Georgas *et al.*, "ACE2-based capacitance sensor for rapid native SARS-CoV-2 detection in biological fluids and its correlation with real-time PCR," *Biosens Bioelectron*, vol. 202, p. 114021, Apr. 2022, doi: 10.1016/J.BIOS.2022.114021.
- [10] A. Kowalczyk, "Trends and perspectives in DNA biosensors as diagnostic devices," *Current Opinion in Electrochemistry*, vol. 23. Elsevier B.V., pp. 36–41, Oct. 01, 2020. doi: 10.1016/j.coelec.2020.03.003.
- [11] M. Santhanam, I. Algov, and L. Alfonta, "DNA/RNA electrochemical biosensing devices a future replacement of PCR methods for a fast epidemic containment," *Sensors (Switzerland)*, vol. 20, no. 16. MDPI AG, pp. 1–15, Aug. 02, 2020. doi: 10.3390/s20164648.

- [12] H. Y. Lau, H. Wu, E. J. H. Wee, M. Trau, Y. Wang, and J. R. Botella, "Specific and sensitive isothermal electrochemical biosensor for plant pathogen DNA detection with colloidal gold nanoparticles as probes," *Sci Rep*, vol. 7, Jan. 2017, doi: 10.1038/srep38896.
- [13] X. Liu, H. L. Shuai, Y. J. Liu, and K. J. Huang, "An electrochemical biosensor for DNA detection based on tungsten disulfide/multi-walled carbon nanotube composites and hybridization chain reaction amplification," *Sens Actuators B Chem*, vol. 235, pp. 603–613, Nov. 2016, doi: 10.1016/j.snb.2016.05.132.
- [14] M. Barozzi *et al.*, "Optical Fiber Sensors for Label-Free DNA Detection," *Journal of Lightwave Technology*, vol. 35, no. 16, pp. 3461–3472, Aug. 2017, doi: 10.1109/JLT.2016.2607024.
- [15] M. Sozzi *et al.*, "Modification of a long period grating-based fiber optic for DNA biosensing," in *Optical Fibers, Sensors, and Devices for Biomedical Diagnostics and Treatment XI*, Feb. 2011, vol. 7894, p. 78940J. doi: 10.1117/12.874458.
- [16] J. M. L. Ortiz *et al.*, "Effectual Gold Nanoprobe Sensor for Screening Cow Milk Adulteration in Goat Milk—Comparison With Conventional PCR," *Journal of Agricultural Science*, vol. 13, no. 5, p. 41, Apr. 2021, doi: 10.5539/jas.v13n5p41.
- [17] C. Yao, Y. Xiang, K. Deng, H. Xia, and W. Fu, "Sensitive and specific HBV genomic DNA detection using RCA-based QCM biosensor," *Sens Actuators B Chem*, vol. 181, pp. 382–387, 2013, doi: 10.1016/j.snb.2013.01.063.
- [18] N. S. Mazlan *et al.*, "Interdigitated electrodes as impedance and capacitance biosensors: A review," in *AIP Conference Proceedings*, Sep. 2017, vol. 1885. doi: 10.1063/1.5002470.
- [19] A. EEs of EDA and I. Capacitor Design, "Overview on Interdigital Capacitor Design." [Online]. Available: www.agilent.com/fi
- [20] K. Chetpattananondh, T. Tapoanoi, P. Phukpattaranont, and N. Jindapetch, "A self-calibration water level measurement using an interdigital capacitive sensor," *Sens Actuators A Phys*, vol. 209, pp. 175–182, Mar. 2014, doi: 10.1016/j.sna.2014.01.040.
- [21] J. I. A. Rashid and N. A. Yusof, "The strategies of DNA immobilization and hybridization detection mechanism in the construction of electrochemical DNA sensor: A review," *Sensing and Bio-Sensing Research*, vol. 16. Elsevier B.V., pp. 19–31, Nov. 01, 2017. doi: 10.1016/j.sbsr.2017.09.001.
- [22] M. Datta, D. Desai, and A. Kumar, "Gene Specific DNA Sensors for Diagnosis of Pathogenic Infections," *Indian Journal of Microbiology*, vol. 57, no. 2. Springer, pp. 139–147, Jun. 01, 2017. doi: 10.1007/s12088-017-0650-8.
- [23] L. Wang, M. Veselinovic, L. Yang, B. J. Geiss, D. S. Dandy, and T. Chen, "A sensitive DNA capacitive biosensor using interdigitated electrodes," *Biosens Bioelectron*, vol. 87, pp. 646–653, Jan. 2017, doi: 10.1016/j.bios.2016.09.006.

- [24] S. Tombelli *et al.*, "A Portable Screening Device for SARS-CoV-2 with Smartphone Readout," *Engineering Proceedings 2022, Vol. 16, Page 7*, vol. 16, no. 1, p. 7, Feb. 2022, doi: 10.3390/IECB2022-12274.
- [25] A. Georgas *et al.*, "A Biosensor Platform for Point-of-Care SARS-CoV-2 Screening," *Biosensors 2022, Vol. 12, Page 487*, vol. 12, no. 7, p. 487, Jul. 2022, doi: 10.3390/BIOS12070487.