ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΦΥΣΙΚΗΣ

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΩΝ ΧΩΡΗΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΕ LASER ΓΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΟΛΥΒΔΟΥ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

της

ΔΗΜΗΤΡΑΣ Ε. ΑΠΟΣΤΟΛΙΔΟΥ

Επιβλέπουσα: Ιωάννα Ζεργιώτη

Επ. Καθηγήτρια Ε.Μ.Π

Αθήνα, Οκτώβριος 2012

ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΦΥΣΙΚΗΣ

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΩΝ ΧΩΡΗΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΕ LASER ΓΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΟΛΥΒΔΟΥ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

της

ΔΗΜΗΤΡΑΣ Ε. ΑΠΟΣΤΟΛΙΔΟΥ

Επιβλέπουσα: Ιωάννα Ζεργιώτη

Επ. Καθηγήτρια Ε.Μ.Π

Εγκρίθηκε από την τριμελή εξεταστική επιτροπή στις _____

(Υπογραφή)	(Υπογραφή)	(Υπογραφή)
_____	_____	_____
Ζεργιώτη Ιωάννα Επ. Καθηγήτρια Ε.Μ.Π.	Χατζανδρούλης Σταύρος	Τσουκαλάς Δημήτρης Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Αθήνα, Οκτώβριος 2012

(Υπογραφή)

_____

ΑΠΟΣΤΟΥΛΙΔΟΥ Ε. ΔΗΜΗΤΡΑ

Διπλωματούχος Σχολής Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών Επιστημών

© 2012 – All rights reserved

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ..... - 1 -

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ..... - 5 -

ABSTRACT ..... - 6 -

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ..... - 7 -

1.1 Αισθητηρες ..... - 7 -
Αποδοση αισθητηρα ..... - 7 -
1.2 Βιοαισθητηρες ..... - 7 -
Βιοϋποδοχεας ..... - 8 -
Μορφομετατροπεας ..... - 8 -
1.3 Τυποι βιοϋποδοχεων ..... - 8 -
Ένζυμα ..... - 8 -
Αντισωματα ..... - 8 -
Απτινες ..... - 9 -
Πρωτεϊνες ..... - 9 -
Νουκλεϊκα οξεα ..... - 9 -
1.4 Τυποι μορφομετατροπεων ..... - 9 -
Ηλεκτροχημικοι μορφομετατροπεις ..... - 10 -
Μέτρηση τάσης ..... - 10 -
Μέτρηση ρεύματος ..... - 11 -
Μέτρηση χωρητικότητας ..... - 11 -
1.5 Τεχνικη εκτυπωσης σε βιοαισθητηρες ..... - 11 -
Φωτολιθογραφια ..... - 11 -
Inkjet ..... - 12 -
Pin deposition ..... - 12 -
Εναποθεση με laser (LIFT- Laser Induced Forward Transfer) ..... - 13 -
Τεχνική εναπόθεσης με laser (LIFT) ..... - 14 -

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ..... - 20 -

2.1 Πειραματικη διαταξη ..... - 20 -
Laser Nd:YAG ..... - 20 -
Εξασθενητης δεσμης ..... - 21 -
Συστημα τηλεσκοπικων φακων ..... - 23 -
Επιπεδα κατοπτρα ..... - 23 -

Μασκα της δεσμης ..... - 24 -
Αντικειμενικος φακος ..... - 25 -
Βαση στηριξης των υποστρωματων δοτη και δεκτη ..... - 26 -
Διαχωριστης δεσμης ..... - 26 -
Ηλεκτρονικος υπολογιστης ..... - 27 -
Βηματικοι κινητηρες ..... - 28 -

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ..... - 29 -

3.1 Αισθητηρες χωρητικοτητας ..... - 29 -
3.2 Πρωτοκολλο ακινητοποιησης ολιγονουκλεοτιδιων στην επιφανεια GOPTS/LTO ..... - 30 -
1. Ενεργοποιηση της επιφανειας ..... - 31 -
2. Ακινητοποιηση των νουκλεϊκων οξεων ..... - 31 -
3. Υβριδοποιηση συμπληρωματικων νουκλεϊκων οξεων ..... - 31 -

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ..... - 32 -

4.1 Συντομη βιβλιογραφικη αναφορα στην υβριδοποιηση ολιγονουκλεοτιδιων ..... - 32 -
4.2 Ολιγονουκλεοτιδια για ανιχνευση ενος miss-match ..... - 32 -
4.2.1 Πειραματικες δοκιμες υβριδοποιησης ..... - 34 -
4.2.2 Εναποθεση ολιγονουκλεοτιδιων στους αισθητηρες χωρητικοτητας και πειραματικα αποτελεσματα απο την υβριδοποιηση τους ..... - 36 -

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ..... - 39 -

5.1 Συντομη εισαγωγη στην ανιχνευση βαρεων μεταλλων (Pb) ..... - 39 -
5.2 Ολιγονουκλεοτιδια για ανιχνευση βαρεων μεταλλων (Pb) ..... - 39 -
5.2.1 Εναποθεση ολιγονουκλεοτιδιων για ανιχνευση μολυβδου στους αισθητηρες χωρητικοτητας και διαδικασια υβριδοποιησης ..... - 40 -

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ..... - 44 -

6.1 Θυλακοειδεις μεμβρανες ..... - 44 -
6.2 Πρωτοκολλο απομονωσης θυλακοειδων μεμβρανων ..... - 44 -
6.3 Εναποθεση και ακινητοποιηση θυλακοειδων σε αμπερομετρικους αισθητηρες ..... - 45 -
Αμπερομετρικοι αισθητηρες SPEs ..... - 45 -
6.4 Πειραματικη τεχνικη ..... - 47 -
6.5 Πειραματικα αποτελεσματα ..... - 48 -
Θυλακοειδης μεμβρανες με PEDOT ..... - 51 -

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ..... - 55 -

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ..... - 56 -

Περίληψη

Η περιβαλλοντική μόλυνση έχει προσελκύσει την προσοχή της επιστημονικής κοινότητας τα τελευταία χρόνια, λόγω της υψηλής επιπτώσης της στην υγεία των ανθρώπων. Έτσι, πολλές έρευνες έχουν διεξαχθεί προκειμένου να βρεθούν τρόποι ανίχνευσης διαφόρων περιβαλλοντικών μολυντών. Στην έρευνα αυτή, ειδικά συστήματα ανίχνευσης, βιοαισθητήρες, έχουν αναπτυχθεί, τα οποία πρέπει να είναι ιδιαίτερα επιλεκτικά στον εντοπισμό της ουσίας προς μελέτης (μολυντής) και ταυτόχρονα να είναι εμπορεύσιμα. Ωστόσο, η διαδικασία δημιουργίας ενός βιοαισθητήρα είναι πολύ απαιτητική. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη συνεργασία πολλών επιστημονικών πεδίων, όπως μικροτεχνολογία, βιολογία, χημεία κλπ., ώστε να παρθούν τα καλύτερα δυνατά αποτελέσματα.

Στην εργασία αυτή, έγινε χρήση Nd:YAG λέιζερ ($4^{η}$ αρμονική, 266nm). Η τεχνική εκτύπωσης LIFT μελετήθηκε ως προς την ικανότητα εναπόθεσης βιοϋλικών για περιβαλλοντικούς αισθητήρες χωρίς την καταστροφή της βιο-λειτουργικότητας του υλικού προς εναπόθεση.

Αρχικά, για την κατανόηση της τεχνικής LIFT δίνεται αναλυτική περιγραφή της διάταξης και της λειτουργίας των κάθε της στοιχείων.

Ως προς το πειραματικό μέρος, η διπλωματικη εργασία χωρίζεται σε τρία μέρη με μεγαλύτερη βάση στην ανίχνευση του μολύβδου. Στο πρώτο μέρος γίνεται αναφορά σε πειράματα πάνω σε ιατρικές εφαρμογές για την ανίχνευση ατελειών στην ολιγονουκλεοτιδική αλυσίδα μέσω της υβριδοποίησης τους. Στο δέυτερο μέρος γίνεται αναφορά σε πειράματα πάνω στην ανίχνευση του μολύβδου με την χρήση ολιγονουκλεοτιδικών αλυσίδων μέσω της υβριδοποίησης τους για περιβαλλοντικούς σκοπούς. Τέλος, στο τρίτο μέρος παρουσιάζονται έξτρα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν κατά την διάρκεια της διπλωματικής εργασίας, τα οποία βασίζονταν στη μελέτη του χρόνο ζωής των θυλακοειδών μεμβρανών για περιβαλλοντικές εφαρμογές.

Στο τέλος αυτής της εργασίας παρουσιάζονται τα συμπεράσματα με βάση τα αποτελέσματα.

Abstract

Environmental pollution has attracted the attention of the scientific society these past years because of its high impact on human lives. Thus, many researches have been carried out in order to find ways to detect various environmental pollutants. In the research of these pollutants, biosensing tools have been developed, which are required to be highly selective in their detection and simultaneously commercial friendly. However, the process of creating a biosensor is very requiring. This has as a result the cooperation of many scientific fields, such as microtechnology, biology, chemistry etc., in order to get the best possible results.

In this work, Nd:YAG laser (266nm wavelength) was used. The laser induced forward transfer (LIFT) was studed in order to examine its capability to deposit biomaterials on environmental sensors, without destroying the bio-functionality of the material.

First of all, a detailed description of the LIFT set up and its elements' function is given in order to make the LIFT technique understandable.

As for the experimental part, this thesis is divided into three parts with emphasis on the detection of lead. In the first part, there are experiments for medical applications, which detect defects in the oligonucleotide strands through their hybridization. In the second part, there are experiments for environmental applications, which detect heavy metals and especially lead through the hybridization of oligonucleotide strands. Finally, in the third part, further experiments conducted during this thesis are presented. These experiments were also for environmental applications and were based on the study of the life time of the thylakoids membranes.

At the end of this thesis conclusions are presented based on the results.

Κεφάλαιο 1

1.1 Αισθητήρες

Από την κατασκευή του πρώτου τρανζίστορ, αρχές του 1950, μέχρι τώρα η εξέλιξη στη μικροηλεκτρονική ήταν ραγδαία. Ένας κλάδος της μικροηλεκτρονικής, οι αισθητήρες, ακολούθησαν αυτή την πορεία της εξέλιξης, με αποτέλεσμα να έχουμε όλο και πιο πολλούς και μικρούς σε μέγεθος αισθητήρες. Οι αισθητήρες μπορούν να χωριστούν σε ομάδες ανάλογα με την ποσότητα που μετράνε (θερμικοί, μηχανικοί, (βιο)χημικοί κτλ.) ή ανάλογα με τις εφαρμογές τους. Η διάκριση τους αυτή έχει οδηγήσει σε ένα μεγάλο αριθμό από αισθητήρες.

Παρόλη τη μεγάλη ποικιλία σε αισθητήρες, η ανάπτυξη της τεχνολογίας των αισθητήρων οφείλει να ακολουθεί την τρέχουσα μικροηλεκτρονική τεχνολογία. Για αυτό θα πρέπει να γίνεται κατάλληλη διεργασία παραγωγής και κατανόησης των τεσσάρων βασικών κλάδων: μικροεπεξεργασία, μικροκατασκευή, μικρομηχανική και μικροηλεκτρονική. Ταυτόχρονα, όμως, σε κάποιους αισθητήρες θα πρέπει να γίνεται και κατάλληλη προετοιμασία του αισθητήρα, πέρα από την κατασκευή, ώστε να εκτελεί τις λειτουργίες που επιθυμούμε που δεν έχουν να κάνουν άμεσα με την κατασκευή του. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η εναπόθεση μιας ουσίας πάνω στον αισθητήρα, η οποία με κάποιο μηχανισμό θα μας δίνει σήμα. Παρακάτω θα αναφερθούμε πιο εκτεταμένα σε αυτού του τύπου την προετοιμασία [1].

Σε αυτό το σημείο είναι σημαντικό να αναφέρουμε μια βασική ιδιότητα που επηρεάζει τους αισθητήρες: την απόδοση.

Απόδοση αισθητήρα

Η απόδοση ενός αισθητήρα μπορεί να χαρακτηριστεί από την αποτελεσματικότητα του. Αν και διαφορετικές εφαρμογές συνήθως απαιτούν διαφορετικές αποδόσεις αισθητήρα, υπάρχουν τρεις παράγοντες που συνεισφέρουν στην απόδοση ενός αισθητήρα: η ικανότητα, η εγγενής αξιοπιστία και η διαθεσιμότητα. Η ικανότητα βασίζεται στη δυνατότητα του αισθητήρα να πραγματοποιήσει την επιθυμητή λειτουργία κάτω από προκαθορισμένες συνθήκες. Η εγγενής αξιοπιστία (που ορίζεται με βάση του προτύπου ποιότητας BS4778), είναι η δυνατότητα του αισθητήρα να πραγματοποιήσει την απαιτούμενη λειτουργία κάτω από προκαθορισμένες συνθήκες για καθορισμένη χρονική περίοδο. Τέλος, η διαθεσιμότητα βασίζεται στο πόσο ικανός είναι ο αισθητήρας στο να πραγματοποιήσει τη λειτουργία του όταν αυτό απαιτείται [1].

1.2 Βιοαισθητήρες

Μια κατηγορία αισθητήρων είναι οι βιοαισθητήρες, οι οποίοι έχουν εφαρμογές σε περιβαλλοντικές και βιολογικές διεργασίες, στον έλεγχο της ποιότητας των τροφίμων, στη γεωργία, στον στρατό και στην ιατρική [2].

Η χρησιμότητα των βιοαισθητήρων είναι πολύ μεγάλη και έγκειται στο ότι μας προσφέρουν αναλυτικά εργαλεία για να ανιχνεύσουμε ποσότητες που επιθυμούμε με ικανοποιητική ταχύτητα και υψηλή ευαισθησία. Όμως, για να το πετύχουμε αυτό, θα πρέπει πρώτα να ξεπεράσουμε κάποια προβλήματα που παρουσιάζονται [1]:

- Την επιτυχή ενσωμάτωση της μικροηλεκτρονικής με τα μικρορροϊκά κυκλώματα με σκοπό την ανίχνευση βιολογικών υλικών, που θα έχει σαν συνέπεια τη βιομηχανοποίηση και την παραγωγή μεγάλης κλίμακας.
- Την αυτοματοποίηση της διαδικασίας ανίχνευσης και τη συσχέτιση της με το φαινόμενο που λαμβάνει χώρο και δίνει σήμα.

- Τη δυνατότητα να λαμβάνουμε άμεσα το σήμα χωρίς την ανάγκη για πολύπλοκη επεξεργασία.

Οι αισθητήρες αποτελούνται από δύο βασικές συνιστώσες: τον βιοϋποδοχέα και τον μορφομετατροπέα. Παρακάτω εξηγούμε τι ακριβώς είναι η κάθε μία συνιστώσα.

Βιοϋποδοχέας

Με τον όρο *βιοϋποδοχέας* εννοούμε ένα κατάλληλο βιομόριο το οποίο αναγνωρίζει τον αναλύτη, που έχουμε επιλέξει για το πείραμα, και αλληλεπιδρά με αυτόν.

Μορφομετατροπέας

Με τον όρο μορφομετατροπέα εννοούμε το στοιχείο που μετατρέπει την αναγνώριση του *αναλύτη* σε μετρήσιμο σήμα (ηλεκτρικό, οπτικό κ.α.).

Αυτές οι δύο συνιστώσες συμπληρώνονται από έναν επεξεργαστή του σήματος, ο οποίος εξάγει και παρουσιάζει τα αποτελέσματα.

Το προτέρημα των βιοαισθητήρων είναι το ότι καταφέρνουν και συνδυάζουν όλες αυτές τις συνιστώσες (βιοϋποδοχέα, μορφομετατροπέα και σε μερικές περιπτώσεις τον επεξεργαστή) σε ένα μόνο αισθητήρα. Με αυτό γλυτώνουμε την χρήση αντιδραστηρίων για να ανιχνεύσουμε τον *αναλύτη*.

1.3 Τύποι βιοϋποδοχέων

Το υλικό που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιοϋποδοχέας ποικίλει ανάλογα με την εφαρμογή του αισθητήρα. Έτσι μπορούμε να έχουμε ένζυμα, αντισώματα, απτίνες, πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα [2].

Σε αυτό το σημείο είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι είναι επιθυμητό ο βιοαισθητήρας να είναι όσο το δυνατόν πιο πολύ επιλεκτικός, δηλαδή να εντοπίζει μόνο τον αναλύτη, το οποίο έχει άμεση σχέση με το πόσο επιλεκτικός είναι και ο βιοϋποδοχέας που χρησιμοποιούμε.

Ένζυμα

Τα ένζυμα, τα οποία προέρχονται από πρωτεΐνες, έχουν τρισδιάστατη δομή, η οποία ενσωματώνεται μόνο σε ένα συγκεκριμένο υπόστρωμα. Τα ένζυμα δρούν ως καταλύτες βιοχημικών αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρο σε κύτταρα. Αυτές τις αντιδράσεις λαμβάνει σαν σήμα ο μορφομετατροπέας. Επίσης, για τη σωστή λειτουργία των ενζύμων πρέπει να ρυθμιστεί κατάλληλα η θερμοκρασία και το pH του περιβάλλοντος, ώστε να πετύχουμε τη βέλτιστη απόδοση τους.

Αντισώματα

Τα αντισώματα είναι μόρια με δύο όμοια σημεία στα οποία μπορούν να προσκολληθούν αντιγόνα. Η χρήση των αντισωμάτων είναι στο να προσελκύουν αντιγόνα, τα οποία αφαιρούν από το βιολογικό σύστημα στο οποίο υπάρχουν. Ο μορφομετατροπέας ανιχνεύει τη μείωση των αντισωμάτων/αντιγόνων από το βιολογικό σύστημα.

Απτίνες

Οι απτίνες είναι ολιγονουκλεοτίδια ή πεπτίδια, τα οποία συνδέονται με ένα συγκεκριμένο βιομόριο. Μπορούμε να έχουμε είτε απτίνες DNA ή RNA, είτε απτίνες πεπτιδίων. Οι απτίνες είναι τεχνητά κατασκευασμένες και βασίζονται στη μέθοδο SELEX. Με αυτόν τον τρόπο τους δίνουμε επιθυμητές ιδιότητες, δηλαδή να συνδέονται με πρωτεΐνες, κύτταρα κτλ. Ο μορφομετατροπέας ανιχνεύει την ένωση ή μη των συμπληρωματικών βάσεων του DNA (αδενίνη, θυμίνη, γουανίνη, κυτοσίνη).

Πρωτεΐνες

Οι πρωτεΐνες είναι μόρια τα οποία αναπτύσσουν δυνάμεις με βιολογικά ενεργά στοιχεία, π.χ. αντισώματα. Η χρήση των πρωτεϊνών είναι στο να λειτουργούν σαν βιοϋποδοχείς για αυτά τα βιολογικά στοιχεία.

Νουκλεϊκά οξέα

Τα νουκλεϊκά οξέα είναι το DNA και το RNA, δηλαδή είναι το γενετικό υλικό. Ο μορφομετατροπέας ανιχνεύει την ένωση ή μη των συμπληρωματικών βάσεων του DNA (αδενίνη, θυμίνη, γουανίνη, κυτοσίνη).

Είναι πολύ μεγάλης σημασίας, πέρα από την επιλεκτικότητα, στην οποία αναφερθήκαμε παραπάνω, η ακινητοποίηση του μορίου του βιοϋποδοχέα πάνω στην επιφάνεια του μορφομετατροπέα. Η ακινητοποίηση μπορεί να πραγματοποιηθεί με δύο τρόπους: φυσική παγίδευση ή με χημική προσκόλληση. Στην ακινητοποίηση έχουμε μικρές ποσότητες βιοϋποδοχέα, που στη συνέχεια χρησιμοποιούνται σε επαναληπτικές μετρήσεις. Η σπουδαιότητα της ακινητοποίησης είναι καθαρά πειραματικής φύσης [2]. Με αυτό εννοούμε ότι η συμβολή της είναι στο να λαμβάνουμε ένα έγκυρο σήμα. Είναι χαρακτηριστικό ότι σε πολλές εφαρμογές των βιοαισθητήρων είναι αναγκαία προϋπόθεση να περάσει ένα διάλυμα μέτρησης πάνω από την επιφάνεια του βιοαισθητήρα. Αν οι βιοϋποδοχείς δεν ήταν κατάλληλα ακινητοποιημένοι, δεν θα παρέμεναν στην επιφάνεια του μορφομετατροπέα και θα είχαμε σαν συνέπεια να παίρνουμε λανθασμένο ή και καθόλου σήμα.

Στα παρακάτω κεφάλαια θα αναφερθούμε πιο αναλυτικά στις τεχνικές ακινητοποίησης των μορίων του βιοϋποδοχέα.

1.4 Τύποι μορφομετατροπέων

Οι συνηθέστεροι τύποι μορφομετατροπέων είναι οι παρακάτω:

- **Αμπερομετρικοί:** Μετριέται η παραγωγή υπεροξειδίων του υδρογόνου (H_2O_2) ή διοξειδίων του οξυγόνου κατά τη βιολογική αντίδραση του βιοϋποδοχέα με τον αναλύτη. Εφαρμόζοντας κατάλληλη τάση στο ένα ηλεκτρόδιο, σε σχέση με την τάση αναφοράς στο άλλο ηλεκτρόδιο, παίρνουμε το επιθυμητό σήμα. Με αυτόν τον τρόπο έχουμε ροή του ρεύματος.
- **Ποτενσιομετρικοί**: Σε αυτή την περίπτωση, η διαφορά ηλεκτρικού δυναμικού, λόγω της διαφορετικής συγκέντρωσης θετικά φορτισμένων ιόντων, μετριέται από ειδική μεμβράνη, η οποία λειτουργεί σαν ηλεκτρόδιο.

- **Αγωγιμότητας**: Με τις βιολογικές αντιδράσεις διαφοροποιείται η αγωγιμότητα η οποία προκαλείται από τη μετακίνηση των ιόντων. Από την αγωγιμότητα υπολογίζουμε το ρυθμό της βιολογικής αντίδρασης.
- **Χωρητικοί**: Η βιολογική αντίδραση αλλάζει τη διηλεκτρική σταθερά του μέσου στην περιοχή όπου βρίσκεται ο βιοϋποδοχέας και παίρνουμε το σήμα. Επίσης, το σήμα μπορεί να προέρχεται από την αλλαγή της απόστασης των δύο οπλισμών του αισθητήρα λόγω της βιολογικής αντίδρασης.
- **Φωτομετρικοί**: Σε αυτή την περίπτωση το αντιδραστήριο ή το προϊόν της βιολογικής αντίδρασης συνδέεται με φθορίζοντα μόρια και με τη βοήθεια οπτικής ίνας οδηγείται το σήμα φωτός από τον εκπομπό στον συλλέκτη. Άρα μετριέται το φως που εκπέμπεται από τα μόρια (στόχοι). Μια άλλη εναλλακτική, πέραν της οπτικής ίνας, είναι η χρήση κάμερας για την ανίχνευση αλλαγών στις φωτεινές ενδείξεις.
- **Πιεζοηλεκτρικοί**: Στην περίπτωση αυτή έχουμε επιφάνειες που ευαίσθητες στις αλλαγές της μάζας που υπάρχουν πάνω στην επιφάνεια τους. Οι βιολογικές αντιδράσεις επομένως θα επιφέρουν μια αλλαγή μάζας στους βιοϋποδοχείς λόγω της προσκόλλησης ή αποκόλλησης του αναλύτη. Η αλλαγή της μάζας εκφράζεται ως αλλαγή του ηλεκτρικού φορτίου.
- **Θερμοκρασιακοί**: Η απορρόφηση ή έκλυση θερμότητας λόγω της αντίδρασης του βιοϋποδοχέα μετράται. Με αυτόν τον τρόπο συσχετίζουμε την θερμοκρασία με την βιολογική αντίδραση ανάμεσα στον βιοϋποδοχέα και τον αναλύτη.

Έτσι, ανακεφαλαιώνοντας ότι ήδη έχουμε πει, φτάνουμε στο συμπέρασμα ότι η ανάπτυξη ενός βιοαισθητήρα ανίχνευσης ενός αναλύτη προϋποθέτει:

- Την κατάλληλη επιλογή του βιοϋποδοχέα
- Την κατάλληλη επιλογή της μεθόδου ακινητοποίησης των μορίων του βιοϋποδοχέα
- Την κατάλληλη επιλογή του μορφομετατροπέα
- Τον καθορισμό του εύρους μέτρησης του αισθητήρα
- Την συσκευασία του βιοαισθητήρα

Στα πειράματα που πραγματοποιήσαμε κάναμε χρήση ηλεκτροχημικών μορφομετατροπέων, άρα θα αναλύσουμε πιο πολύ τον τρόπο λειτουργίας τους και τα βασικά χαρακτηριστικά τους.

Ηλεκτροχημικοί μορφομετατροπείς

Όταν αναφερόμαστε σε ηλεκτροχημικούς μορφομετατροπείς εννοούμε ηλεκτροχημικούς αισθητήρες. Η σπουδαιότητα των αισθητήρων αυτών είναι το γεγονός ότι μας δίνουν ένα γρήγορο, απλό και ασφαλή τρόπο ανίχνευσης των βιολογικών υλικών. Οι ηλεκτροχημικοί αισθητήρες μπορούν να ανιχνεύουν διαφορετικό είδος σήματος. Παρακάτω αναφέρουμε κάποιες από αυτές ενδεικτικά:

Μέτρηση τάσης

Αυτοί οι αισθητήρες βασίζονται στην αλλαγή της τάσης ανάμεσα στο ηλεκτρόδιο ανίχνευσης και στο ηλεκτρόδιο αναφοράς ως αποτέλεσμα αντίδρασης του βιοϋλικού με μια ουσίας έχουμε καθορίσει εμείς.

Ένα μειονέκτημα της τεχνικής αυτής μέτρησης είναι το ότι η μεταβολή της τάσης είναι συνήθως πολύ μικρή. Επίσης, έχουμε παρεμβολή από άλλες αντιδράσεις μέσα στο δείγμα, τις οποίες ο αισθητήρας λανθασμένα παρουσιάζει ως σήμα. Αυτό έχει άμεση συνέπεια στην ευαισθησία του αισθητήρα.

Μέτρηση ρεύματος

Αυτοί οι αισθητήρες βασίζονται στην ανίχνευση ρεύματος που παράγεται από οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις μέσα στο βιοϋλικό κάτω από σταθερό δυναμικό. Το μετρούμενο ρεύμα σχετίζεται άμεσα με την ουσία μέσα στο βιοϋλικό που επιθυμούμε να ανιχνεύσουμε.

Ένα μειονέκτημα της τεχνικής αυτής είναι το ότι πρέπει να βρεθεί τρόπος μεταφοράς των ηλεκτρονίων από το σημείο της οξειδοαναγωγικής αντίδρασης στο ηλεκτρόδιο μέτρησης.

Μέτρηση χωρητικότητας

Αυτοί οι αισθητήρες βασίζονται στην ανίχνευση της αλλαγής των διηλεκτρικών ιδιοτήτων τους λόγω αντίδρασης του βιομορίου με ουσία που έχουμε κατάλληλα επιλέξει ανάλογα με το πείραμα. Η αλλαγή στις διηλεκτρικές ιδιότητες μας επαληθεύει την πραγματοποίηση της αντίδρασης.

Ένα μειονέκτημα της τεχνικής αυτής είναι η δυσκολία κατασκευής πανομοιότυπων διατάξεων με ακρίβεια στην απόσταση μεταξύ των ηλεκτροδίων. Επίσης, ένα άλλο μειονέκτημα είναι το ότι οι αισθητήρες αυτοί είναι πολύ ευαίσθητοι σε αλλαγές στην σύνθεση του διαλύματος. Αυτό το πρόβλημα μπορεί να λυθεί με την χρήση πολλών τέτοιων διατάξεων, όπου σε κάποιες δεν θα τοποθετούμε βιοϋλικό.

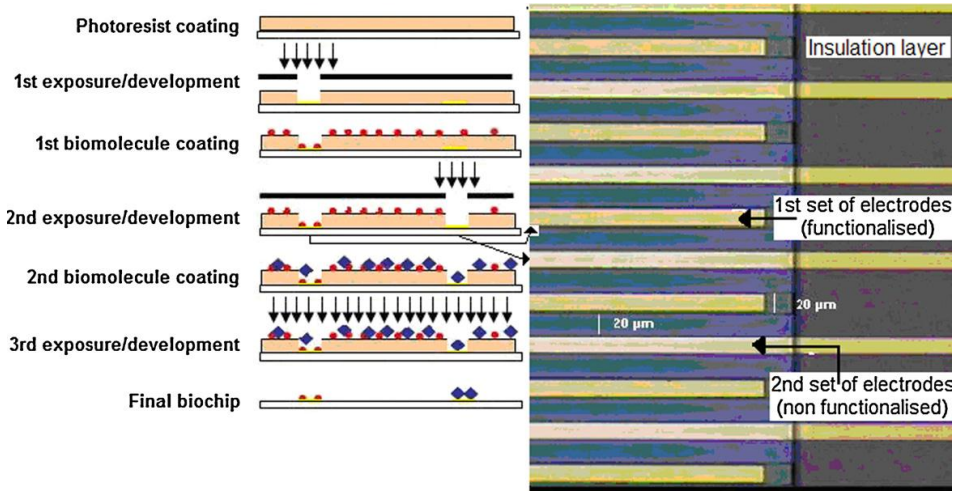
1.5 Τεχνική εκτύπωσης σε βιοαισθητήρες

Οι βιοαισθητήρες χρειάζονται για την κατασκευή τους την εναπόθεση βιοϋλικών πάνω στους μορφομετατροπείς. Για να το πετύχουμε αυτό θα πρέπει να αναπτύξουμε μικροσυστοιχίες με τα βιολογικά αυτά υλικά. Όμως, πρέπει να βρεθεί η κατάλληλη τεχνική εναπόθεσης. Για τους βιοαισθητήρες έχουμε κάποιες τεχνικές εναπόθεσης βιοϋλικών. Οι πιο συνήθεις είναι οι: φωτολιθογραφία, η εναπόθεση inkjet, η εναπόθεση Pin depostiton και η εναπόθεση με laser (LIFT).

Φωτολιθογραφία

Στην τεχνική αυτή, φωτίζουμε περιοχές πάνω στο πλακίδιο, που έχουν υποστεί κατάλληλη επεξεργασία, με υπεριώδη ακτινοβολία μέσω μιας μάσκας. Πιο αναλυτικά, πάνω στην επιφάνεια του πλακιδίου υπάρχει ένα συνδετικό μόριο (linker), το οποίο έχει φωτοευμετάβλητες προστατευτικές ομάδες μορίων. Έπειτα, περνάμε ένα διάλυμα που περιέχει φωτοπροστατευόμενα νουκλεοτίδια από την επιφάνεια. Με αυτό τον τρόπο πετυχαίνουμε τη σύνδεση των νουκλεοτιδίων μόνο με τις περιοχές που έχουν ήδη ενεργοποιηθεί με την υπεριώδη ακτινοβολία. Αφού ολοκληρωθεί αυτό το βήμα, με την βοήθεια μιας άλλης μάσκας, για προστασία διαφορετικών περιοχών από τις προηγούμενες στην επιφάνεια του πλακιδίου, συζεύγοντας διαφορετικά νουκλεοτίδια από πριν με τις νέες ενεργές περιοχές.

Τα πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι η μικρές δομές που φτιάχνουμε και οι ελάχιστες αποκλίσεις ανάμεσα στις διαδοχικές συστοιχίες, που μας εξασφαλίζει υψηλή ακρίβεια σε κάθε κύκλο σύζευξης. Τα μειονεκτήματα αυτής της τεχνικής είναι η χρονοβόρα διαδικασία για να ετοιμάσουμε τον αισθητήρα και το υψηλό κόστος των ειδικών μασκών.

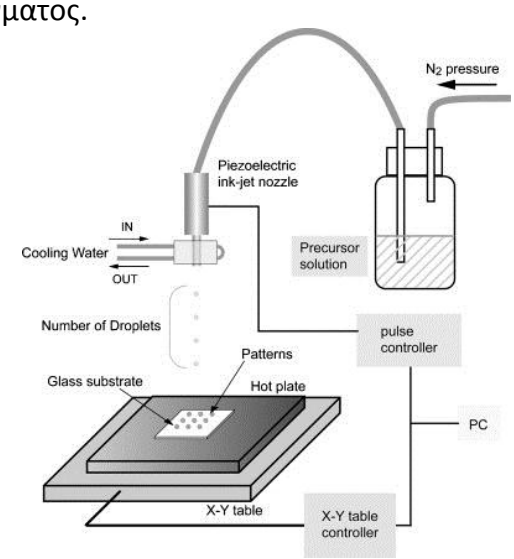


Εικόνα 1 [3]

Inkjet

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για εναπόθεση υγρών. Η τεχνική της βασίζεται σε πιεζοηλεκτρικές φόρμες που προωθούν την μεταφορά βιολογικού υλικού (σε υγρή μορφή) μέσω ακίδων ή τριχοειδών διανεμητών. Έτσι, όταν ενεργοποιούμε τον πιεζοηλεκτρικό κρύσταλλο, τον κάμπτουμε με αποτέλεσμα να ωθεί σταγονίδια βιολογικών μορίων έξω από τα ακροφύσια (ακίδες).

Τα πλεονεκτήματα αυτής της τεχνικής είναι η καλύτερη ποιότητα εναπόθεσης των σταγονιδίων και το καλύτερο μέγεθος τους. Τα μειονεκτήματα αυτής της τεχνικής είναι η μεγάλη εξάρτηση της από το ιξώδες των υγρών που επιθυμούμε να εναποθέσουμε και ενδέχεται να έχουμε ανομοιομορφία του δείγματος.



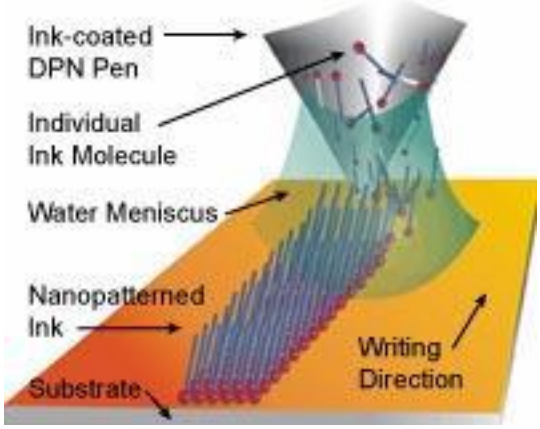
Εικόνα 2 [4]

Pin deposition

Στην τεχνική αυτή ακίδες ή τριχοειδής διανεμητές τοποθετούνται μέσα σε διάλυμα βιολογικών υλικών και χρησιμοποιούνται μετά για την ανάπτυξη κηλίδων σε πορώδη υλικά ή στερεά υποστρώματα.

Το πλεονέκτημα της τεχνικής αυτής είναι η ευκολία στην χρήση και το χαμηλό κόστος. Το μειονέκτημα είναι το γεγονός ότι είναι τεχνική επαφής του αισθητήρα με την ακίδα, το οποίο

μπορεί να προκαλέσει παραγωγή κηλίδων με διαφορετικό μέγεθος, ανάλογα με τις ακίδες και τα βιολογικά υγρά, και καταστροφή του αισθητήρα λόγω της επαφής.



Εικόνα 3 [5]

Εναπόθεση με laser (LIFT- Laser Induced Forward Transfer)

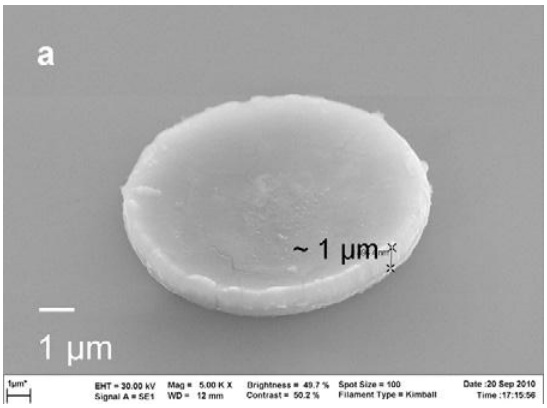
Η τεχνική αυτή είναι μια άμεσης εκτύπωσης (direct write) τεχνική, όπου βιοϋλικά εκτυπώνονται ελεγχόμενα και με μεγάλη ακρίβεια σε ένα υπόστρωμα υποδοχής με τη βοήθεια μιας δέσμης laser.

Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων χρησιμοποιήσαμε αυτή την τεχνική και θα γίνει παρακάτω σαφές γιατί έγινε η επιλογή της.

Η τεχνική αυτή ξεκίνησε να χρησιμοποιείται εδώ και περίπου 26 χρόνια από τους Bohandy κ.ά. [6] για την εναπόθεση μετάλλων. Από τότε έχουν γίνει πειράματα και με εναποθέσεις όχι μόνο στερεών, αλλά και υγρών.

Γενικά, η τεχνική αυτή υπερτερεί έναντι των άλλων τεχνικών διότι:

- Είναι τεχνική μη επαφής. Σε εξαιρετικά ευαίσθητους αισθητήρες, η οποιαδήποτε επαφή με εξωτερικούς παράγοντες μπορεί να προκαλέσει ζημιά στον αισθητήρα, ακόμη και αχρήστευση του.
- Προσφέρει μεγάλη ακρίβεια στην εναπόθεση των βιοϋλικών. Γενικά, η ελάχιστη τιμή της διαμέτρου εναπόθεσης είναι από μικροσφαιρίδια ZnO διαμέτρου 10μm πάνω σε υπόστρωμα πυριτίου (Εικόνα 4) [7]. Αυτό είναι χρήσιμο όταν θέλουμε να κάνουμε εναπόθεση σε πολύ μικρές επιφάνειες.



Εικόνα 4

- Προσφέρει τη δυνατότητα στόχευσης της θέσης προς εναπόθεση και την κάλυψη της κάθε μεμβράνης με διαφορετικό υλικό σε πραγματικό χρόνο. Με αυτό τον τρόπο μπορούμε να έχουμε επίγνωση του σημείου που θα κάνουμε την εναπόθεση και να βάλουμε

διαφορετικά υλικά σε έναν αισθητήρα με αποτέλεσμα να είναι πολυλειτουργικός. Αυτό συμβάλει στην χρησιμότητα του ανιχνευτή.

- Προσφέρει τη δυνατότητα να εκτυπώνουμε μεγάλου εύρους ιξώδους υλικών, από στερεά έως υγρά. Αυτό μας επιτρέπει να χρησιμοποιούμε μεγαλύτερο εύρος υλικών και άρα να έχουμε πιο πολλές εφαρμογές για τους αισθητήρες.
- Δεν έχουμε σπατάλη του βιολογικού μας υλικού. Με την εναπόθεση συγκεκριμένων σταγόνων στα επιθυμητά σημεία μπορούμε να περιορίσουμε το πόσο υλικό θα χρησιμοποιούμε σε κάθε εναπόθεση.
- Δεν αλλοιώνει την πολυλειτουργικότητα, την ποιότητα και την αξιοπιστία των υλικών που θέλουμε να εναποθέσουμε πάνω στους αισθητήρες.
- Τέλος, μας δίνει την δυνατότητα της επαναληψιμότητας των εναποθέσεων.

Εδώ αξίζει να σημειωθεί ότι η εργασία αυτή εστιάζεται κυρίως στην εναπόθεση υγρών διαλυμάτων που περιέχουν βιοϋλικά, οπότε θα μας απασχολήσει κυρίως η τεχνική εκτύπωσης με laser σε υγρά. Τα υγρά που χρησιμοποιούσαμε είχαν ιξώδες περίπου κοντά στο ιξώδες του νερού. Αυτό αναφέρεται καθώς το ιξώδες των υγρών προς εναπόθεση επηρεάζει τις εναποτιθέμενες σταγόνες ως προς το μέγεθος τους.

Τεχνική εναπόθεσης με laser (LIFT)

Όπως ήδη αναφέραμε, η τεχνική εκτύπωσης με laser (LIFT) είναι μια απευθείας τεχνική εναπόθεσης. Πέραν από το laser, η τεχνική αυτή βασίζεται σε ένα στρώμα απορρόφησης της ενέργειας της δέσμης. Το στρώμα αυτό είναι ειδικά τοποθετημένο πάνω σε ένα πλακίδιο χαλαζία (quartz), το οποίο είναι διαφανές στην περιοχή του υπέρυθρου, του υπεριώδες και του ορατού φάσματος ακτινοβολίας και άρα επιτρέπει στη δέσμη του laser να διέρχεται από αυτό χωρίς να την απορροφά. Το πλακίδιο μαζί με το στρώμα απορρόφησης καλούνται στόχος (Εικόνα 5).

Το υλικό που αποτελεί το στρώμα απορρόφησης μπορεί να είναι πολυμερές, μέταλλο κ.ά. Στα πειράματα είχαμε μια στρώση από τιτάνιο, 40nm πάχους, ως στρώμα απορρόφησης. Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 5) φαίνεται το quartz μαζί με το τιτάνιο. Οι διαστάσεις του στόχου (υπόστρωμα δότη) είναι: πάχος (μαζί με το στρώμα τιτανίου) 1mm και διάμετρο 2.5cm.

Εικόνα 5

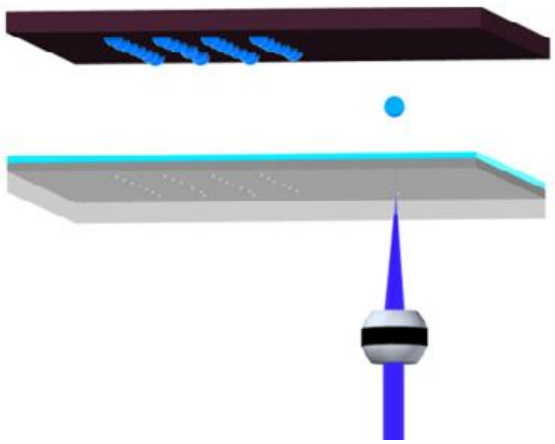
Το quartz παίζει σημαντικό ρόλο στην εναπόθεση των διαλυμάτων πάνω στους αισθητήρες. Για να γίνει αυτό αντιληπτό θα πρέπει να εξηγήσουμε τον τρόπο που λειτουργεί το στρώμα απορρόφησης, σε εμάς το τιτάνιο.

Εικόνα 6

Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων, τοποθετούμε πάνω στο quartz με τη βοήθεια μιας πιπέτας (Εικόνα 6), με χωρητικότητα 1-10μL, το υλικό προς εναπόθεση (βιοϋποδοχέα). Μετά από δοκιμές, βρέθηκε ότι η ποσότητα 10 μL από το διάλυμα είναι ιδανική για να έχουμε το βέλτιστο σχήμα της εναποτιθέμενης σταγόνας και να αποφύγουμε το φαινόμενο του splash, όπου δεν γίνεται εναπόθεση μιας μόνο ενιαίας σταγόνας, αφού αυτή σπάει πριν φτάσει στην επιφάνεια του αισθητήρα (μορφομετατροπέα). Το πάχος των 10μL βιοϋλικού πάνω στον στόχο είναι περίπου 20μm.

Έτσι, όπως ταξιδεύει η δέσμη του laser, θα έχουμε στη σειρά: το quartz, το στρώμα από τιτάνιο και 10μL από το διάλυμα, το οποίο θα έχουμε απλώσει όσο το δυνατόν πιο ομοιόμορφα γίνεται. Το quartz, λόγω του ότι είναι διαφανές στο μήκος κύματος του laser, δεν επηρεάζει τη δέσμη, δηλαδή δεν την απορροφά, και άρα αυτή το διασχίζει αμετάβλητη χωρίς απώλειες. Όμως, δε συμβαίνει το ίδιο με το στρώμα του τιτανίου. Το τιτάνιο απορροφά τη δέσμη με αποτέλεσμα να θερμαίνεται τοπικά. Αυτό έχει σαν συνέπεια τη δημιουργία ενός θύλακα υψηλής πίεσης αέρα στη διεπιφάνεια τιτανίου και διαλύματος, ο οποίος έχει μεγαλύτερη πίεση από την ατμοσφαιρική. Αποτέλεσμα αυτής της υψηλότερης πίεσης είναι ο θύλακας πίεσης να θελήσει να έρθει σε ισορροπία με το περιβάλλον. Λόγω του ότι ο αρχικός θύλακας πίεσης είναι μικρός σε μέγεθος και με μεγάλη πίεση, θα εκτονωθεί ώστε να φτάσει σε ένα σημείο όπου η εσωτερική του πίεση θα ισούται με την ατμοσφαιρική. Σε αυτό το σημείο ο θύλακας θα σπάσει και ένα μέρος του διαλύματος θα αποκοπεί από το ολικό διάλυμα πάνω στον στόχο και θα φτάσει τον αισθητήρα. Αξίζει να σημειωθεί ότι η εκτόνωση του θύλακα πίεσης θα δημιουργήσει ένα jet.

Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 8) γίνεται μια αναπαράσταση του πως πραγματοποιείται η εναπόθεση αφού σπάσει ο θύλακας πίεσης.

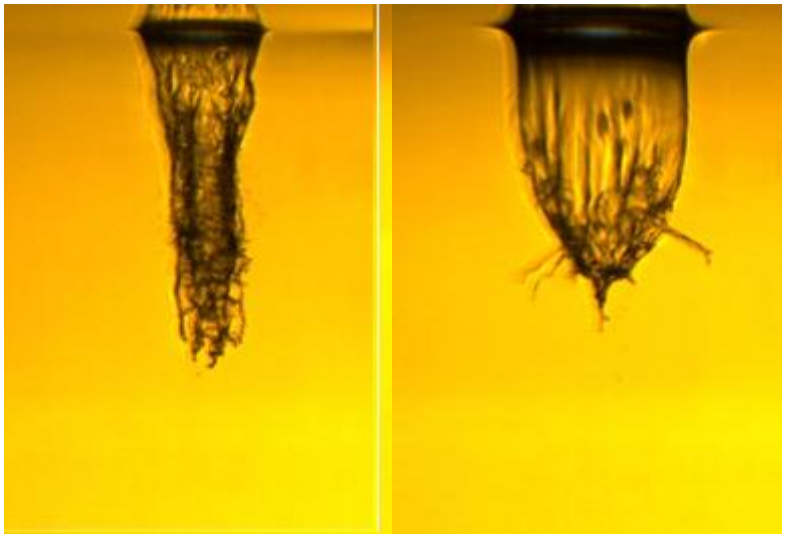


Εικόνα 7 [8]

Για να βρεθεί η βέλτιστη ενέργεια εναπόθεσης, μέσω του μεγέθους και σχήματος του θύλακα, είχαν πραγματοποιηθεί δοκιμές με διαφορετικές ενέργειες ώστε να βρεθεί η βέλτιστη για εναπόθεση πάνω στους αισθητήρες.

Το σχήμα και μέγεθος του θύλακα υψηλής πίεσης επηρεάζει άμεσα το πόσο καλή θα είναι η εναπόθεση του διαλύματος πάνω στον αισθητήρα, πέρα από την ποσότητα του διαλύματος πάνω στον στόχο, καθώς ο θύλακας αυτός ρυθμίζει το πώς και πού θα πέσει η σταγόνα προς εναπόθεση. Τα αποτελέσματα των δοκιμών παρουσιάζονται στις παρακάτω εικόνες (Εικόνα 8), όπου παρατηρούμε το στρώμα τιτανίου με τα 10μL του διαλύματος, 1M phosphate buffer pH8, και το θύλακα πίεσης που σχηματίζεται.

180mJ/cm^2 Απόσταση:467μm Χρόνος:14.8μs	263mJ/cm^2 Απόσταση:506.8μm Χρόνος:10.3μs	454mJ/cm^2 Απόσταση:412.9μm Χρόνος:6.36μs



Εικόνα 8

890mJ/cm^2 Απόσταση:534μm Χρόνος:1.82μs	1430mJ/cm^2 Απόσταση:470.3μm Χρόνος:1.84μs

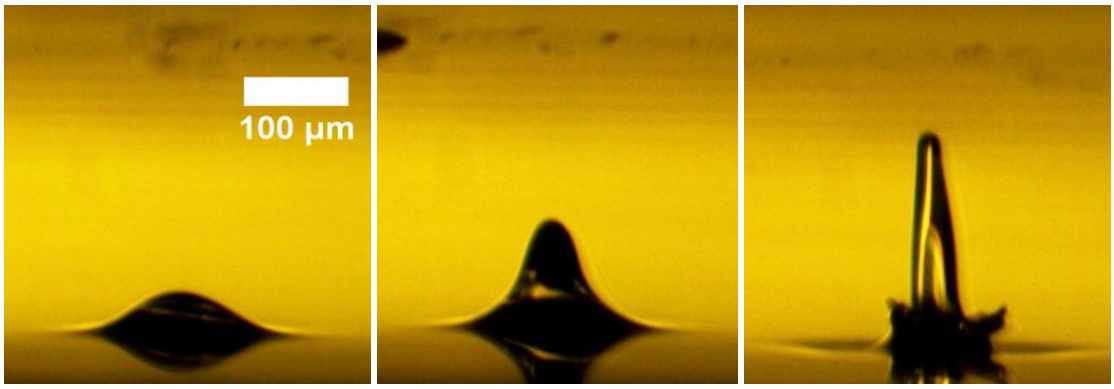
Από τα παραπάνω σχήματα παρατηρούμε πόσο πολύ αλλάζει το jet του θύλακα υψηλή πίεσης με την αύξηση της έντασης. Επίσης, αξίζει να τονίσουμε τον χρόνο που τραβήχτηκαν οι εικόνες αυτές. Είναι εμφανές ότι το jet για διαφορετικές εντάσεις στην δέσμη όσο αυξάνεται η ένταση, τόσο πιο γρήγορα δημιουργείται το jet και τόσο πιο γρήγορο είναι το φαινόμενο της εναπόθεσης. Αυτό προκύπτει από το ότι η ένταση 180mJ/cm^2 χρειάζεται 14.8μs να διανύσει μια απόσταση, ενώ η ένταση 1430mJ/cm^2 χρειάζεται μόνο 1.84μσγια να διανύσει την ίδια περίπου απόσταση. Επίσης, παρατηρούμε ότι σε χαμηλές σχετικά ενέργειες το jet είναι πιο λεπτό και δεν εμφανίζει άλλα μικρότερα jet στο μήκος του, όπως παρατηρούμε στην ενέργεια 1430mJ/cm^2 καθαρά. Αυτό θα μας δώσει μια πολύ καλή σταγόνα εναπόθεσης καθώς όλο το διάλυμα θα πέσει

σε ένα σημείο λόγω του ότι το υγρό προς εναπόθεση θα είναι συγκεντρωμένο σε ένα σημείο στον χώρο και δεν θα έχουμε πολλές σκορπισμένες σταγόνες. Επίσης, έχει παρατηρηθεί ότι όσο πιο μεγάλο το jet σε πάχος, αν το δούμε στις δύο διαστάσεις, τόσο πιο μεγάλη η σταγόνα εναπόθεσης λόγω του ότι το μεγαλύτερο jet θα μεταφέρει και μεγαλύτερη ποσότητα υγρού. Έτσι, σε υψηλές ενέργειες χαλάει το σχήμα του jet και καταλήγει σε πολλαπλά jet και άρα δεν έχουμε την επιθυμητή εναπόθεση.

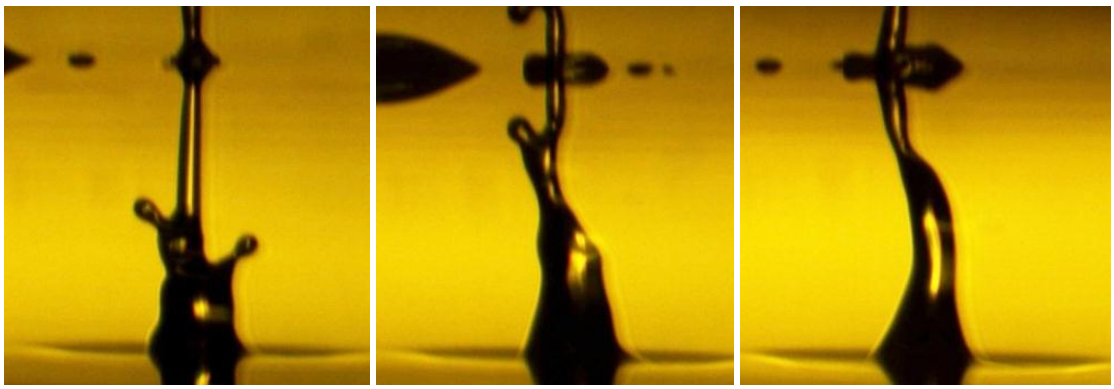
Εδώ αξίζει να τονιστεί ότι ανάλογα με το ιξώδες του βιοϋλικού που εναποθέτουμε έχουμε δημιουργία διαφορετικών δυνάμεων στο υγρό, καθώς αυτό ωθείται προς τα πάνω λόγω του θύλακα πίεσης. Η απόδοση της τεχνικής βέβαια δεν μειώνεται. Αλλάζοντας τις συνθήκες της εναπόθεσης, όπως την ένταση της δέσμης του laser, μπορούμε να έχουμε το επιθυμητό αποτέλεσμα. Στο πείραμα που πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια αυτής της διπλωματικής εργασίας, όπου το ιξώδες των διαλυμάτων ήταν κοντά σε αυτό του νερού, η βέλτιστη ποσότητα του υγρού προς εναπόθεση τοποθετημένο ομοιόμορφα πάνω στο τιτάνιο έτσι ώστε να έχουμε μια καλή σταγόνα προς εναπόθεση ήταν 10μL.

Για να παρατηρήσουμε καλύτερα το σχηματισμό του θύλακα υψηλής πίεσης έλαβε χώρο ξανά το παραπάνω πείραμα, αλλά αυτή τη φορά με σταθερή ένταση στη δέσμη του laser.

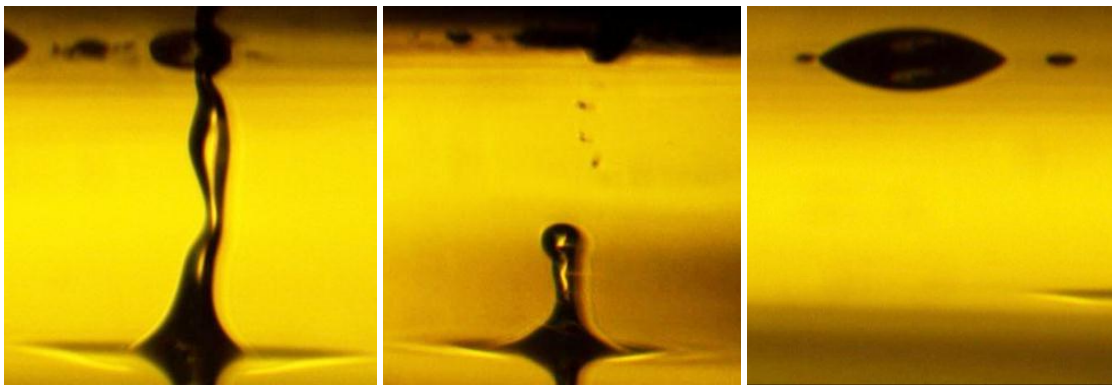
Έτσι, στις παρακάτω εικόνες βλέπουμε τα στάδια δημιουργίας του θύλακα πίεσης. Η βέλτιστη ένταση της δέσμης του laser στο συγκεκριμένο πείραμα επιλέχτηκε με βάση την σταγόνα εναπόθεσης η 263mJ/cm^2, και η διάμετρος του τιτανίου που χτυπούσε η δέσμη (spot size) ήταν 55μm. Το διάλυμα, 1M phosphate buffer pH8, πάνω στον στόχο ήταν 10μL. Τέλος, η απόσταση ανάμεσα στο υπόστρωμα δότη (στόχο) και δέκτη (μορφομετατροπέα) ήταν 300μm. Η χρήση του διαλύματος phosphate buffer pH8 οφείλεται στο γεγονός ότι είναι το διάλυμα μέσα στο οποίο προσθέτουμε τις ολινουκλεοτιδικές αλυσίδες για τα πειράματα.



3μs | 6μs | 12μs



27μs | 39μs | 48μs



Εικόνα 9

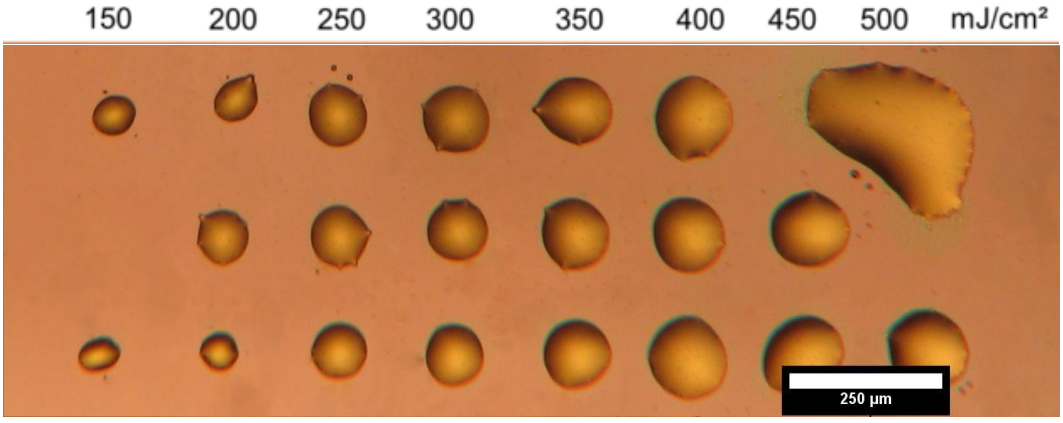
60μs | 69μs | Μετά την εναπόθεση

Όλες οι εικόνες έχουν παρθεί με την τεχνική shadowgraph και τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο ΕΜΠ.

Στις παραπάνω εικόνες (Εικόνα 9) φαίνεται η δημιουργία του θύλακα πίεσης (3μs). Παρατηρούμε ότι καθώς ο χρόνος προχωράει ο θύλακας εκτονώνεται, όπως ήδη είπαμε πιο πάνω. Επίσης, παρατηρούμε ότι στα 69μs ο θύλακας έχει πλέον σπάσει και επειδή η εσωτερική του πίεση είναι μικρότερη από την εξωτερική, συρρικνώνεται μέχρι το διάλυμα να επανέλθει στην αρχική του κατάσταση, στο να μην έχουμε θύλακα πίεσης, «μετά την εναπόθεση» εικόνα.

Παρακάτω, που θα γίνει αναφορά στα πειράματα, θα γίνει εμφανής ο λόγος που επιθυμούμε βέλτιστη εναπόθεση. Πριν όμως φτάσουμε σε εκείνο το σημείο, μπορούμε να δείξουμε ενδεικτικά εικόνες οπτικού μικροσκοπίου, που πάρθηκαν στο ΕΜΠ, που δείχνουν τις εναποτιθέμενες σταγόνες που προέκυψαν από την τεχνική του LIFT για διαφορετικές ενέργειες και να δούμε πόσο πολύ αλλάζει το μέγεθος τους.

Το διάλυμα προς εναπόθεση ήταν ολιγονουκλεοτίδια (probes) DNA (1M phosphate buffer pH8 με 2% soldium dodecyl sulphate (SDS)) σε επίπεδες επιφάνειες GOPTS/LTO/Si (σιλάνιο ακινητοποίησης) με LIFT για διαφορετικές εντάσεις της δέσμης του laser.



Εικόνα 10

Παρατηρούμε ότι σε χαμηλές ενέργειες η σταγόνα που εναποτίθεται είναι μικρή και ενδέχεται να μη γίνει καν η εναπόθεση της για την συγκεκριμένη απόσταση του στόχου με το υπόστρωμα δέκτη, ο οποίος φαίνεται στην εικόνα. Καθώς αυξάνεται η ενέργεια αυξάνεται και το μέγεθος της σταγόνας προς εναπόθεση, μέχρι να φτάσουμε τις υψηλές ενέργειες όπου οι σταγόνες είναι πολύ μεγάλες σε μέγεθος και ενδέχεται να αλληλεπικαλύπτονται.

Στο παραπάνω πείραμα καταλήγουμε ότι η βέλτιστη ένταση στο συγκεκριμένο πείραμα, με το συγκεκριμένο διάλυμα είναι 250mJ/cm^2, που είναι μια κοντινή τιμή με αυτή που βρήκαμε στο παραπάνω πείραμα με ένταση 263mJ/cm^2.

Άρα ανακεφαλαιώνοντας, δύο παράγοντες που πρέπει να ληφθούν υπόψιν για τη βέλτιστη εναπόθεση του διαλύματος που επιθυμούμε πάνω στον αισθητήρα είναι η ποσότητα του διαλύματος που τοποθετούμε πάνω στον στόχο και η ένταση της δέσμης του laser.

Εδώ αξίζει να σημειώσουμε ότι έχουν γίνει μελέτες και έχει βρεθεί ότι η δέσμη του laser που θερμαίνει τοπικά το στρώμα τιτανίου, δεν καταστρέφει τη λειτουργικότητα του διαλύματος του βιοϋλικού, όπως έχουν δείξει αρκετές μελέτες [9].

Γενικότερα έχουν γίνει πολλές μελέτες για εφαρμογές της τεχνικής του LIFT πάνω στον σχηματισμό των θυλάκων υψηλής πίεσης και στην εξάρτηση της έντασης της δέσμης με το σχήμα και μέγεθος της εναποτιθέμενης σταγόνας. Οι Duocastella et al. [10] πραγματοποίησαν εναπόθεση με διάλυμα που αποτελούνταν από νερό και γλυκερόλη (50%, v/v) με sodium dodecyl sulphate (SDS) σε συγκέντωση 2.0mg/mL, και μελέτησαν τον σχηματισμό του θύλακα πίεσης. Παρατήρησαν ότι με την απομάκρυνση του πλακιδίου quartz από την επιφάνεια προς εναπόθεση, μπορούμε να αποφύγουμε την επαφή του θύλακα με την επιφάνεια εναπόθεσης και να έχουμε το επιθυμητό αποτέλεσμα, μια σταγόνα στην επιφάνεια εναπόθεσης. Οι Duocastella et al. [11] πραγματοποίησαν και εναποθέσεις με πρωτεϊνικό διάλυμα, 10mg/mL BSA αναμειγμένο με νερό και γλυκερόλη, και τα δύο σε συγκέντρωση 50% (v/v). Από αυτά τα πειράματα βρήκαν ότι υπάρχει μια μέγιστη τιμή πάνω από την οποία έχουμε ακανόνιστες σταγόνες προς εναπόθεση με την παρουσία φαινομένων πιτσιλίσματος και σταγονιδίων δορυφόρων. Επίσης, οι Patrascioiu et al. [12] κάνανε εναπόθεση δύο διαφορετικών διαλυμάτων. Το πρώτο ήταν ένα βιομοριακό διάλυμα που περιείχε ανοσοσφαιρίνη G (IgG) μαζί με διάλυμα φωσφορικού ρυθμιστικού αλατούχου διαλύματος (PBS) και γλυκερόλη σε συγκέντρωση 0.05mg/mL, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για να βρεθεί η δυνατότητα δημιουργίας μικρογραφικών αισθητήρων, και το δεύτερο ήταν διάλυμα ανάμειξης νερού με γλυκερόλη (20%, v/v), το οποίο χρησιμοποιήθηκε για να εκτιμηθεί η επίδραση της ενέργειας του παλμού του laser στην μορφολογία των τυπωμένων σταγονιδίων. Διαπίστωσαν ότι είναι δυνατή η εναπόθεση ομοιόμορφων σταγονιδίων με μεγάλη αναπαραγωγιμότητα και οτι η διάμετρος των σταγονιδίων είναι γραμμικώς ανάλογη της ενέργειας της δέσμης του laser. Επιπλεόν, οι Brown et al. [13] πραγματοποίησαν πειράματα εναπόθεσης με υδατικό διάλυμα γλυκερόλης (50%, v/v) με Triton X-100 επιφανειοδραστική ουσία, και βγάλανε συμπεράσματα σχετικά με τους διαφορετικούς τύπους εναπόθεσης (gas-actuated liquid egection και blister-actuated liquid ejection) συγκρίνοντας την ταχύτητα δημιουργίας του θύλακα και τις επιφανειακές τάσεις που υπάρχουν στο στώμα απορρόφησης. Τέλος, οι Mezel C. et al. [14] πραγματοποίησαν δοκιμές ενπόθεσης νερού και μελέτησαν τη θερμική και υδροδυναμική μεταφορά που λαμβάνει χώρο στον σχηματισμό και ανάπτυξη του θύλακα πίεσης και διεξάγανε προσομοιώσεις μελετώντας τις διάφορες παραμέτρους που επηρεάζουν τη δημιουργία και ανάπτυξη του θύλακα.

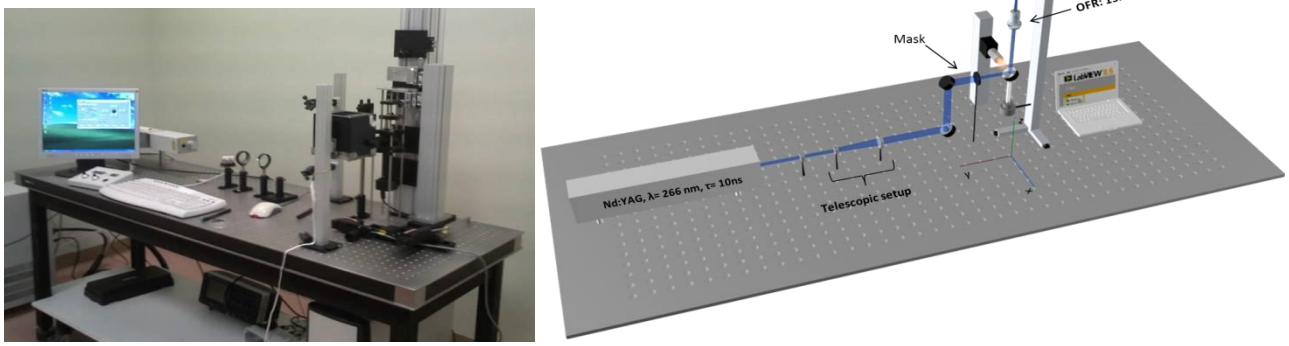
Κεφάλαιο 2

2.1 Πειραματική διάταξη

Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν πάνω σε έναν αυτοματοποιημένο σταθμό μικρομηχανικής ο οποίος μας επέτρεπε την εναπόθεση των υγρών υλικών προς μελέτη με τη βοήθεια ενός laser. Πιο αναλυτικά, η πειραματική μας διάταξη αποτελούνταν από:

- Πηγή laser Nd:YAG
- Οπτικά στοιχεία
    1. Εξασθενητή (attenuator)
    2. Σύστημα τηλεσκοπικών φακών
    3. Επίπεδα κάτοπτρα
    4. Μάσκα της δέσμης
    5. Αντικειμενικό φακό
- Βάση στήριξης των υποστρωμάτων δότη και δέκτη
- Κάμερα
- Διαχωριστή δέσμης
- Ηλεκτρονικό υπολογιστή
- Βηματικούς κινητήρες

Όλα τα οπτικά στοιχεία, η πηγή laser, η κάμερα και η βάση των υποστρωμάτων ήταν τοποθετημένα πάνω σε οπτικό τραπέζι και κατάλληλα ευθυγραμμισμένα μεταξύ τους. Η χρησιμότητα αυτής της διάταξης ήταν η δυνατότητα της απεικόνισης της μάσκας πάνω στο υπόστρωμα του δέκτη μέσω ενός αντικειμενικού φακού.



Εικόνα 11

Laser Nd:YAG

Το laser Nd:YAG (Neodymium-doped Yttrium Aluminium Garnet) ανήκει στην κατηγορία βαθμού 4 των laser. Αυτό σημαίνει ότι οι αρμονικές που εκπέμπει το laser μπορεί να προκαλέσουν:

1. βλάβες πάνω στον άνθρωπο (κάψιμο δέρματος ή βλάβη στο μάτι) από άμεση, έμμεση ή διαχεόμενη διάδοση της δέσμης
2. μπορεί να αναφλέξει εύφλεκτα υλικά, άρα να προκαλέσει πυρκαγιά.

Για αυτόν τον λόγο είναι σημαντικό να δίνεται προσοχή στην πορεία της δέσμης ώστε να αποφευχθούν οποιαδήποτε ατυχήματα ανάλογα με την αρμονική που χρησιμοποιείται.

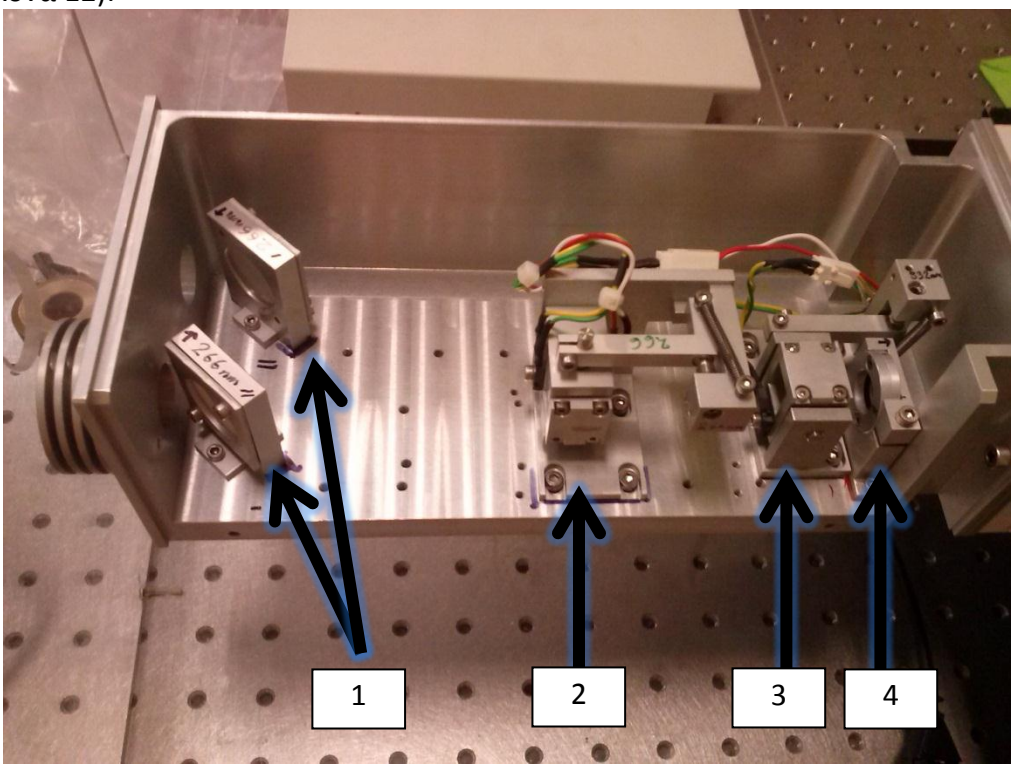
Οι αρμονικές συχνότητας που δίνει το laser Nd:YAG είναι οι:

- 1064 nm (βασική αρμονική)

- 532nm
- 355nm
- 266nm
- 213nm

Το laser που χρησιμοποιήθηκε στη διάταξη, έδινε τη δυνατότητα εκπομπής των τριών πρώτων αρμονικών πέραν από την βασική ($2^{η}$ 532nm, $3^{η}$ 355nm, $4^{η}$ 266 nm) με την χρήση κατάλληλων κρυστάλλων διπλασιασμού συχνότητας που βρίσκονταν μέσα στην κοιλότητα του laser (Εικόνα 12). Στη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε η $4^{η}$ αρμονική, 266 nm.

Το laser αποτελείται από δύο κοιλότητες. Στην πρώτη γίνεται η ενίσχυση των φωτονίων που μας δίνει τη δέσμη του laser και στη δεύτερη έχουμε τα οπτικά στοιχεία που ρυθμίζουν τις αρμονικές. Οι δύο αυτές κοιλότητες απομονώνονται από ένα παράθυρο (shutter), το οποίο μπορούμε να ρυθμίσουμε να ανοιγοκλείνει. Η δεύτερη κοιλότητα φαίνεται στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 12):



Εικόνα 12

Από τα δεξιά βγαίνει η δέσμη μέσα από την πρώτη οπτική κοιλότητα. Η δέσμη συναντά έναν half waveplate (4) και έπειτα συναντά έναν κρύσταλλο διπλασιασμού συχνότητας (3), που μετατρέπει τον παλμό από 1064nm σε 532nm. Έτσι, έχουμε τη δεύτερη αρμονική. Μετά από τον κρύσταλλου για το μήκος κύματος 532nm, η δέσμη συναντά έναν άλλον κρύσταλλο διπλασιασμού συχνότητας (2), που μετατρέπει τον παλμό από 532nm σε 266nm. Έτσι, έχουμε τελικά την τρίτη αρμονική. Μετά η δέσμη συναντά επίπεδους καθρέφτες στο μήκος κύματος 266nm που οδηγούν τη δέσμη έξω από τη δεύτερη οπτική κοιλότητα του laser.

Με τη βοήθεια ενός παλμογράφου και ενός ενεργόμετρου, το οποίο είχε τοποθετηθεί στο τελικό σημείο που η δέσμη του laser θα συναντούσε το υπόστρωμα του δότη (μετά τον αντικειμενικό φακό), μετρήσαμε τη διάρκεια ενός παλμού του laser και βρήκαμε ότι είναι 10ns.

Εξασθενητής δέσμης

Η χρήση του εξασθενητή είναι στο να εξασθενεί την έξοδο της δέσμης του laser. Καθώς στρίβουμε τον εξασθενητή ως προς τη δέσμη του laser, αυτός αντανακλά μέρος της δέσμης που βγαίνει από την κοιλότητα του laser, με αποτέλεσμα να έχουμε μικρότερη ένταση στη δέσμη μετά τον εξασθενητή. Έτσι, ο εξασθενητής ήταν τοποθετημένος πάνω σε μια περιστρεφόμενη βάση και ανάλογα με τη γωνία περιστροφής είχαμε και την ανάλογη εξασθένηση της έντασης της. Η περιστροφή του εξασθενητή ρυθμιζόταν από το πρόγραμμα LabView που ήταν εγκαταστημένο στον ηλεκτρονικό υπολογιστή.

Για να γνωρίζουμε την ένταση που θα είχε τελικά η δέσμη του laser για διαφορετικές γωνίες του εξασθενητή κάναμε μια βαθμονόμηση. Με τη βοήθεια και πάλι ενός ενεργόμετρου και ενός παλμογράφου, ακριβώς όπως και στη μέτρηση της διάρκειας του παλμού του laser, μετρήσαμε την τάση που έδειχνε ο παλμογράφος. Ο παλμογράφος είχε ρυθμιστεί κατάλληλα ώστε να δίνει μια μέση τιμή της τάσης, αφού πρώτα είχαν περάσει 16 παλμοί.

Για να μετατρέψουμε την τάση σε ενέργεια χρησιμοποιήσαμε την παρακάτω σχέση:

$$E = \frac{\Delta V}{1480}$$

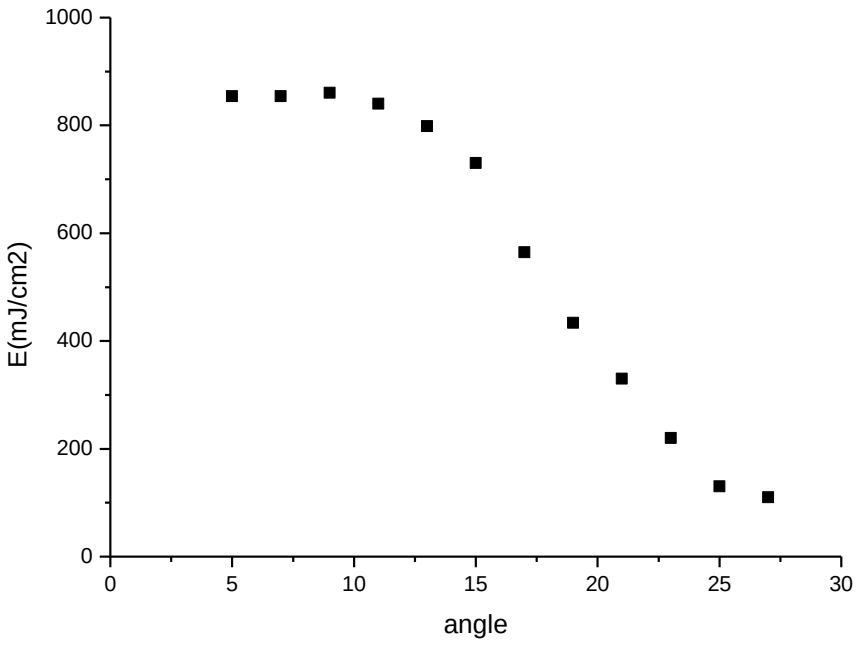
Για να μετατρέψουμε την ενέργεια σε ένταση της δέσμης διαιρούμε δια το εμβαδόν της επιφάνειας, που είναι ο κυκλικός δίσκος της δέσμης του laser. Το spot size, κυκλικός δίσκος, το υπολογίσαμε από την σκιά που άφηνε το laser πάνω στον στόχο στο σημείο που το έχει χτυπήσει η δέσμη. Βρήκαμε ότι ήταν 50μm.

Άρα, η παραπάνω σχέση γίνεται:

$$E\left(\frac{mJ}{cm^2}\right) = \frac{E(mJ)}{\pi R^2(cm^2)}$$

όπου R η ακτίνα του κυκλικού δίσκου.

Από την τελευταία σχέση προκύπτει η παρακάτω γραφική:



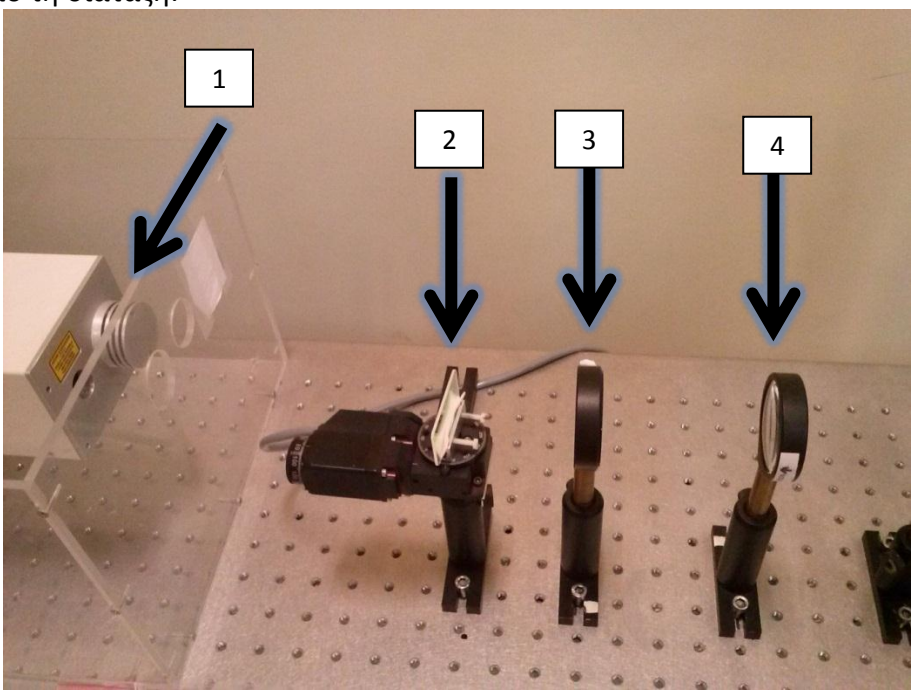
Σχήμα 1

Από την παραπάνω γραφική (Σχήμα 1) βλέπουμε το πόσο μειώνεται η ένταση της δέσμης με την αύξηση της γωνίας του εξασθενητή δέσμης.

Η σπουδαιότητα του εξασθενητή είναι πολύ μεγάλη στα πειράματα, αφού η τεχνική του LIFT βασίζεται στην ένταση που θα έχει η δέσμη του laser. Για διαφορετικές τιμές της έντασης της

δέσμης μπορούμε να έχουμε διαφορετικά αποτελέσματα στο πείραμα, όπως είχαμε δείξει νωρίτερα με τις Εικόνες 5,6 και 7.

Η δεύτερη οπτική κοιλότητα (1), ο εξασθενητής δέσμης (2) και το σύστημα των τηλεσκοπικών φακών, αποκλίνων (3) και συγκλίνων (4), παρουσιάζονται στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 13) από τη διάταξη:



Εικόνα 13

Σύστημα τηλεσκοπικών φακών

Μετά τον εξασθενητή είναι τοποθετημένο ένα σύστημα τηλεσκοπικών φακών, οι οποίοι μεγεθύνουν τη διάμετρο της δέσμης κατά δύο φορές. Οι φακοί αυτοί είναι πρώτα ένας αποκλίνων φακός UV (f=-100mm) και μετά ένας συγκλίνων φακός UV (f=200mm).

Ο λόγος που μεγεθύναμε τη δέσμη ήταν το γεγονός ότι δεν είχαμε μια τέλεια, ομοιογενή κατανομή της έντασης της δέσμης σε κάθε σημείο της διαμέτρου της λόγω ατελειών. Με τον διπλασιασμό της διαμέτρου της δέσμης καταφέρνουμε να έχουμε τη δυνατότητα επιλογής (με τη βοήθεια της μάσκας) ενός τμήματος της διευρυμένης διαμέτρου της δέσμης, το οποίο έχει όσο το δυνατόν πιο ομοιογενή ενέργεια σε κάθε σημείο της. Αυτή η ενεργειακή ομοιογένεια στην επιφάνεια της δέσμης θα έχει άμεσες συνέπειες και στην σταγόνα που θα εναποθέσουμε.

Εδώ αξίζει να σημειωθεί ότι οι δύο αυτοί φακοί λειτουργούσαν για όλα τα μήκη κύματος.

Επίπεδα κάτοπτρα

Μετά το σύστημα των τηλεσκοπικών φακών έχουμε δύο επίπεδα κάτοπτρα, τα οποία αντανακλούν πλήρως τη δέσμη του laser στο μήκος κύματος των 266nm. Η χρησιμότητα τους έγκειται στο να κατευθύνουν τη δέσμη σε μια πορεία που επιθυμούμε.

Παρακάτω είναι η εικόνα (Εικόνα 14) από το εργαστήριο των δύο επίπεδων κατόπτρων:

Εικόνα 14

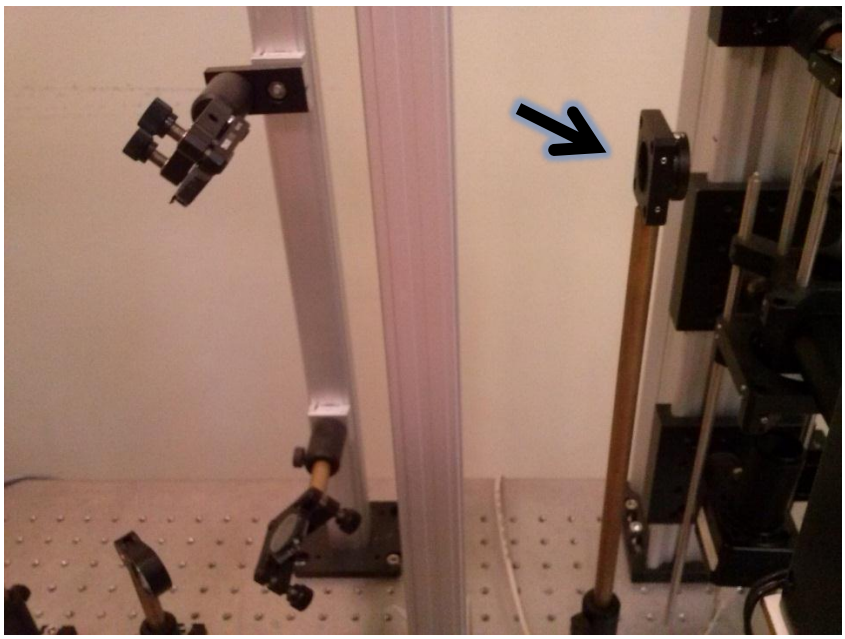
Μάσκα της δέσμης

Μετά τα δύο επίπεδα κάτοπτρα είναι τοποθετημένη η μάσκα. Η ίριδα της μάσκας είναι σε σχήμα πολυγώνου, το οποίο χρησιμοποιούμε προκειμένου να προσομοιώσουμε έναν κύκλο. Ο λόγος που επιθυμούμε κύκλο είναι το ότι χρησιμοποιούμε υγρά προς εναπόθεση τα οποία, λόγο των δυνάμεων που ασκούνται σε αυτά, δημιουργούν σταγόνες που έχουν σφαιρικό σχήμα. Αξίζει να σημειωθεί ότι ακόμα και αν χρησιμοποιούσαμε τετραγωνική ίριδα το υγρό προς εναπόθεση και πάλι θα ήταν ένας κύκλος από μια σφαιρική σταγόνα και αυτό οφείλεται στο ότι στο πείραμα είχαμε υγρά με ιξώδες κοντά στο νερό. Όμως, σε υγρά με πολύ μεγαλύτερο ιξώδες με μια τετραγωνική μάσκα το αποτέλεσμα θα ήταν κάτι ανάμεσα σε κύκλο και τετράγωνο.

Στους αισθητήρες χωρητικότητας που χρησιμοποιήσαμε είναι εξαιρετικά σημαντικό για τον αισθητήρα η σταγόνα προς εναπόθεση να έχει σφαιρικό σχήμα, λόγω του ότι η επιφάνεια προς εναπόθεση είναι ένας κυκλικός δίσκος. Επίσης, ο λόγος που χρησιμοποιούμε μια ίριδα αντί μιας σταθερής μάσκας είναι το γεγονός ότι με την ίριδα μπορούμε να έχουμε μία μάσκα για όλες τις σταγόνες που θέλουμε να εναποθέσουμε, δηλαδή μια μάσκα για σταγόνες με διαφορετική διάμετρο. Αν δεν ακολουθούσαμε αυτήν την λογική θα έπρεπε να έχουμε πολλές μάσκες που δεν είναι κάτι επιθυμητό λόγω και του υψηλού τους κόστος.

Άρα, ο λόγος που τελικά χρησιμοποιούμε την πολυγωνική ίριδα είναι το ότι είναι πιο κοντά σε αυτό που θέλουμε να έχουμε σαν τελικό αποτέλεσμα και είναι εύκολη η ρύθμιση του μεγέθους της.

Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 15) φαίνεται η μάσκα της δέσμης μαζί με τα δύο επίπεδα κάτοπτρα:



Εικόνα 15

Αντικειμενικός φακός

Ο αντικειμενικός φακός (LMU-15X-266) που χρησιμοποιήθηκε είναι 15x και είχε αριθμητικό άνοιγμα NA=0,32. Ο λόγος που τοποθετούμε τον αντικειμενικό φακό είναι για να πετύχουμε την εστίαση της δέσμης πάνω στο υπόστρωμα δότη. Παρόλα αυτά, η τοποθέτηση της μάσκας με τον αντικειμενικό φακό έχει ένα μεγάλο μειονέκτημα: το φαινόμενο της περίθλασης. Αυτό οφείλεται στο ότι καθώς η δέσμη περνάει μέσα από τη μάσκα, που είναι μικρότερη σε διάμετρο από την ίδια δέσμη, παρατηρούνται φαινόμενα περίθλασης. Γνωρίζουμε ότι αυτό θα μας δώσει κροσσούς συμβολής και αναίρεσης που φαίνονται σαν ομόκεντροι κύκλοι πάνω σε μια επιφάνεια. Για να αποφύγουμε αυτό το φαινόμενο θα πρέπει να λάβουμε υπόψιν τη βέλτιστη θέση απεικόνισης. Δηλαδή, θα πρέπει να προσπαθήσουμε όσο το δυνατόν πιο πολύ να βρούμε την ιδανική απόσταση της μάσκας με τον αντικειμενικό φακό, ώστε να μειωθούν τα φαινόμενα αυτά όσο το δυνατόν πιο πολύ.

Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 16) φαίνεται ο αντικειμενικός φακός μαζί με τις βάσεις των υποστρωμάτων δότη και δέκτη:

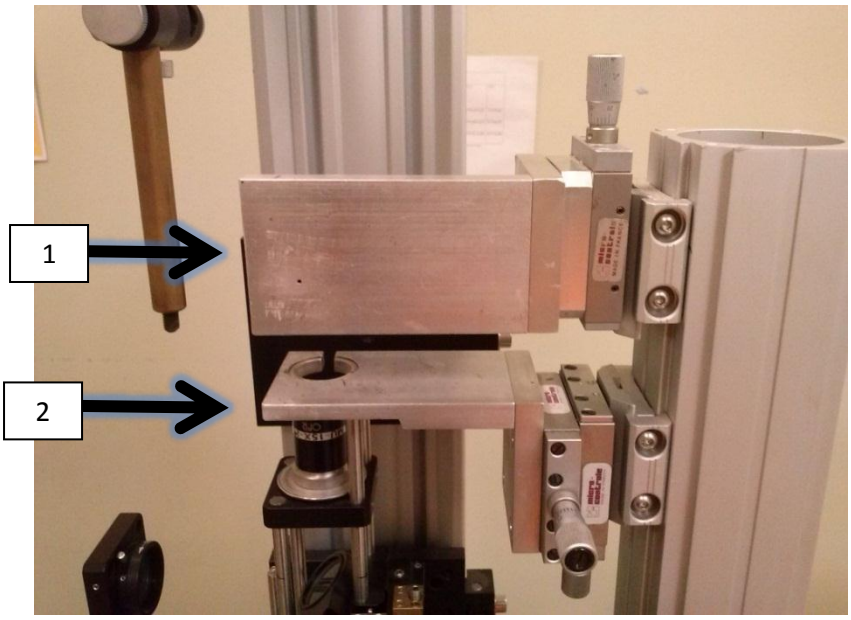
Εικόνα 16

Βάση στήριξης των υποστρωμάτων δότη και δέκτη

Οι δύο αυτές βάσεις είναι τοποθετημένες παράλληλα η μια από την άλλη ώστε το υπόστρωμα δότη να έχει απέναντί του, χωρίς επαφή, το υπόστρωμα δέκτη. Οι βάσεις αυτές είναι φτιαγμένες από αλουμίνιο και είναι συνδεδεμένες με δύο μικρομετρικά συστήματα κίνησης. Αυτά τα μικρομετρικά συστήματα κίνησης έδιναν τη δυνατότητα παράλληλης μετακίνησης (πάνω- κάτω) της βάσης του υποστρώματος δέκτη ως προς τη βάση του υποστρώματος δότη και άρα μας βοηθούσαν στο να ρυθμίζουμε την μεταξύ τους απόσταση. Η βάση του υποστρώματος δέκτη είχε και τη δυνατότητα της περιστροφής. Επίσης, τα μικρομετρικά συστήματα κίνησης επέτρεπαν τη μετακίνηση της βάσης του υποστρώματος δότη πάνω-κάτω και δεξιά-αριστερά, μόνο προς μια κατεύθυνση παράλληλη της επιφάνειας του.

Το υπόστρωμα δότη τοποθετούταν στην ειδική κοιλότητα που υπήρχε (Εικόνα 17) πάνω στην βάση του και το υπόστρωμα δέκτη τοποθετούταν με τη βοήθεια ρυτίνης πάνω στη βάση του.

Στην παρακάτω εικόνα βλέπουμε τις δύο αυτές βάσεις υποστρώματος, δότη (2) και δέκτη (1):



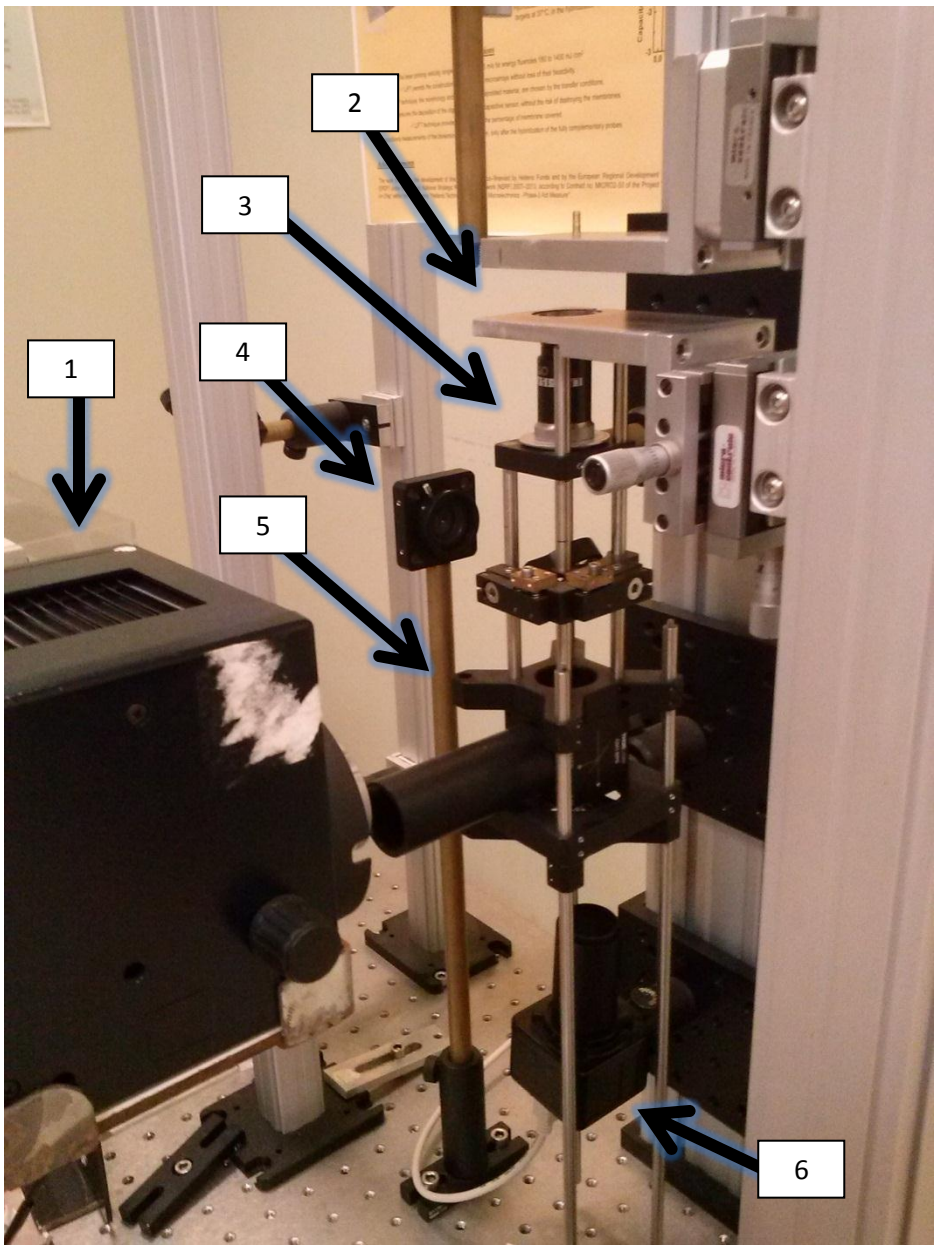
Εικόνα 17

Διαχωριστής δέσμης

Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων είχαμε τη δυνατότητα να βλέπουμε εμμέσως την εναπόθεση που λάμβανε χώρο. Αυτό γινόταν με τη βοήθεια μια κάμερας η οποία εστίαζε πάνω στο υπόστρωμα δότη από την πλευρά που το χτυπούσε η δέσμη του laser. Με αυτό μπορούσαμε να έχουμε μια αντίληψη για το που γίνεται η εναπόθεση, τη διάμετρο της δέσμης κτλ.

Ο διαχωριστής δέσμης χώριζε το φως, που στέλναμε με μια απλή θερμιονική λάμπα, προς τα πάνω, στο υπόστρωμα δότη, και προς τα κάτω, στην κάμερα. Έτσι, ήταν δυνατό να βλέπουμε στιγμιαία που γινόταν η εναπόθεση ανά πάσα στιγμή. Αυτό πειραματικά είναι πολύ σημαντικό καθώς έχουμε επίγνωση του τί κάνουμε κατά τη διάρκεια του πειράματος και μπορούμε να έχουμε τον έλεγχο της εναπόθεσης.

Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 18) φαίνεται ο διαχωριστής δέσμης (5), η κάμερα (6), η θερμιονική λάμπα (1), οι βάσεις στήριξης των υποστρωμάτων (2), ο αντικειμενικός φακός (3) και η μάσκα της δέσμης (4).

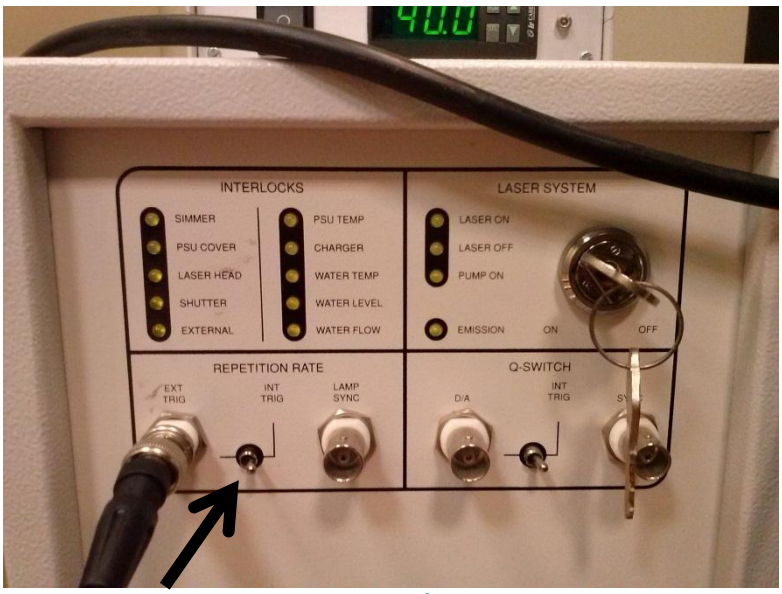


Εικόνα 18

Ηλεκτρονικός υπολογιστής

Στον ηλεκτρονικό υπολογιστή ήταν εγκατεστημένο το πρόγραμμα LabView το οποίο μας έδινε τη δυνατότητα να κάνουμε διάφορες ρυθμίσεις στο πείραμα μας. Αναλυτικότερα:

- Μπορούσαμε να ρυθμίσουμε arrays στα οποία να γινόταν εναπόθεση. Μέσω του προγράμματος μπορούσαμε να ρυθμίσουμε την απόσταση, και άρα τη συχνότητα, ανάμεσα στην κάθε εναπόθεση και τον αριθμό των στηλών και σειρών προς εναπόθεση. Αυτό γινόταν με τη βοήθεια των βηματικών κινητήρων.
- Μπορούσαμε να ρυθμίσουμε τις μοίρες του εξασθενητή μας απευθείας από τον υπολογιστή.
- Κάνοντας χρήση μιας ιδιότητας του laser, γυρνώντας έναν διακόπτη (Εικόνα 19), μπορούσαμε να έχουμε εξωτερική ελεγχόμενη πυροδότηση του laser, δηλαδή πατώντας ένα κουμπί στο LabView να εκπέμπεται ένας μόνο παλμός.



Εικόνα 19

- Υπολογίζοντας την περίοδο του παλμού, με τη βοήθεια του παλμογράφου και του ενεργόμετρου, και μετρώντας τη διάμετρο της τελικής δέσμης, μετά τον αντικειμενικό φακό, μπορούμε να ρυθμίσουμε τη γωνία του εξασθενητή και άρα την ένταση της τελικής δέσμης, ανάλογα με τι επιθυμούμε.

Βηματικοί κινητήρες

Οι βηματικοί κινητήρες ήταν συνδεδεμένοι με τον υπολογιστή και χρησίμευαν στην ταυτόχρονη μετατόπιση της βάσης υποστρώματος δέκτη και δότη δεξιά και αριστερά ως προς τον αντικειμενικό φακό. Με αυτόν τον τρόπο ήταν δυνατός ο σχηματισμός arrays από το προς εναπόθεση υλικό.

Κεφάλαιο 3

3.1 Αισθητήρες χωρητικότητας

Οι πρώτοι χωρητικοί μορφομετατροπείς εμφανίστηκαν στο τέλος του 1980 και όπως είχαμε αναφέρει νωρίτερα, αυτού του τύπου οι βιοαισθητήρες βασίζονται στην αλλαγή της διηλεκτρικής σταθεράς του μέσου στην περιοχή όπου βρίσκεται ο βιοϋποδοχέας, λόγω της βιολογικής αντίδρασης που πραγματοποιείται. Τέτοιες αντιδράσεις μπορεί να είναι η υβριδοποίηση του DNA, η αλληλεπίδραση αντιγόνου-αντισώματος κ.ά.

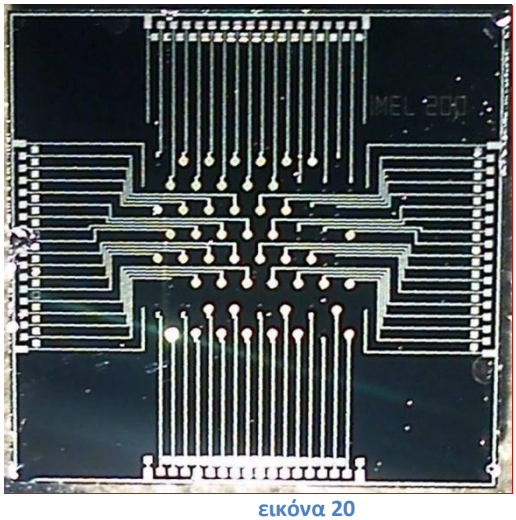
Οι βιοαισθητήρες αυτού του τύπου είναι εξαιρετικά χρήσιμοι γιατί πάνω στο ίδιο υπόστρωμα πυριτίου μπορούμε να έχουμε τους ενεργοποιητές και τα ηλεκτρονικά, το οποίο μειώνει αισθητά το κόστος, που είναι ένας σημαντικός παράγοντας στη βιομηχανία. Τέλος, μια άλλη πολύ χρήσιμη ιδιότητα των αισθητήρων αυτών είναι το ότι μπορεί να γίνει ταυτόχρονα πολλαπλή ανίχνευση. Δηλαδή, σε διαφορετικές μεμβράνες να γίνεται εναπόθεση διαφορετικών ολιγονουκλεοτιδίων.

Το σήμα που λαμβάνουμε από αυτού του τύπου τους αισθητήρες είναι ουσιαστικά από τα ακινητοποιημένα μόρια (probe molecules), το οποίο δένετε επιλεκτικά με συγκεκριμένους αναλύτες ή μοριακούς στόχους (target molecule). Έτσι, ο μορφομετατροπέας μετατρέπει την αλληλεπίδραση του probe-target σε μετρήσιμο σήμα.

Για να επιβεβαιώσουμε και με άλλους τρόπους, πέρα από την αλλαγή στη διηλεκτρική σταθερά, για το αν πραγματοποιείται η κάθε αντίδραση probe-target μπορούμε να επισημάνουμε τους βιοαισθητήρες με δείκτες. Αυτοί οι δείκτες, που μπορεί να είναι τοποθετημένοι στα probes ή/και στα target, έχουν δείκτες φθορισμού (ενεργά ένζυμα, κβαντικές τελείες κ.ά.) πάνω τους. Η επισήμανση μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε πριν την αλληλεπίδραση, είτε ένα στάδιο μετά την πρόσδεση στα στοιχεία ανίχνευσης. Με αυτόν τον τρόπο, καθώς γίνεται η εναπόθεση των μικροσυστοιχειών στην επιφάνεια του μορφομετατροπέα, με την πραγματοποίηση της αντίδρασης μπορούμε να πάρουμε σήμα από του δείκτες φθορισμού. Εδώ αξίζει να σημειωθεί ότι ανάλογα με το κάθε πείραμα μπορούμε να λαμβάνουμε σήμα μετά την βιολογική αντίδραση ή να εξαφανίζεται το σήμα που υπήρχε πριν την αντίδραση. Αυτό εξαρτάται από το πείραμα που μελετάμε κάθε φορά.

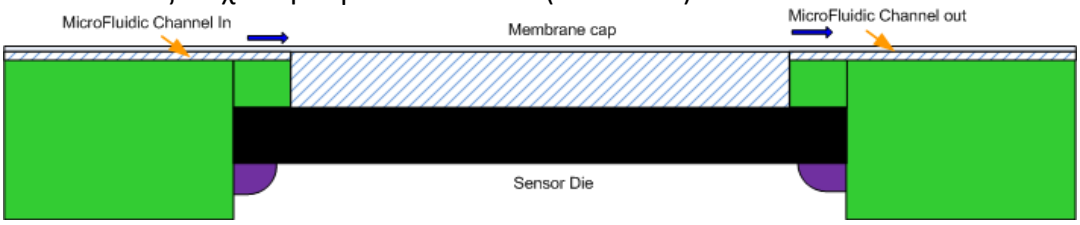
Ένα μειονέκτημα της επισήμανσης με δείκτες φθορισμού είναι το ότι είναι χρονοβόρες, ακριβές και ενδέχεται να επηρεάσουν την αλληλεπίδραση probe και target. Επίσης, η αλληλεπίδραση δεν μετριέται σε πραγματικό χρόνο και τα μηχανήματα που χρειάζονται για την τεχνική αυτή είναι ογκώδη και υψηλού κόστους.

Παρακάτω είναι μια εικόνα (Εικόνα 20) του βιοαισθητήρα χωρητικότητας που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα.



εικόνα 20

Αν κάνουμε μια τομή στον αισθητήρα αυτόν κατά το πάχος του σε κάθε μεμβράνη, θα δούμε ότι είναι όπως δείχνει η παρακάτω εικόνα (Εικόνα 21):



Εικόνα 21

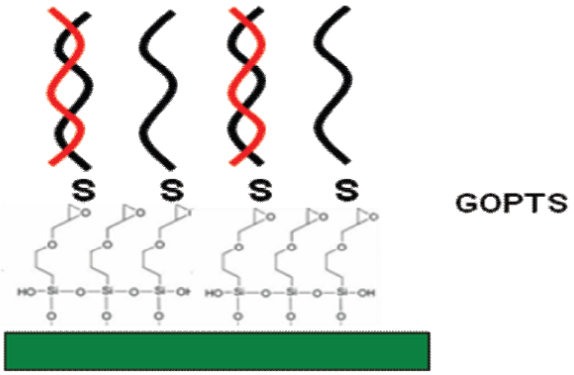
Οι βιοαισθητήρες αυτοί, με εξηντατέσσερεις (64) υπέρλεπτες μεμβράνες στην επιφάνεια τους, βασίζονται στην κάμψη αυτής της υπέρλεπτης μεμβράνης, η οποία επιφέρει αλλαγή στην απόσταση ανάμεσα στους δύο οπλισμούς. Πάνω σε αυτές τις υπέρλεπτες μεμβράνες κάνουμε την ακινητοποίηση των βιομορίων (probes). Καθώς αλληλεπιδρούν τα probes με τα target, κατά την υβριδοποίηση, παρουσιάζονται επιφανειακές τάσεις πάνω στη μεμβράνη που επιφέρουν την κάμψη της. Η προέλευση των επιφανειακών τάσεων που παράγονται από την υβριδοποίηση των βιομορίων δεν είναι ακόμα πολύ κατανοητές και έχουν γίνει πολλές υποθέσεις στο τι μπορεί να τις προκαλεί. Κάποιοι θεωρούν ότι οι τάσεις οφείλονται σε στερεοχημική παρεμπόδιση ανάμεσα στα ακινητοποιημένα ssDNA (single strand DNA) μόρια, ενώ άλλοι προτείνουν ότι η ηλεκτροστατική άπωση που αναπτύσσεται μεταξύ των υβριδοποιημένων αλυσίδων DNA είναι η αιτία δημιουργίας τάσεων. Επίσης, παρουσιάστηκε και η θεωρία της διαμορφωτικής εντροπίας των μορίων του DNA, που όμως είναι πιο πιθανή σε επιφάνειες αισθητήρων με πρωτεΐνες. Τέλος, διαπιστώθηκε ότι η επιφανειακή τάση είναι ανεξάρτητη του μοριακού μήκους της αλυσίδας του DNA. Όμως, όσο και αν διαφέρουν οι ερμηνίες αυτές ως προς την πηγή των τάσεων, είναι ευρέως αποδεχτό ότι η επίτευξη υψηλής πυκνότητας σε υβριδοποιημένες αλυσίδες DNAθα βελτιώσει την απόδοση του ανιχνευτή [15].

Η κατασκευή των αισθητήρων που χρησιμοποιήσαμε στα πειράματα πραγματοποιήθηκε στο Ινστιτούτο Μικροηλεκτρονικής του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. Δημόκριτος.

3.2 Πρωτόκολλο ακινητοποίησης ολιγονουκλεοτιδίων στην επιφάνεια GOPTS/LTO

Για να είναι δυνατή η διεξαγωγή των πειραμάτων, θα πρέπει να βεβαιωθούμε ότι τα υλικά προς εναπόθεση θα ακινητοποιηθούν [15] πάνω στην υπέρλεπτη μεμβράνη του αισθητήρα, όπως ήδη αναφέρθηκε παραπάνω. Αυτό θα γίνει με χημική πρόσδεση των ουσιών, ώστε να πετύχουμε πρόσδεση πυκνών διατάξεων από τα βιομόρια πάνω στη μεμβράνη. Για αυτό πριν από την εναπόθεση των ολιγονουκλεοτιδίων, γίνανε διάφορες δοκιμές πάνω σε LTO/Si ώστε να δούμε ποιός συνδυασμός θα έδινε τα καλύτερα αποτελέσματα. Οι δοκιμές πραγματοποιήθηκαν στην Ακαδημία Αθηνών. Εδώ πρέπει να αναφέρουμε ότι τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται στην ακινητοποίηση έχουν μεγάλη ιοντική ισχύ και συγκεκριμένα το GOPTS (3-glycidoxypropyltrimethoxysilane) προσδένεται στα ελεύθερα υδροξύλια του πυριτίου.

Μετά από την ενεργοποίηση της επιφάνειας με GOPTS, οι επιφάνειες τροποποιούνται με PDITC το οποίο φέρει δύο ομάδες N=C=S ομάδες στα άκρα και άρα συνδέεται από τη μία πλευρά με τις ελεύθερες αμινομάδες και από την άλλη πλευρά με τα τροποποιημένα ολιγονουκλεοτίδια. Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 22) παριστάνεται η ακινητοποίηση των ολιγονουκλεοτιδίων πάνω στην επιφάνεια τροποποιημένων μεμβρανών με GOPTS:



Εικόνα 22

1. Ενεργοποίηση της επιφάνειας

1. Ξέπλυμα του δείγματος δύο φορές με 95% αιθανόλη.
2. Το δείγμα αναδεύεται σε διάλυμα 2% 3-glycidoxypropyltrimethoxysilane (GOPTS) σε 95% αιθανόλη για 6 ώρες στους 37°C.
3. Στεγνώνονται με αέρα και ψήνονται στους 135°C για μια ώρα.

2. Ακινητοποίηση των νουκλεϊκών οξέων

1. Τα τροποποιημένα με θειόλη νουκλεϊκά οξέα (1μM) ακινητοποιούνται σε διάλυμα 1.0M potassium phosphate buffer (pH 8).
2. Τα δείγματα ξεπλένονται σε διάλυμα 10mM NaCl σε 5mM Tris buffer (pH 7.4).
3. Στην αδρανοποίηση των επιφανειών, τα δείγματα τοποθετούνται σε διάλυμα 1M MCH (mercaptohexanol) για 1 ώρα και έπειτα ξεπλένονται σε διάλυμα 10mM NaCl σε 5mM Tris buffer (pH 7.4), όπως και παραπάνω, και στεγνώνονται με άζωτο.

3. Υβριδοποίηση συμπληρωματικών νουκλεϊκών οξέων

Η υβριδοποίηση πραγματοποιείται σε διάλυμα 1.0M potassium phosphate buffer (pH 8) για 1 ώρα στους 37°C και ακολουθεί ξέπλυμα σε διάλυμα 10mM NaCl σε 5mM Tris buffer (pH 7.4) και στεγνώνονται με άζωτο.

Κεφάλαιο 4

4.1 Σύντομη βιβλιογραφική αναφορά στην υβριδοποίηση ολιγονουκλεοτιδίων

Έχουν γίνει πολλά πειράματα για τον έλεγχο της υβριδοποίησης των ολιγονουκλεοτιδικών αλυσίδων που είχαν εναποτεθεί σε επιφάνειες με την τεχνική του LIFT [16]. Ενδεικτικά, οι Colina M. et al. [9] κάνανε δοκιμές με LIFT για εναπόθεση cDNAs και μελέτησαν την υβριδοποίηση της αλυσίδας προς εναπόθεση με την συμπληρωματική της. Το σήμα που παίρνανε ήταν βασισμένο σε φθοριοχρωματικές ουσίες. Με αυτήν την έρευνα βγάλανε συμπεράσματα ως προς τη μη αλλοίωση της αλυσίδας cDNA, λόγω της θερμότητας του δέσμης του laser που θερμαίνει τον στόχο, και το σχήμα των σταγόνων που εναποτίθενται. Επίσης, οι Hansen et al. [17] ανιχνεύσανε την υβριδοποίηση ssDNA αλυσίδων με αισθητήρες μικροπροβόλου (microcantilivers). Παρόμοιες μελέτες έκαναν και οι McKendry et al. [18] όπου ανιχνεύσανε ταυτόχρονα, με ίδιου τύπου αισθητήρες, την υβριδοποίηση πολλαπλών ολιγονουκλεοτιδικών αλυσίδων. Επιπλέον, οι Zebda et al. [19] πραγματοποίησαν πειράματα όπου μελετούσαν την υβριδοποίηση ssDNA αλυσίδων. Αυτό το πετυχαίνανε με μετρήσεις της αλλαγής της αντίστασης στο ημιαγώγιμο ηλεκτρόδιο οξειδίου κατά τη διάρκεια της υβριδοποίησης.

4.2 Ολιγονουκλεοτίδια για ανίχνευση ενός miss-match

Από τον κλάδο της ιατρικής είναι γνωστό ότι διάφορες γενετικές ασθένειες προκαλούνται από ατέλειες στο DNA. Οι ατέλειες στην αλληλουχία των νουκλεϊκών οξέων έχουν σαν συνέπεια τη μη πλήρη συμπλήρωση των δίκλωνων αλυσίδων μεταξύ τους. Για να πραγματοποιηθούν πειράματα πάνω σε αυτού του τύπου τις ασθένειες θα πρέπει να έχουμε ανθρώπινο δείγμα DNA. Λόγω προβλημάτων στη λήψη τέτοιων δειγμάτων, αναπτύχθηκε μια χρονοβόρα, επαναληπτική και πολύ επιλεκτική τεχνική κατασκευής αλυσίδων DNA (απτίνες, DNAzyme και RNAzyme), οι οποίες προσομοιάζουν όσο το δυνατόν πιο πολύ τη βιολογική αλληλουχία του DNA. Η τεχνική αυτή ονομάζεται SELEX (systemic evolution of ligands by exponential enrichment). Έτσι, πραγματοποιούμε πειράματα με τεχνητές αλυσίδες DNA. Αυτές προφανώς είναι ειδικά σχεδιασμένες για την κάθε εφαρμογή τους.

Για τα πειράματα ανίχνευσης της υβριδοποίησης είχαμε τρείς μονόκλωνες αλυσίδες ολιγονουκλεοτιδίων:

	Αλληλουχία
Ολιγομερή ανιχνευτές (probes)	5’-HS-$(CH_2)_6$-TAG CCG ATA TGC GCA-3’-FAM
	5’-HS-$(CH_2)_6$-TAG CCG AGA TGC GCA-3’-FAM
	5’-HS-$(CH_2)_6$-GTT GAC CTG GTC GTC-3’-FAM
Ολιγομερή στόχοι (target)	3’-ATC GGC TAT ACG CGT-5’-Texas Red

Από τη βιολογία γνωρίζουμε ότι η γουανίνη (G) είναι συμπληρωματική με την κυτοσίνη (C) και η αδενίνη (A) με την θυμίνη (T) στο DNA. Άλλοι συνδυασμοί δεν είναι επιτρεπτοί.

Η κάθε αλυσίδα από τα probes όταν ενωνόταν με το target μας έδινε διαφορετικά αποτελέσματα. Έτσι, η πρώτη αλληλουχία probes 5’-HS-$(CH_2)_6$-TAG CCG ATA TGC GCA-3’-FAM όταν βρεθεί με την αλληλουχία του target, 3’-ATC GGC TAT ACG CGT-5’-Texas Red, έδινε μια τέλεια δίκλωνη αλυσίδα DNA χωρίς ατέλειες στις ενώσεις, καθώς τα νουκλεοτίδια είναι πλήρως συμπληρωματικά. Σχηματικά αυτό θα είναι όπως στην εικόνα (Εικόνα 23):

Εικόνα 23

Η δεύτερη αλληλουχία probes 5’-HS-$(CH_2)_6$-TAG CCG A**G**A TGC GCA-3’-FAM παρατηρούμε ότι έχει ένα νουκλεϊκό οξύ (το σκούρο γράμμα) το οποίο δεν είναι συμπληρωματικό με το αντίστοιχο νουκλεϊκό οξύ στο target, 3’-ATC GGC TAT ACG CGT-5’-Texas Red. Άρα σε εκείνο το σημείο όταν θα έρθουν οι συμπληρωματικές αλυσίδες κοντά για να δημιουργήσουν μεταξύ τους δεσμούς, δεν θα ενωθούν στην μία αυτή βάση και άρα θα έχουμε μία ατέλεια στη δίκλωνη αλυσίδα DNA. Σχηματικά αυτό θα είναι όπως στην εικόνα (Εικόνα 24):

Εικόνα 24

Η τρίτη αλληλουχία probes 5’-HS-$(CH_2)_6$-GTT GAC CTG GTC GTC-3’-FAM παρατηρούμε ότι έχει πολλά νουκλεϊκά οξέα, τα οποία δεν είναι συμπληρωματικά με το αντίστοιχα νουκλεϊκά οξέα στο target, 3’-ATC GGC TAT ACG CGT-5’-Texas Red. Άρα λόγω του ότι έχουμε πολλά σημεία όπου δεν συμπληρώνονται τα νουκλεϊκά οξέα, δεν θα έχουμε τον σχηματισμό δίκλωνης αλυσίδας DNA. Σχηματικά αυτό θα είναι όπως στην εικόνα (Εικόνα 25):

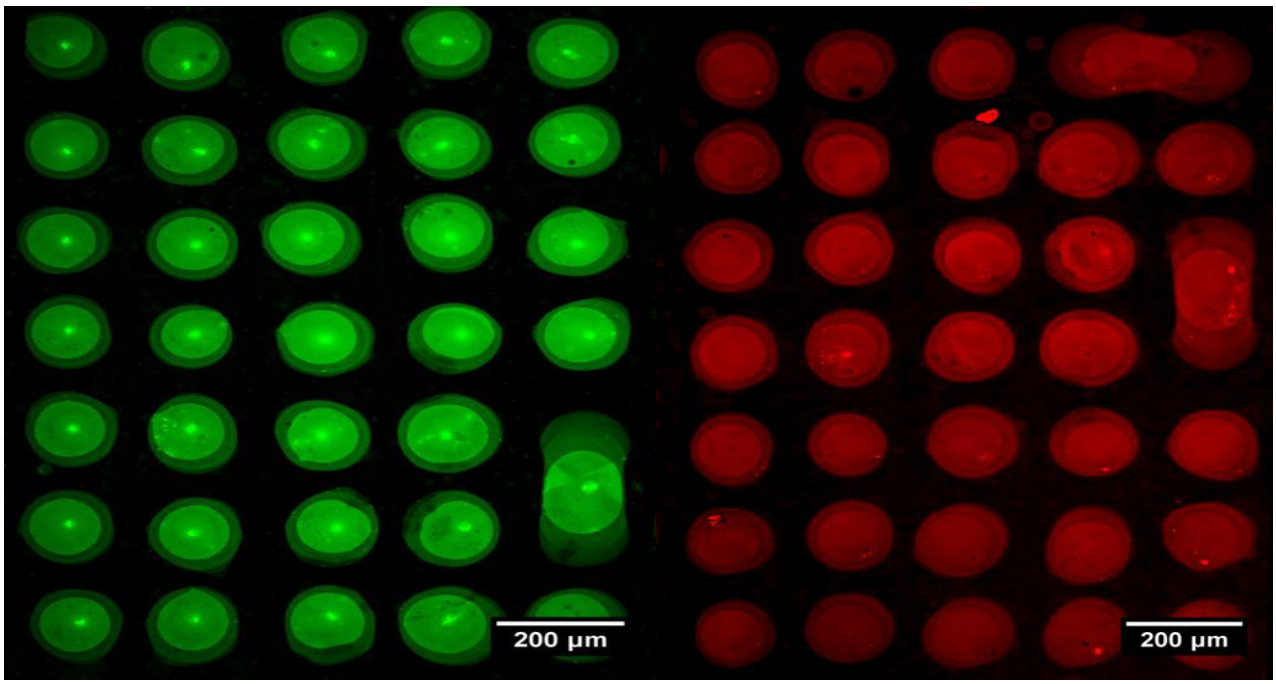
Εικόνα 25

4.2.1 Πειραματικές δοκιμές υβριδοποίησης

Λόγω του ότι γίνεται έλεγχος της υβριδοποίησης των δύο αλυσίδων των ολιγονουκλεοτιδίων πριν τη διεξαγωγή των πειραμάτων, κάνουμε δοκιμές για να βρεθεί η βέλτιστη συγκέντρωση των probes, ώστε να έχουμε το βέλτιστο αριθμό υβριδοποιημένων probes. Επειδή η επιφάνεια των μεμβρανών είναι περιορισμένη, είναι περιορισμένος ο χώρος που θα καταλάβουν οι δίκλωνες αλυσίδες όταν σχηματιστούν. Έτσι, θα πρέπει να βρούμε την αναλογία σε probes που θα ακινητοποιήσουμε, ώστε μετά την υβριδοποίηση να έχει καλυφτεί όσο το δυνατόν πιο πολύ η επιφάνεια της μεμβράνης με τις δίκλωνες αλυσίδες.

Οι δοκιμές αυτές πραγματοποιήθηκαν στην Ακαδημία Αθηνών με πιπέτα σε επιφάνειες LTO/Si τροποποιημένες με GOPTS με διαφορετικές συγκεντρώσεις ολιγονουκλεοτιδίων μέσα στο διάλυμα.

Οι εικόνες που πήραμε από την υβριδοποίηση με το συνεστιακό μικροσκόπιο Leica φαίνονται στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 26) [15]:



Εικόνα 26 [13]

Στα αριστερά παρατηρούμε τα εναποτιθέμενα ολιγονουκλεοτίδια (probes), στα οποία έχουμε επισημάνει με δείκτη φθορισμού Fluorescein (πράσινο χρώμα) και στα αριστερά παρατηρούμε τα υβριδοποιημένα πλέον ολιγονουκλεοτίδια. Το κόκκινο χρώμα που βλέπουμε μετά την υβριδοποίηση οφείλεται στον δείκτη φθορισμού Texas Red που έχουμε τοποθετήσει στην άκρη της αλυσίδας του target.

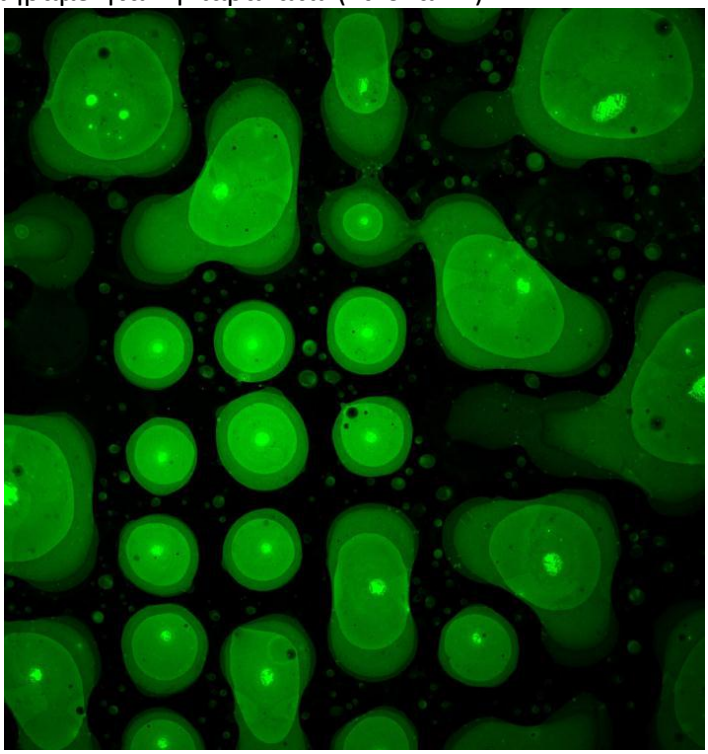
Εδώ αξίζει να σχολιαστεί το στεφάνι που παρατηρούμε γύρω από τις σταγόνες. Αυτό πιθανώς να οφείλεται σε συρρίκνωση των εναποτιθέμενων σταγόνων στο κέντρο της σταγόνας, με αποτέλεσμα να έχουμε κάποια ολιγονουκλεοτίδια που έχουν παραμείνει στην αρχική τους θέση εναπόθεσης στην άκρη της σταγόνας.

Από τις παραπάνω εικόνες παρατηρούμε τη μεγάλη επιλεκτικότητα στην υβριδοποίηση των νουκλεϊκών αλυσίδων μεταξύ τους καθώς μπορούμε να δούμε τον δείκτη φθορισμού Texas Red μόνο στα σημεία που υπήρχαν αρχικά τα probes. Βρέθηκε ότι η φωτεινότητα των περιοχών με τον δείκτη φθορισμού είναι 6 φορές πιο φωτεινή από τις γύρω σκοτεινές περιοχές. Τέλος, το σήμα του φθορισμού είναι ομοιόμορφο σε όλες τις σταγόνες γεγονός που μας δείχνει το ότι η

κατανομή των ολιγονουκλεοτιδίων πάνω στην επιφάνεια είναι ομοιόμορφη και δεν έχουμε την παρουσία συσσωματωμάτων.

Όμως, γνωρίζουμε ότι η μορφολογία των σταγόνων εξαρτάται από την ένταση της δέσμης του laser. Για αυτό, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές για να βρεθεί το κατά πόσο πολύ διατηρείται η ομοιομορφία των ολιγονουκλεοτιδίων πάνω στην επιφάνεια. Έτσι, έγιναν δοκιμές με ένταση του laser 500mJ/cm^2, απόσταση ανάμεσα των κέντρων στην κάθε σταγόνα 200μm και spot size 50μm.

Η εικόνα που πήραμε ήταν η παρακάτω (Εικόνα 27):

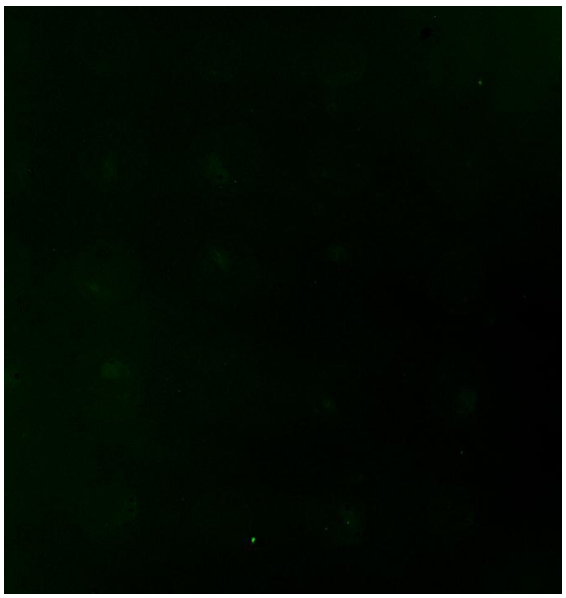


Εικόνα 27

Εδώ παρατηρούμε ότι λόγω της υψηλής ενέργειας έχει χαθεί η μορφολογία των εναποτιθέμενων σταγόνων, και έτσι λαμβάνουμε μη ομοιόμορφες κατανομές σταγόνων. Για αυτό το λόγο παρατηρούμε, επίσης, και μία μη ομοιομορφία στο σήμα του φθορισμού. Τέλος, παρατηρούμε ότι έχουμε μεγαλύτερο αριθμό μικρότερων σταγόνων γύρω από τα σημεία εναπόθεσης (splash φαινόμενο). Παρόλα αυτά παρατηρούμε ότι με την αύξηση της ενέργειας αισθητά δεν έχουν χάσει τα βιοϋλικά την βιοενεργότητα τους.

Επίσης, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές και σε μη ακινητοποιημένα probes. Σε αυτές τις δοκιμές παρατηρήσαμε ότι δεν ήταν δυνατό να πάρουμε σήμα από την υβριδοποίηση των συμπληρωματικών αλυσίδων, καθώς τα probes ξεπλένονταν από την επιφάνεια των πλακιδίων LTO/Si καθώς περνούσε το διάλυμα με τα target και έτσι, τελικώς, δεν έμεναν probe αλυσίδες πάνω στην επιφάνεια.

Η εικόνα που πήραμε ήταν η παρακάτω (Εικόνα 28):



Εικόνα 28

4.2.2 Εναπόθεση ολιγονουκλεοτιδίων στους αισθητήρες χωρητικότητας και πειραματικά αποτελέσματα από την υβριδοποίηση τους

Τα ολιγονουκλεοτίδια (probes), προς εναπόθεση, που χρησιμοποιήσαμε στα πειράματα με τους αισθητήρες, ήταν σε 1M phosphate buffer pH8 με 2% soldium dodecyl sulphate (SDS). Το SDS χρησιμοποιήθηκε με σκοπό να ομοιομορφοποιεί το στρώμα του διαλύματος που τοποθετούμε πάνω στο τιτάνιο (στόχος). Έτσι, πάνω στο τιτάνιο (στόχο) τοποθετήσαμε 10μL από το διάλυμα και με την τεχνική του LIFT και πραγματοποιήσαμε εναπόθεση πάνω στους αισθητήρες χωρητικότητας. Η επιφάνεια του αισθητήρα είχε τροποποιηθεί με επίστρωση από το σιλάνιο GOPTS.

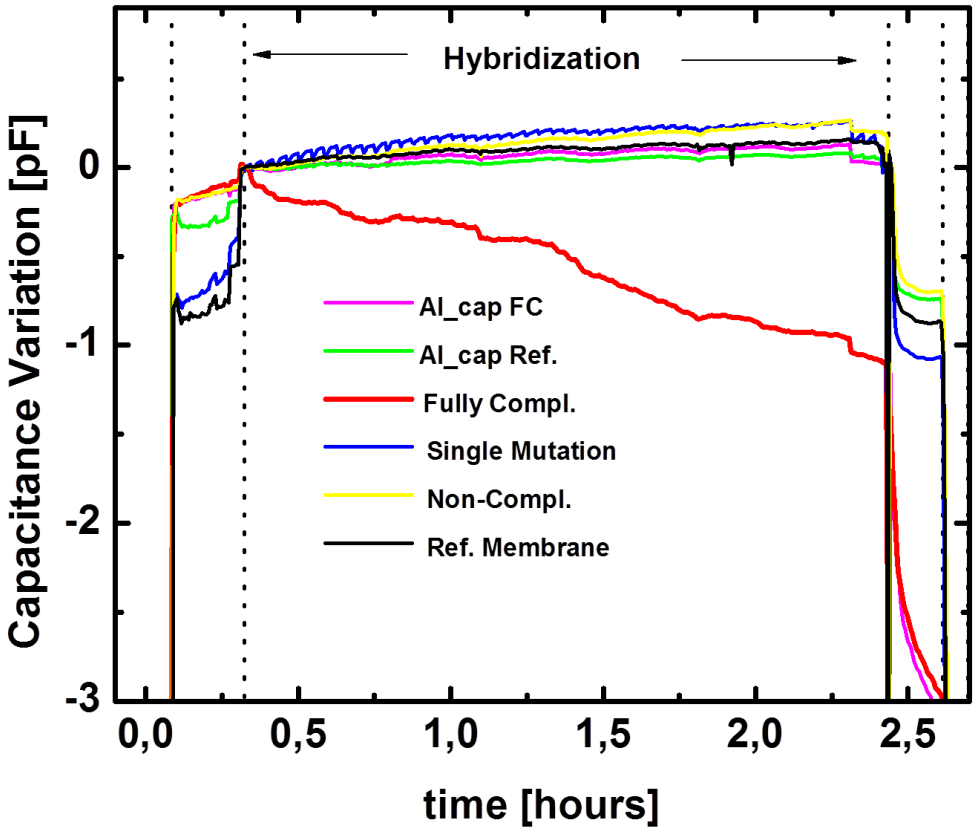
Η παρακάτω εικόνα από οπτικό μικροσκόπιο δείχνει έναν τέτοιο αισθητήρα με τις εναποτιθέμενες σταγόνες των probes:

Εικόνα 29

Η ενέργεια εναπόθεσης και το μέγεθος του spot size είχαν ρυθμιστεί κατάλληλα ώστε η σταγόνα προς εναπόθεση να καλύπτει το 70% της μεμβράνης. Έτσι είχαμε ένταση της δέσμης του laser 250mJ/cm^2 και spot size 50μm.

Πάνω στον ίδιο αισθητήρα κάναμε εναπόθεση και των τριών αλληλουχιών των probes, χωρίζοντας τον αισθητήρα σε περιοχές όπου θα εναποθέταμε την κάθε αλληλουχία.

Τα αποτελέσματα που πήραμε φαίνονται στην παρακάτω γραφική σχήμα (Σχήμα 2):



Σχήμα 2

Εδώ αξίζει να αναφέρουμε ότι πριν τοποθετήσουμε τον αισθητήρα στον θάλαμο υβριδοποίησης, βάλαμε τον αισθητήρα για μία ώρα σε μερκατοεξανόλη (MCH). Επίσης, τα πρώτα πέντε λεπτά μέσα στον θάλαμο υβριδοποίησης περνάει αέρας. Έπειτα, περνάει 1.0M potassium phosphate buffer pH8 για να προετοιμαστεί η επιφάνεια του αισθητήρα για την υβριδοποίηση. Με την σταθεροποίηση της μέτρησης της χωρητικότητας σε περίπου μισή ώρα, περνάει το διάλυμα της υβριδοποίησης, 1.0M potassium phosphate buffer pH8 και η συμπληρωματική αλυσίδα (target) (10μM) και αφήνεται μέχρι να τελειώσει η υβριδοποίηση σε περίπου δύο ώρες.

Στις μετρήσεις επιλέξαμε τρείς μεμβράνες που είχαν πάνω τις τρείς διαφορετικές αλληλουχίες ολιγονουκλεοτιδίων, που περιγράψαμε πιο πάνω, μαζί με τον πυκνωτή αλουμινίου και μια μεμβράνη στην οποία δεν είχε γίνει εναπόθεση. Όπως αναμένουμε, λόγω των δυνάμεων που δημιουργούνται από την υβριδοποίηση των αλυσίδων έχουμε παραμόρφωση των μεμβρανών και άρα αλλαγή της χωρητικότητας.

Αναλυτικότερα, παρατηρούμε τις εξής μεταβολές:

1. Η μεμβράνη με τα πλήρως συμπληρωματικά ολιγονουκλεοτίδια έχει μια αύξηση στην χωρητικότητα καθώς περνάει το 1.0M potassium phosphate buffer pH8 στα πρώτα πέντε λεπτά, ενώ καθώς περνάει το διάλυμα της υβριδοποίησης έχουμε μείωση της χωρητικότητας. Η μείωση αυτή είναι από 6pF σε -1.2pF. Καθώς συνεχίζεται η υβριδοποίηση έχουμε επιπλέον μείωση της χωρητικότητας του πυκνωτή σε -23pF. Το γεγονός ότι έχουμε συνεχής μείωση της χωρητικότητας μας δείχνει ότι δεν υβριδοποιούνται όλες μαζί οι αλυσίδες.
2. Η μεμβράνη με το miss-match είχε μεταβολή στην χωρητικότητα καθώς περνούσε το buffer, αλλά κατά τη διάρκεια της υβριδοποίησης παρέμεινε σχετικά σταθερή. Η αλλαγή κατά την υβριδοποίηση ήταν από -0.8 έως -0.3pF.

3. Η μεμβράνη με τις μη συμπληρωματικές αλυσίδες, είχε την ίδια συμπεριφορά με τη μεμβράνη στην οποί δεν είχε γίνει ακινητοποίηση ολιγονουκλεοτιδίων και με τον πυκνωτή αλουμινίου. Αυτό το αναμέναμε καθώς η υβριδοποίηση δεν λαμβάνει χώρο σε αυτές τις μεμβράνες, άρα είναι λογικό να μην αλλάζει το σήμα.

Λαμβάνοντας τα παραπάνω υπόψιν μπορούμε να πούμε ότι έγινε επιτυχής ανίχνευση της υβριδοποίησης των πλήρως συμπληρωματικών αλυσίδων. Για την αλυσίδα με το ένα miss-match δεν μπορούμε με βεβαιότητα να πούμε αν παρατηρήσαμε κάτι σχετικό με την υβριδοποίηση ή όχι. Από το σχήμα (Σχήμα 2) φαίνεται ότι δεν παίρνουμε κάποια μεγάλη αλλαγή στο σήμα της χωρητικότητας. Επίσης, παρατηρήθηκε και πειραματικά η αλλαγή της μεμβράνης του αισθητήρα και την βιοενεργότητα των βιοϋλικών που χρησιμοποιήσαμε και εναποθέσαμε με τη βοήθεια της τεχνικής LIFT.

Κεφάλαιο 5

5.1 Σύντομη εισαγωγή στην ανίχνευση βαρεών μετάλλων (Pb)

Μεγάλο ενδιαφέρον και ανησυχία προκαλεί στον παγκόσμιο χώρο η τοξικότητα των βαρέων μετάλλων και η συχνή και βλαβερή έκθεση των ανθρώπων σε αυτά μέσω του περιβάλλοντος. Ευαίσθητα θύματα αυτής της έκθεσης είναι μικρά παιδιά ειδικά σε μη ανεπτυγμένες χώρες [20]. Οι πηγές μόλυνσης από βαρέα μέταλλα ποικίλουν, όπως από ιστορικά κτήρια, από την ανακύκλωση βαρέων μετάλλων, από την κατασκευή προϊόντων με βαρέα μέταλλα κ.ά. Όμως μια σχετικά σημαντική πηγή μόλυνσης είναι το νερό.

Για να γίνει αντιληπτή η τοξικότητα των βαρέων μετάλλων, αν περάσουν ένα όριο σε ποσοστό μέσα στο ανθρώπινο σώμα, στα παιδία είναι περίπου 3μM [21], μπορούν να προκαλέσουν νευροπάθειες, εγκεφαλοπάθειας και σε πολύ προχωρημένο επίπεδο θάνατο.

Έτσι, πολλές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για να βρεθούν τρόποι ανίχνευσης βαρέων μετάλλων και ειδικά μολύβδου με διαφορετικές τεχνικές ανίχνευσης. Χαρακτηριστικά, πολλές έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί για να επιβεβαιωθεί η δυνατότητα ανίχνευσης μολύβδου με το σπάσιμο δύο συμπληρωματικών αλυσίδων DNA. Έτσι, διάφορες τεχνικές ανίχνευσης του βαρέως αυτού μετάλλου έχουν λάβει χώρο. Οι περισσότερες περιλαμβάνουν ανίχνευση μέσω αμπερομετρικούς αισθητήρες, όμως υπάρχουν και έρευνες με άλλους τύπους αισθητήρων. Πιο αναλυτικά, οι Raffa et al. [22] μελέτησαν πιθανές παραμέτρους σε αισθητήρες με στρώμα χρυσού με σκοπό την ανίχνευση ενός άλλου βαρέως μετάλλου, τον υδράργυρο, μελετώντας την αλλαγή της αντίστασης του ηλεκτροδίου. Επίσης, οι Lin Y.W. et al. [23] πραγματοποίησαν πειράματα πάνω στην ανίχνευση μολύβδου με την χρήση ολιγονουκλεοτιδικών αλυσίδων και τεχνικών φθορισμού, με όριο ανίχνευσης τα 300pM. Οι Swearingen C.B. et al. [21] μελετήσανε την επιρροή του μολύβδου στην υβριδοποίηση DNAzymes με την τεχνική φθοριμού, με όριο ανίχνευσης τα 300pM. Επιπλέον, οι Lu Y. et al. [24] πραγματοποίησαν πειράματα ανίχνευσης μολύβδου από νερό λίμνης πάνω σε νανοσωματίδια χρυσού με τροποποιημένες DNA αλυσίδες. Η μέθοδος ανίχνευσης ήταν χρωματομετρία και βασιζόταν στο σπάσιμο των δίκλωνων αλυσίδων με την παρουσία του μολύβδου.

5.2 Ολιγονουκλεοτίδια για ανίχνευση βαρέων μετάλλων (Pb)

Στο πείραμα που πραγματοποιήθηκε στο ΕΜΠ είχαμε την εξής πλήρως συμπληρωματική αλληλουχία ολιγονουκλεοτιδικών αλυσίδων:

	Αλληλουχία
DNAzymes (probes)	5’-**FAM**-TTT TTC ATC TCT TCT CCG AGC CGG TCG AAA TAG TGAGT-**SH**-3’
DNAzymes (target)	5’-ACT CAC TAT **Ra**GG AAG AGA TG-**Dabcyl**-3’

Η λογική ανίχνευσης της ύπαρξης του βαρέως μετάλλου βασιζόταν στο σπάσιμο των δίκλωνων υβριδοποιημένων αλυσίδων DNA. Έτσι, αρχικά θα ακινητοποιηθεί η probe αλυσίδα πάνω στην επιφάνεια του αισθητήρα και θα πάρουμε σήμα φθορισμού από τον δείκτη

φθορισμού Texas Red (FAM). Έπειτα, θα περάσει η συμπληρωματική ολιγονουκλεοτιδική αλυσίδα και θα πραγματοποιηθεί υβριδοποίηση. Λόγω του ότι η συμπληρωματική αλυσίδα έχει ένα ειδικό μόριο, το quencher (Dabcyl), το οποίο εννώνεται με το δείκτη φθοριμού, δεν θα έχουμε σήμα φθορισμού μετά την υβριδοποίηση. Με την έλλειψη σήματος μπορούμε να επαληθεύσουμε την υβριδοποίηση, πέρα από την μέτρηση της χωρητικότητας. Έπειτα, περνάμε ένα διάλυμα το οποίο περιέχει συγκεκριμένη ποσότητα μολύβδου. Καθώς περνάει το διάλυμα πάνω από την επιφάνεια με τις υβριδοποιημένες αλυσίδες DNA, σπάνε οι αλυσίδες και έχουμε και πάλι μόνο την probe αλυσίδα πάνω στην επιφάνεια. Άρα, μετά το σπάσιμο των αλυσίδων έχουμε σήμα φθορισμού.

5.2.1 Εναπόθεση ολιγονουκλεοτιδίων για ανίχνευση μολύβδου στους αισθητήρες χωρητικότητας και διαδικασία υβριδοποίησης

Στα πειράματα που πραγματοποιήσαμε, έγινε χρήση των αισθητήρων χωρητικότητας που περιγράφηκαν σε παραπάνω ενότητα. Η λογική ανίχνευσης βασιζόταν στον διαχωρισμό των δύο συμπληρωματικών ολιγονουκλεοτιδικών αλυσίδων με την παρουσία του μολύβδου, το οποίο θα προκαλλούσε μια αλλαγή στην χωρητικότητα του αισθητήρα. Έτσι, με την σειρά, αφού ενεργοποιήθηκαν οι επιφάνειες με το σιλάνιο GOPTS, πραγματοποιήθηκε εναπόθεση της αλυσίδας probe και έπειτα έγινε υβριδοποίηση της συμπληρωματικής αλυσίδας.

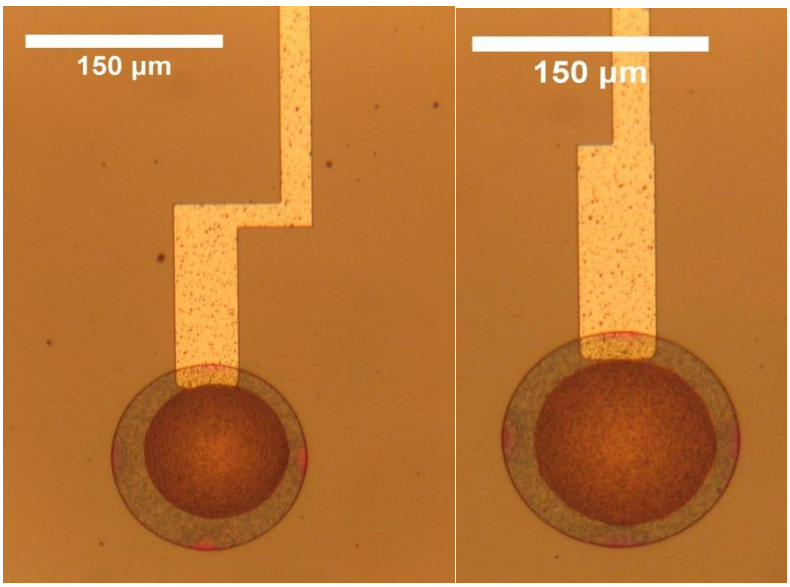
Η διαδικασία της υβριδοποίηση είναι [21]:

1. Ξέπλυμα του αισθητήρα με dd_2H_2O.
2. Βουτάμε τον αισθητήρα σε 1mM MCH (mercaptohexanol: 1M NaCl, 50mM TAE buffer pH 7.2) για πέντε λεπτά, για να φύγουν από την επιφάνεια του αισθητήρα τα μη ακινητοποιημένα νουκλεοτίδια.
3. Ξεπλένουμε τον αισθητήρα με wash buffer: 50mM tric acetate buffer pH 7.2 και 1M NaCl.
4. Βάζουμε το διάλυμα με τη συμπληρωματική αλυσίδα ολιγονουκλεοτιδίων πάνω στον αισθητήρα και τον τοποθετούμε σε φούρνο στους 70^oC για μία ώρα.
5. Βάζουμε τον αισθητήρα μέσα σε dd_2H_2O για μία ώρα.
6. Αφήνουμε τον αισθητήρα για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, για να έρθει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
7. Ψύχουμε τον αισθητήρα στους 4^oC για τριάντα λεπτά.

Για τη μέτρηση σήματος μολύβδου, αφού πραγματοποιηθεί η υβριδοποίηση, ακολουθούμε την παρακάτω διαδικασία:

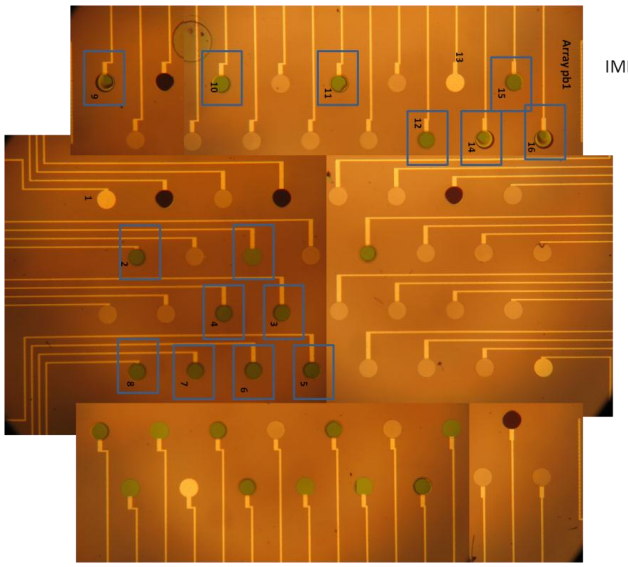
1. Ξεπλένουμε τον αισθητήρα από το wash buffer.
2. Περνάμε από τον αισθητήρα το διάλυμα του μολύβδου (10μM Pb και $(NO_3)_2$).
3. Ξεπλένουμε με dd_2H_2O.
4. Περνάμε το διάλυμα με τις συμπληρωματικές αλυσίδες target.
5. Ξεπλένουμε τον αισθητήρα με το wash buffer.

Τα αποτελέσματα της εναπόθεσης παρουσιάζονται στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 30).

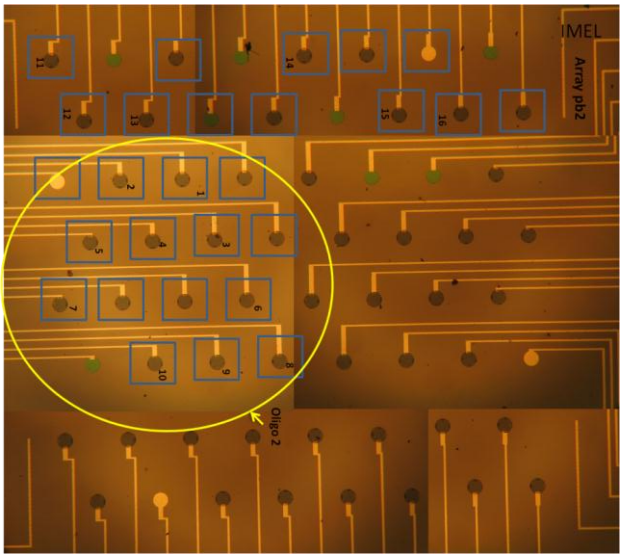


Εικόνα 30

Έχει συνολικά γίνει εναπόθεση σε δύο αισθητήρες. Οι παρακάτω δύο εικόνες δείχνουν τους αισθητήρες αυτούς (Εικόνα 31 και 32):



IMEL



Εικόνα 31

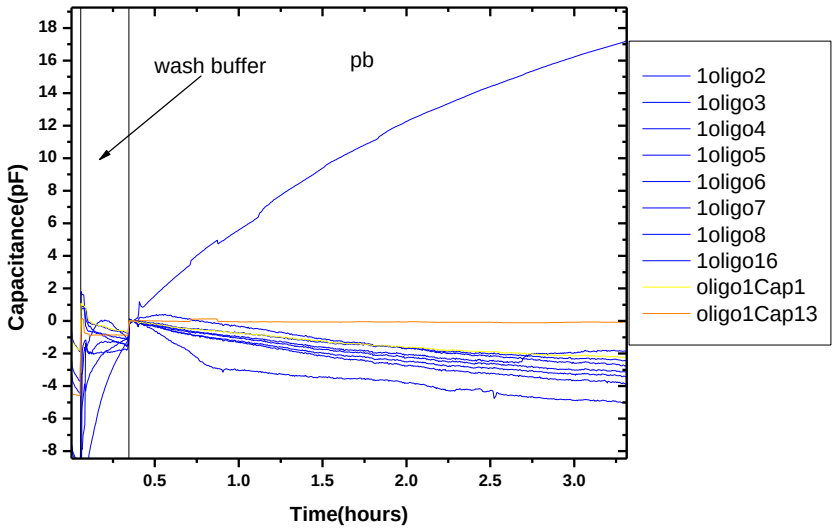
Εικόνα 32

Στην Εικόνα 31 είχε γίνει εναπόθεση και ακινητοποίηση των ολιγονουκλεοτιδικών αλυσίδων στις μεμβράνες μέσα στα σχεδιασμένα κουτιά. Πάνω από τον αισθητήρα περάσαμε το διάλυμα με τις συμπληρωματικές αλυσίδες για την υβριδοποίηση τους. Έπειτα, περάσαμε το διάλειμμα που περιείχε τον μόλυβδο, ο οποίος σπάει τις δίκλωνες αλυσίδες.

Στην Εικόνα 32 είχε γίνει εναπόθεση και ακινητοποίηση των ολιγονουκλεοτιδικών αλυσίδων στις μεμβράνες μέσα στα σχεδιασμένα κουτιά. Στις μεμβράνες μέσα στον σκιαγραφημένο κύκλο τοποθετήσαμε με την βοήθεια μιας πιπέτας μια σταγόνα με το διάλυμα της συμπληρωματικής αλυσίδας. Άρα στις μεμβράνες μέσα στον σκιαγραφημένο κύκλο, έχουμε υβριδοποιημένες αλυσίδες, ενώ στις άλλες έχουμε μόνο τις probes αλυσίδες. Χρησιμοποιώντας τις μεμβράνες έξω από τον κύκλο σαν αναφορά, περνάμε το διάλυμα του μολύβδου και σπάνε οι

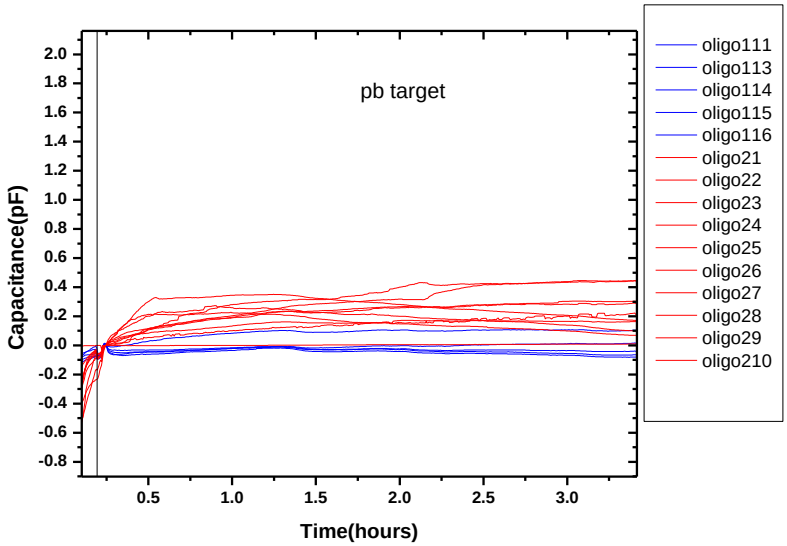
δίκλωνες αλυσίδες. Έπειτα, περνάμε το διάλυμα με τις συμπληρωματικές αλυσίδες και υβριδοποιούνται όλες οι μεμβράνες, που έχουν πλέον μονίκλωνες αλυσίδες.

Τα πειραματικά αποτελέσματα που πήραμε ήταν:



Σχήμα 3

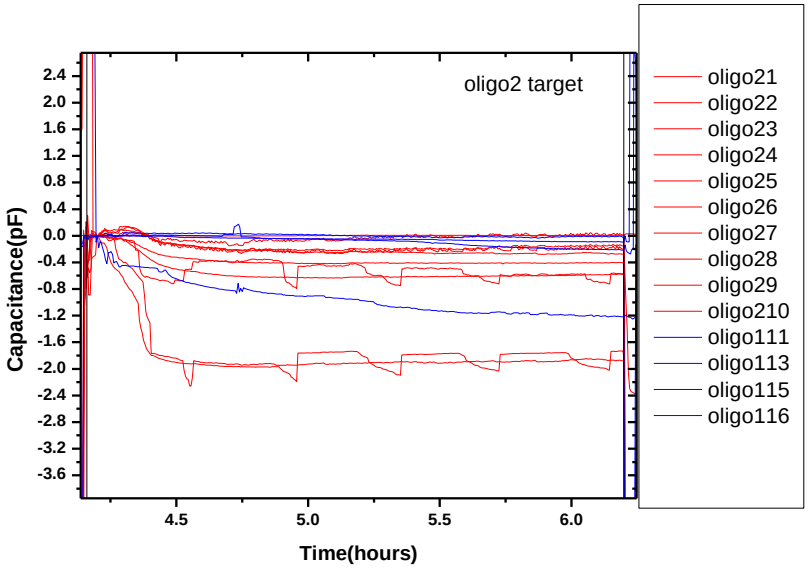
Στο Σχήμα 3 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για τον αισθητήρα στην Εικόνα 31. Λόγω του ότι δεν έχουμε μεμβράνες αναφοράς δεν μπορούμε να βγάλουμε συμπεράσματα ως προς το σήμα που παίρνουμε από την γραφική αυτή.



Σχήμα 4

Στο Σχήμα 4 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του αισθητήρα στην Εικόνα 32. Η μέτρηση αυτή είναι καθώς περνάμε το διάλυμα με τον μόλυβδο κια σπάνε οι υβριδοποιημένες αλυσίδες μέσα στον σκιαγραφημένο κύκλο. Παρατηρούμε ότι έχουμε αύξηση της χωρητικότητας. Αυτό

είναι κάτι αναμενόμενο, καθώς γνωρίζουμε ότι καθώς έχουμε την υβριδοποίηση, οι δίκλωνες αλυσίδες απωθούνται μεταξύ τους και ωθούν τη μεμβράνη προς τα πάνω. Άρα, με το σπάσιμο των δίκλωνων αυτών αλυσίδων η μεμβράνη επανέρχεται στην αρχική της θέση, και άρα έρχονται πιο κοντά τα δύο ηλεκτρόδια του αισθητήρα.



Σχήμα 5

Στο Σχήμα 5 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τον αισθητήρα στην Εικόνα 32. Σε αυτή τη μέτρηση περνάμε το διάλυμα με την συμπληρωματική αλυσίδα (target). Έτσι, έχουμε την υβριδοποίηση των αλυσίδων όλων των μεμβρανών πάνω στον αισθητήρα μέσα και έξω από τον κύκλο. Παρατηρούμε ότι έχουμε μείωση της χωρητικότητας. Αυτό είναι κάτι αναμενόμενο, καθώς γνωρίζουμε ότι καθώς έχουμε την υβριδοποίηση, οι δίκλωνες αλυσίδες απωθούνται μεταξύ τους και ωθούν τη μεμβράνη προς τα πάνω. Έτσι, έχουμε την απομάκρυνση των δύο ηλεκτροδίων του αισθητήρα και άρα έχουμε μείωση της χωρητικότητας.

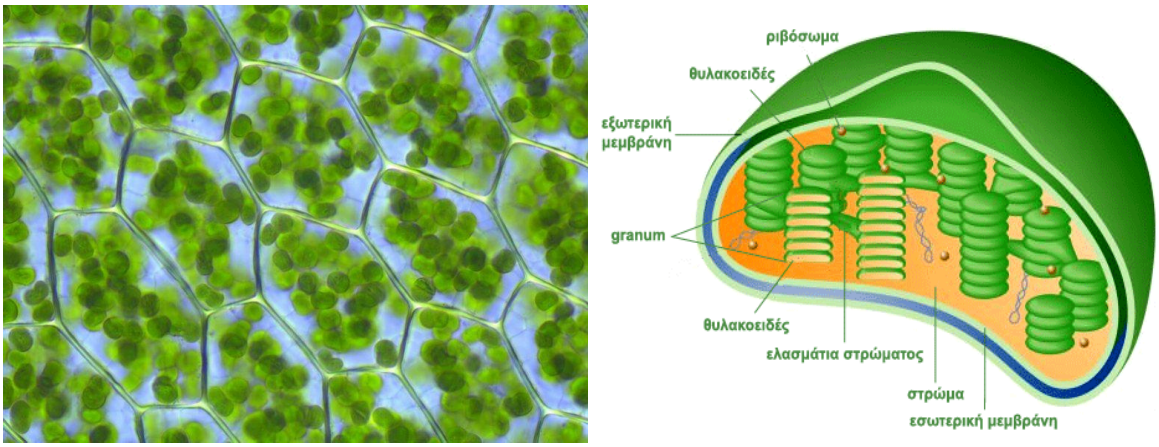
Βέβαιως, αυτά τα δύο αποτελέσματα δεν είναι αρκετά για να επιβεβαιώσουμε την αποτελεσματικότητα της τεχνικής αυτής ανίχνευσης του μολύβδου. Για αυτόν τον λόγο αναμένεται να γίνουν και άλλες εναποθέσεις σε αισθητήρες χωρητικότητας.

Κεφάλαιο 6

6.1 Θυλακοειδείς μεμβράνες

Για τη φωτοσύνθεση στη φύση υπάρχουν ειδικά κύτταρα στα φύλλα των δέντρων, οι χλωροπλάστες. Μέσα στους χλωροπλάστες υπάρχει ένα ζελατινώδες υγρό, το στρώμα. Μέσα στο στρώμα υπάρχει ένα δίκτυο από μεμβράνες, τα θυλακοειδή. Στα θυλακοειδή πραγματοποιούνται όλες οι φωτεινές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης, αφού μέσα τους βρίσκονται τα μόρια της χλωροφύλλης και άλλες φωτοσυνθετικές χρωστικές.

Με τον όρο φωτεινή φωτοσύνθεση εννοούμε τη φωτοσύνθεση που λαμβάνει χώρο με απορρόφηση φωτονίων σε κατάλληλο μήκος κύματος, η οποία προκαλεί τη μετάπτωση των ηλεκτρονίων σε υψηλότερη ενεργειακή στάθμη.



Εικόνα 33

6.2 Πρωτόκολλο απομόνωσης θυλακοειδών μεμβρανών

Για να χρησιμοποιήσουμε τις θυλακοειδείς μεμβράνες (Εικόνα 33) στα πειράματα μας, έπρεπε πρώτα να τις απομονώσουμε από τη φύση. Έτσι, χρησιμοποιήσαμε φρέσκα φύλλα από σπανάκι για να το πετύχουμε αυτό. Η διαδικασία απομόνωσης για 250gr φρέσκων φύλλων σπανακιού ήταν:

- Ξέπλυμα των φύλλων με απιονισμένο νερό.
- Τοποθέτηση των φύλλων και του ρυθμιστικού διαλύματος άλεσης (grinding buffer: 20mM τρισίνη pH 7.8, 300mM σακχαρόζη, 5mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA, 0.2% BSA και 1 mM PMSF σε pH 7.8) στο μίξερ με αναλογία 1:2g/ml και άλεσμα τους για 2x1min. Ανάμεσα στα δύο αλέσματα το μείγμα τοποθετήθηκε μέσα σε ψυγείο για λίγα λεπτά.
- Φιλτράρισμα του μείγματος με 8 στρώματα γάζας ή 2 Whatman Papers.
- Φυγοκέντριση του μείγματος στα 700g για 2min. Το μείγμα καθαρίζεται από σβόλους.
- Φυγοκέντριση του μείγματος στα 7500g για 10min. Το μείγμα καθαρίζεται από το υπερκείμενο.
- Διαλυτοποίηση του ιζήματος (χλωροπλάστες) στο διάλυμα επαναναιώρησης (resuspending buffer: 20mM τρισίνη pH 7.8, 70mM σακχαρόζη και 5mM $MgCl_2$). (Δεν έχει σημασία ο όγκος)
- Φυγοκέντριση του μείγματος στα 7500g για 10min.

- Καταβύθιση ιζήματος (θυλακοειδή) και απομόνωση του.
- Φυγοκέντριση του ιζήματος διαλυμένο στο διάλυμα επαναιώρησης (resuspending buffer) και έπειτα με τη βοήθεια ενός πινέλου το ομογενοποιούμε απαλά.
- Μέτρηση του όγκου και υπολογίζεται η συγκέντρωση των θυλακοειδών μεμβρανών. Συνήθης συγκέντρωση είναι 2.5-3mg/mL.
- Επαλήθευση της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας με φθορισμό.

Εδώ αξίζει να σημειωθεί ότι όλα τα βήματα επεξεργασίας πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία 4^{o}C και στο σκοτάδι. Επίσης, τα θυλακοειδή, πριν από κάθε βιοχημική επεξεργασία, αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία -80^{o}C. Οι φυγοκεντρίσεις πραγματοποιήθηκαν σε φυγόκεντρο Heraeus SEPATECH, τύπου Suprafuge 22, κάνοντας χρήση κεφαλών HFA 2194 ή HFA 14290, ή με φυγόκεντρο SIGMA, τύπου 3K20, κάνοντας χρήση κεφαλής Nr:12258. Η απομόνωση των θυλακοειδών πραγματοποιήθηκε στην Ακαδημία Αθηνών.

6.3 Εναπόθεση και ακινητοποίηση θυλακοειδών σε αμπερομετρικούς αισθητήρες

Λόγω της επιθυμίας ο βιοαισθητήρας να ανιχνεύει μόνο την ουσία που επιθυμούμε, προετοιμάζουμε τη διάταξη ώστε να γίνεται ακινητοποίηση του βιοϋλικού στην επιφάνεια του μορφομετατροπέα. Στους αμπερομετρικούς αισθητήρες αυτού του πειράματος είχαμε χρυσό στην επιφάνεια του μορφομετατροπέα.

Ένας σημαντικός παράγοντας για να γίνει η μέτρηση σωστά είναι η ακινητοποίηση του διαλύματος με τις θυλακοειδείς μεμβράνες πάνω στο ηλεκτρόδιο εργασίας. Για αυτού του τύπου τα ηλεκτρόδια, ηλεκτρόδια χρυσού, δεν είναι αναγκαία η οποιαδήποτε μετατροπή τους πριν την εναπόθεση των μεμβρανών. Από την μελέτη των Jung Y.C και Bhushan B. [25] βρέθηκε ότι υπάρχει σχέση μεταξύ της τραχύτητας της επιφάνειας και του αν θα γίνει ακινητοποίηση των σταγόνων προς εναπόθεση. Έτσι λόγω της κατάλληλης τραχύτητας της επιφάνειας των αισθητήρων αυτών, οι σταγόνες προς εναπόθεση ακινητοποιούνται πάνω στην επιφάνεια.

Για την εναπόθεση των θυλακοειδών πάνω στους αμπερομετρικούς αισθητήρες χρησιμοποιήσαμε τη διάταξη LIFT που περιγράφηκε πιο πάνω. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο ΕΜΠ.

Πάνω στο υπόστρωμα δότη, το quartz με την επίστρωση από τιτάνιο, τοποθετήθηκαν και απλώθηκαν όσο πιο ομοιόμορφα γίνεται 10μL του διαλύματος με τα θυλακοειδή με τη βοήθεια μιας πιπέτας. Το τελικό διάλυμα με τα θυλακοειδή πάνω στον στόχο, που είχε συγκέντρωση θυλακοειδών μεμβρανών 2.5mg/mL, αποτελούνταν από buffer 25mM 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) pH 6.0, sucrose 70mM και NaCl 15mM.

Ο αισθητήρας τοποθετήθηκε πάνω στη βάση στήριξης του υποστρώματος δέκτη σε περίπου 300μm απόσταση. Λέμε περίπου γιατί η μετακίνηση της βάσης υποστρώματος δέκτη γινόταν χειροκίνητα, με το ειδικό μικρομετρικό σύστημα κίνησης, και σε κάθε πείραμα διαφοροποιούταν ελαφρώς η απόσταση, με σκοπό να πάρουμε την καλύτερη δυνατή εναπόθεση πάνω στον αισθητήρα. Ο σκοπός μας, με άλλα λόγια, είναι να έρθουν όσο πιο κοντά γίνεται τα δύο υποστρώματα, χωρίς να έχουμε την επαφή τους, ώστε να έχουμε τη βέλτιστη εναπόθεση.

Αμπερομετρικοί αισθητήρες SPEs

Οι αισθητήρες που χρησιμοποιήσαμε, οι SPE (Screen Printed Electrodes), αποτελούνταν από τρία ηλεκτρόδια:

- το ηλεκτρόδιο εργασίας (working electrode)

- το ηλεκτρόδιο αναφοράς (reference electrode)
- το βοηθητικό ηλεκτρόδιο (counter electrode)

Το ηλεκτρόδιο εργασίας (working electrode) έχει διάμετρο 1.6mm και εκεί γίνεται η εναπόθεση με την τεχνική του LIFT των βιοϋλικών προς μελέτη. Επίσης, στο ηλεκτρόδιο αυτό πραγματοποιείται η επιθυμητή αντίδραση, η οποία θα δώσει το σήμα προς μέτρηση. Η αντίδραση που λαμβάνει χώρο στο ηλεκτρόδιο εργασίας είναι οξειδοαναγωγικής φύσης, δηλαδή μπορεί είτε να οξειδώνει, είτε να ανάγει το διάλυμα μέτρησης.

Το βοηθητικό ηλεκτρόδιο (counter electrode) είναι το ηλεκτρόδιο που συλλέγει τα ηλεκτρόνια που παράγονται στο ηλεκτρόδιο εργασίας μέσω της αντίδρασης. Αυτό γίνεται σύμφωνα με την εξής τεχνική: με τη βοήθεια ποτενσιοστάτη εφαρμόζεται σταθερό δυναμικό μεταξύ του ηλεκτροδίου αναφοράς και του ηλεκτροδίου εργασίας, τέτοιο ώστε να βοηθήσει τα ηλεκτρόνια, που παράγονται από την φωτοσύνθεση, να αντιδράσουν με τον αναλύτη που είναι στο διάλυμα μέτρησης (buffer), τον οποίο θα ανάγουν ή οξειδώσουν. Η μεταφορά του φορτίου θα γίνει μέσω του διαλύματος μέτρησης στο βοηθητικό ηλεκτρόδιο. Με αυτό τον τρόπο δημιουργούμε ένα κύκλωμα το οποίο ξεκινάει από το ηλεκτρόδιο εργασίας (πηγή ηλεκτρονίων) και φτάνει στο βοηθητικό ηλεκτρόδιο, όπου συλλέγεται το παραγόμενο ρεύμα, το οποίο μετριέται.

Στην εικόνα (Εικόνα 34) φαίνεται ένας τέτοιος αισθητήρας με το ηλεκτρόδιο εργασίας (2), το ηλεκτρόδιο αναφοράς (3) και το βοηθητικό ηλεκτρόδιο (1).

Εικόνα 34

Βεβαίως, η σύσταση του διαλύματος μέτρησης πρέπει να είναι καθορισμένη ώστε να έχουμε τα βέλτιστα αποτελέσματα μεταφοράς των ηλεκτρονίων από το ένα ηλεκτρόνιο στο άλλο. Για να παρασκευάσουμε 1L διαλύματος μέτρησης (buffer) χρησιμοποιούμε:

- 20mM tricine
- 70mM sucrose
- 15mM NaCl
- 5mM $MgCl_2$
- 30μM DCPIP (τεχνικός ηλεκτρονιοδέκτης)

Επίσης, είναι σημαντικό να έχουμε τις βέλτιστες ρυθμίσεις κατά τη διάρκεια των μετρήσεων. Έτσι, προκειμένου να πάρουμε τα βέλτιστα αποτελέσματα είχαμε συγκεκριμένες συνθήκες μέτρησης, όπως η τιμή της σταθερής τάσης που εφαρμόζαμε στα δύο ηλεκτρόνια (μέτρησης και αναφοράς) και ο ρυθμός ροής του buffer (διαλύματος μέτρησης), τα οποία είχαν βρεθεί μετά από διάφορους ελέγχους.

Εδώ αξίζει να σημειωθεί ότι χωρίς την χρήση του διαλύματος μέτρησης είναι αδύνατον τα ηλεκτρόνια από μόνα τους να πάνε από το ένα ηλεκτρόνιο στο άλλο, λόγω της μεγάλης απόστασης ανάμεσα στα ηλεκτρόδια.

6.4 Πειραματική τεχνική

Ο σκοπός των πειραμάτων ήταν να μελετηθεί ο χρόνος ζωής (life time) των δειγμάτων των θυλακοειδών και η μελέτη τεχνικών σταθεροποίησης αυτού του χρόνου.

Η πυκνότητα ενέργειας της εναπόθεσης των θυλακοειδών μεμβρανών με την τεχνική του LIFT ήταν 400mJ/cm^2 με σταγόνα εναπόθεσης διαμέτρου 150μm (60 μm πάνω στον στόχο). Κάθε παλμός έδινε μία σταγόνα εναπόθεσης. Για να καλυφτεί όλη η επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας δημιουργήσαμε μικροσυστοιχία σταγόνων 16x16 (arrays) με απόσταση 100μm ανάμεσα στο κέντρο της κάθε σταγόνας. Αναμένουμε το τελικό εμβαδόν του «τετραγώνου» από σταγόνες που θα πάρουμε να είναι περίπου 1500x1500(μm^2).

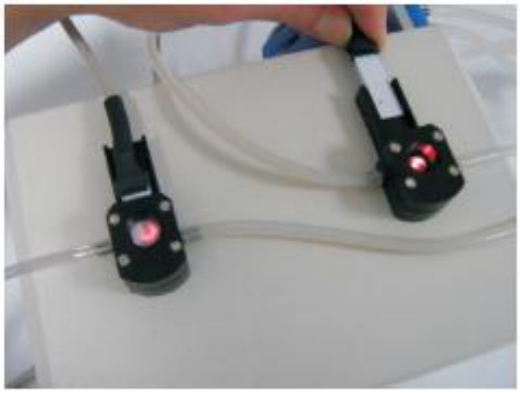
Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων έγινε χρήση του μηχανήματος AMPBIO-SPE Biosensor SRL (Εικόνα 35) και του προγράμματος που ερχόταν μαζί με το μηχάνημα. Κατά τη διάρκεια του πειράματος, μας δινόταν η δυνατότητα να παίρνουμε άμεσα τα αποτελέσματα των μετρήσεων και να μπορούμε να σώσουμε τα data. Επίσης, μπορούσαμε να βλέπουμε άμεσα την πορεία των πειραμάτων. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο ΕΜΠ.

Εικόνα 35

Το μηχάνημα αυτό αποτελείται από δύο κελιά ροής με διαστάσεις: 30mm εξωτερική διάμετρο και 25mm ύψος, στα οποία τοποθετούνται τα ηλεκτρόδια. Μέσα στα κελιά αυτά υπάρχει από μία δίοδος LED, το οποίο διεγείρει τη φωτοσύνθεση στις θυλακοειδής μεμβράνες που παράγει ηλεκτρόνια. Έτσι, καθώς ρέει το υγρό διάλυμα μέτρησης (buffer), με τη βοήθεια μιας περισταλτικής αντλίας, με μικρή ταχύτητα στα κελιά όπου είναι οι αισθητήρες, πραγματοποιούνται οι οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις που οδηγούν στη δημιουργία ρεύματος, το οποίο δίνει το σήμα. Υπάρχει βέβαια μια μικρή καθυστέρηση στην μέτρηση του σήματος από το μηχάνημα της τάξης των δευτερολέπτων, περίπου 5sec.

Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν όλες σε θερμοκρασία δωματίου.

Όλες οι συνθήκες του πειράματος, όπως η εφαρμογή της τάσης, η ρύθμιση της ταχύτητας της ροής, οι χρόνοι φωτισμού με LED, ο αριθμός των κύκλων φωτισμού κ.ά. έγιναν μέσα από το πρόγραμμα του μηχανήματος. Αναλυτικότερα, σε κάθε κύκλο φωτισμού, δηλαδή κάθε κύκλο φωτοσύνθεσης, είχαμε με σειρά: 4 λεπτά ηρεμίας, όπου οι θυλακοειδής μεμβράνες δεν φωτίζονταν από τα LED, 7sec φωτισμού και ξανά 1 λεπτό ηρεμίας. Συνολικά ο κάθε κύκλος φωτοσύνθεσης διαρκούσε 5 λεπτά. Έτσι, μετά από κάθε φωτοσύνθεση, το μηχάνημα αφηνόταν για 5 λεπτά για να πάρει όλο το σήμα του ρεύματος που μας έδιναν οι θυλακοειδής μεμβράνες. Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 36) παρουσιάζεται το πως είναι σε κανονικές συνθήκες όταν φωτίζουν οι δίοδοι LED (δεν έχουν τοποθετηθεί τα καπάκια των κελιών).

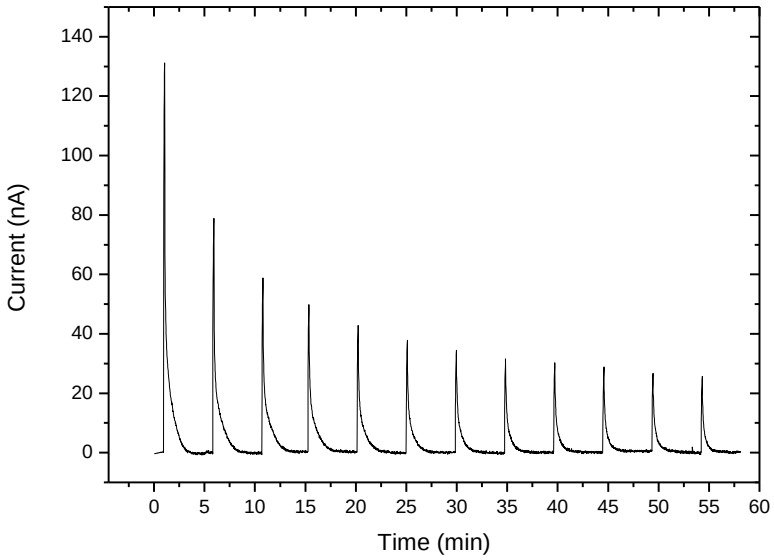


Εικόνα 36

6.5 Πειραματικά αποτελέσματα

Τα πειραματικά αποτελέσματα παρουσιάζονται παρακάτω, όπου σχολιάζονται βασικά συμπεράσματα που βγήκαν από αυτά.

Γενικά, το αμπερομετρικό σήμα που λαμβάνουμε από το μηχάνημα είναι της παρακάτω μορφής του σχήματος (Σχήμα 6):



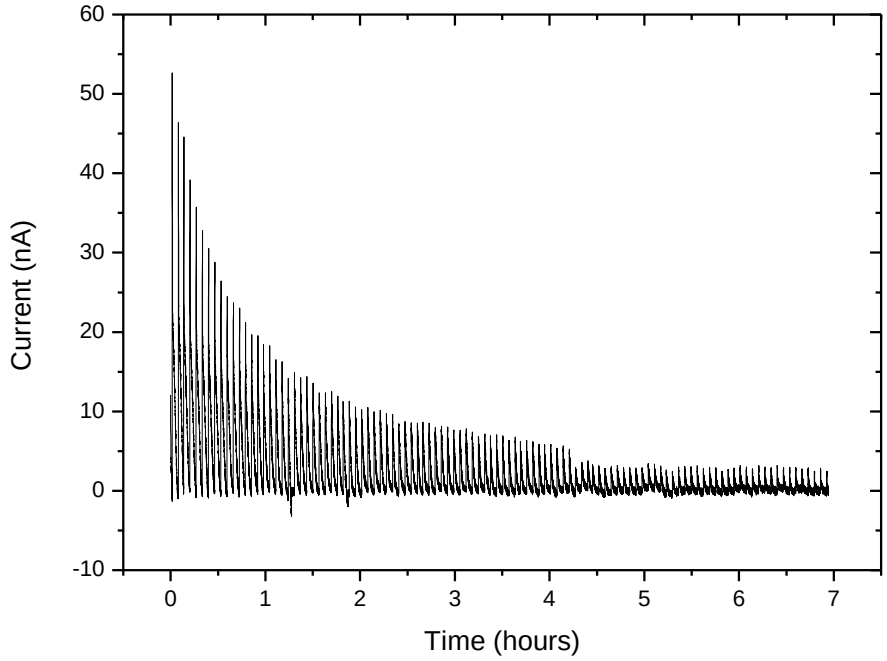
Σχήμα 6

Η μέτρηση αυτή είχε δώδεκα κύκλους φωτισμού, το οποίο καταλαβαίνουμε από τις δώδεκα κορυφές που παρατηρούμε.

Η κάθε κορυφή αντιστοιχεί σε σήμα φωτοσύνθεσης από τον φωτισμό των θυλακοειδών μεμβρανών με τις διόδους LED. Παρατηρούμε εδώ ότι το σήμα μειώνεται συνεχόμενα.

Εδώ παρατηρούμε ότι η δεύτερη κορυφή είναι σχεδόν μισή σε ύψος από την πρώτη κορυφή. Δηλαδή η πτώση του σήματος είναι πολύ μεγάλη, σε σχέση με τη διαφορά πτώσης του σήματος της τρίτης κορυφής με τη δεύτερη. Αυτό θεωρούμε ότι οφείλεται στο ότι στην πρώτη κορυφή παίρνουμε σήμα και από μη ακινητοποιημένα θυλακοειδή, τα οποία τελικά θα φύγουν πλήρως από την επιφάνεια του αισθητήρα μετά από τους πρώτους κύκλους με το buffer μέτρησης, καθώς το buffer μέτρησης «ξεπλένει» την επιφάνεια του αισθητήρα. Έτσι, θεωρούμε ότι στην πρώτη κορυφή έχουμε συμβολή μη ακινητοποιημένων θυλακοειδών στο σήμα, τα οποία καθώς περνάει το buffer μέτρησης μειώνονται όλο και πιο πολύ σε αριθμό έως ότου έχουμε σήμα μόνο από τα ακινητοποιημένα θυλακοειδή. Επομένως, θεωρούμε ότι στην τέταρτη κορυφή μπορούμε με σιγουριά να πούμε ότι έχουμε σήμα μόνο από τα ακινητοποιημένα θυλακοειδή πάνω στον αισθητήρα.

Παρακάτω είναι μια μέτρηση (Σχήμα 7), η οποία αφέθηκε καθόλη τη διάρκεια της νύχτας (overnight), και από αυτήν βγαίνουν ουσιαστικά συμπεράσματα για τον χρόνο ζωής των θυλακοειδών μεμβρανών, καθώς ο χρόνος που διήρκεσε η μέτρηση είναι αρκετά μεγάλος και εξυπηρετεί τον σκοπό των πειραμάτων αυτών.

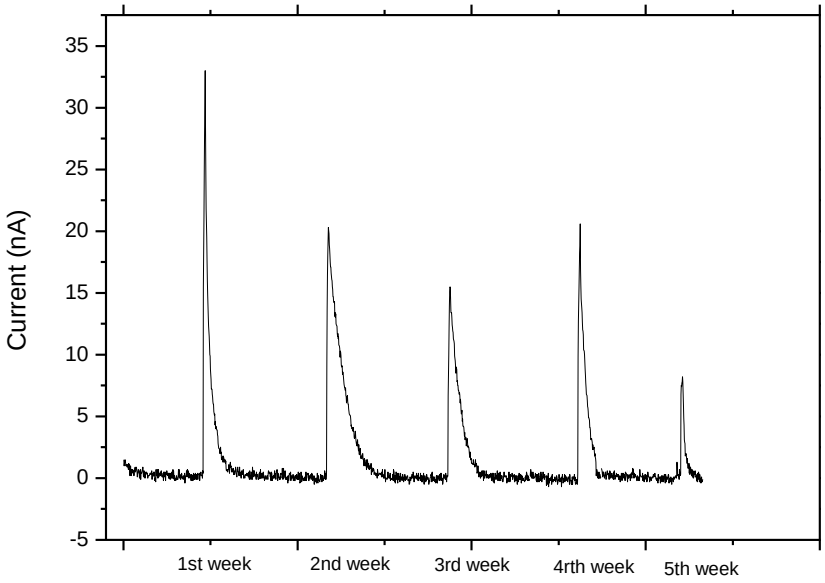


Σχήμα 7

Σε αυτή τη μέτρηση είναι φανερή η συνεχόμενη μείωση του σήματος. Παρατηρούμε ότι αρχικά το σήμα είναι υψηλό, αλλά μετά από ούτε μία ώρα έχει μειωθεί στο μισό του αρχικού σήματος, άρα η πτώση είναι απότομη στην αρχή του πειράματος. Αυτό μας δείχνει το πόσο γρήγορα χάνουν τη δυνατότητα να δώσουν σήμα φωτοσύνθεσης οι θυλακοειδής μεμβράνες. Αν και σβήνει σύντομα το σήμα στην πρώτη ώρα, παρατηρούμε ότι μετά από αυτήν η πτώση είναι πιο ομαλή. Αυτό δείχνει ότι παρόλο που οι θυλακοειδής μεμβράνες δεν δίνουν υψηλό σήμα, εξακολουθούν και δίνουν ένα σήμα μετρήσιμο. Άρα ο χρόνος ζωής τους ξεπερνά τη μία ώρα. Όμως, εδώ αξίζει να τονιστεί ότι αν και μετά από ένα σημείο το σήμα φθίνει με αργούς ρυθμούς, αυξάνεται ο θόρυβος στο σήμα μας από ένα σημείο και μετά, περίπου από την τέταρτη ώρα και μετά. Άρα, οι μετρήσεις μετά την τέταρτη ώρα έχουν ένα μικρότερο λόγο σήματος/θορύβου που κάνει το σήμα μας να μην είναι ιδιαίτερα έγκυρο και να έχει μεγάλο σφάλμα. Έτσι, μετά την

τέταρτη ώρα, ο θόρυβος έχει πλέον γίνει συγκρίσιμος με το σήμα, που μας οδηγεί το συμπέρασμα ότι οι θυλακοειδής μεμβράνες αρχίζουν και χαλάνε, με αποτέλεσμα να τελειώνει ο χρόνος ζωής τους. Έτσι, καταλήγουμε στο ότι ο χρόνος ζωής των θυλακοειδών μεμβρανών είναι περίπου τέσσερις ώρες.

Για να βγάλουμε στατιστικό συμπέρασμα σχετικά με το πόσο μειώνεται το σήμα με την πάροδο του χρόνου, άρα και με το πόσο γρήγορα χαλάνε οι θυλακοειδής μεμβράνες, πραγματοποιήθηκε εναπόθεση θυλακοειδών μεμβρανών στους αισθητήρες από το ίδιο δείγμα σπανακιού μέσα σε μία εβδομάδα. Έπειτα, τοποθετήθηκαν οι αισθητήρες στην κατάψυξη, ενώ πρώτα είχαν τυλιχτεί με αλουμινόχαρτο για την προστασία των θυλακοειδών μεμβρανών από το φως και την αποφυγή πραγματοποίησης φωτοσύνθεσης πέρα από το πείραμα. Ο λόγος που έγινε αυτού του τύπου οι δοκιμές ήταν για να μελετηθεί αν οι αισθητήρες μπορούν να φυλαχτούν μαζί με το βιοϋλικό και να είναι δυνατή η μελλοντική χρήση τους για μετρήσεις. Στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 8) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που πήραμε:



Σχήμα 8

Τα παραπάνω αποτελέσματα προέκυψαν από μετρήσεις δύο αισθητήρων, τους οποίους αφαιρούσαμε από την κατάψυξη. Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις με δύο ζεύγη αισθητήρων από την κατάψυξη για πέντε εβδομάδες, όπου κάθε εβδομάδα τοποθετούσαμε άλλους αισθητήρες. Το κάθε ζεύγος αισθητήρων αφέθηκε για 50 κύκλους. Από τις μετρήσεις που πάρθηκαν από αυτούς τους αισθητήρες, επιλέξαμε την τέταρτη κορυφή από όλα τα διαγράμματα ρεύματος χρόνου. Όπως αναφέραμε και πιο πάνω θεωρούμε ότι μπορούμε να πούμε με ασφάλεια ότι μετά την τέταρτη κορυφή το σήμα προέρχεται από τα ακινητοποιημένα θυλακοειδή και άρα με μπορούμε να πούμε ότι είναι το σήμα μας από τις ακινητοποιημένες θυλακοειδής μεμβράνες. Άρα, από κάθε εβδομάδα που κάναμε μέτρηση πήραμε την τέταρτη κορυφή και βγάλαμε το μέσο όρο από το σήμα στα δύο ηλεκτρόδια. Παρατηρούμε από την παραπάνω γραφική (Σχήμα 7) ότι το σήμα μας μειώνεται καθώς περνάνε οι εβδομάδες. Όμως παρατηρούμε ότι η μείωση του σήματος δεν είναι πολύ μεγάλη μέχρι και την τέταρτη εβδομάδα αν λάβουμε υπόψιν τον χρόνο που έχει περάσει και ότι ακόμα οι αισθητήρες δίνουν σήμα, μικρό σχετικά αλλά μετρήσιμο. Από αυτό συμπεραίνουμε ότι μπορεί να γίνει εναπόθεση και ακινητοποίηση των θυλακοειδών μεμβρανών, να φυλλαχθούν στην κατάψυξη για τέσσερις ολόκληρες εβδομάδες, ένας μήνας, και να μπορούν να δώσουν μετρήσεις. Μετά την τέταρτη κορυφή παρατηρούμε ότι οι θυλακοειδής

μεμβράνες αρχίζουν να χαλάνε καθώς δίνουν πολύ μικρό σήμα. Επομένως, την πέμπτη εβδομάδα θεωρούμε ότι οι θυλακοειδής μεμβράνες αρχίζουν και χαλάνε τόσο ώστε να μην μας δίνουν σήμα μετρήσιμο, άρα ο αισθητήρας με το βιοϋλικό δεν είναι χρήσιμος.

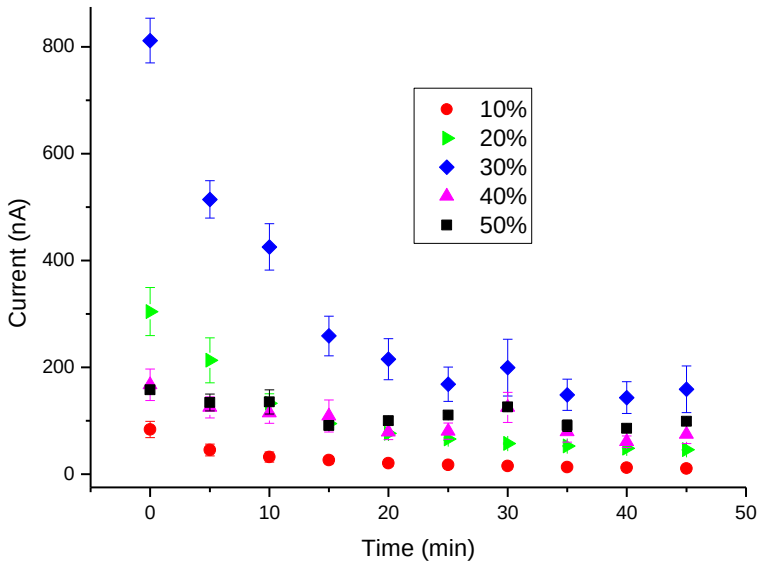
Εδώ αξίζει να σημειώσουμε το γεγονός ότι παρόλο που παρατηρούμε ότι η τέταρτη κορυφή του σήματος είναι πιο ψηλή από την τρίτη, είναι μέσα στα όρια του σφάλματος και δεν θεωρούμε ότι ξαφνικά οι θυλακοειδής μεμβράνες θα μας δίνουν μεγαλύτερο σήμα. Το γεγονός αυτό επαληθεύει και η κορυφή στην πέμπτη εβδομάδα που μας δείχνει το πόσο πολύ έχει μειωθεί το σήμα σχετικά με την τρίτη εβδομάδα.

Θυλακοειδής μεμβράνες με PEDOT

Τα PEDOT (Poly(3,4-ethylenedioxythiophene)) είναι οργανικά πολυμερή με πολλές εφαρμογές σε ηλεκτρονικούς αισθητήρες, λόγω της υψηλής ηλεκτρικής τους αγωγιμότητας σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και της σταθερότητας τους σε οξειδωμένες καταστάσεις [26, 27]. Ο μεγάλος αριθμός αυτών των εφαρμογών οφείλεται και στο ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε χαμηλού σχετικά κόστους, εύκαμπτες και εκτυπώσιμες ηλεκτρονικές συσκευές.

Λόγω του ότι επιθυμούμε το σήμα να σταθεροποιείται, πραγματοποιήσαμε δοκιμές προκειμένου να δούμε αν η προσθήκη του PEDOT στο διάλυμα των θυλακοειδών θα μπορούσε να συμβάλει θετικά στα αποτελέσματα, δηλαδή να βελτιώνει το σήμα. Από μελέτες που ήδη έχουν πραγματοποιηθεί, βρέθηκε ότι το PEDOT μπορεί επιτυχώς να ενσωματώσει και να σταθεροποιήσει τις θυλακοειδής μεμβράνες [28]. Μάλιστα, παρατηρήθηκε ότι η προσθήκη του PEDOT ενίσχυε το σήμα από την φωτοσύνθεση σε λευκό φως.

Έτσι, στα πειράματα αυτά δοκιμάστηκαν διαφορετικά ποσοστά PEDOT στο διάλυμα των θυλακοειδών και παρατηρήθηκε η αλλαγή του σήματος. Στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 9) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που πήραμε:



Σχήμα 9

Για διαφορετικές αναλογίες PEDOT παρατηρούμε ότι το σήμα είναι πολύ μεγαλύτερο από το σήμα χωρίς το PEDOT. Όμως για να βρούμε τη βέλτιστη αναλογία PEDOT και θυλακοειδών μεμβρανών, θα πρέπει να συγκρίνουμε τα διαλύματα με PEDOT ξεχωριστά από τα διαλύματα χωρίς PEDOT.

Εδώ αξίζει να σημειώσουμε ότι δεν παρασκευάστηκε διάλυμα θυλακοειδών μεμβρανών, που περιγράφτηκε παραπάνω, με διαφορετικές αναλογίες για τις δοκιμές αυτές. Παραδείγματος χάριν, για να φτιαχτεί το διάλυμα μιας αναλογίας 10% PEDOT για 10μL, προσθέταμε 1μL PEDOT και 9μL από το διάλυμα των θυλακοειδών μεμβρανών, το οποίο προετοιμάστηκε με τον ίδιο τρόπο όπως και στο απλό διάλυμα θυλακοειδών μεμβρανών.

Επίσης αξίζει να τονιστεί ότι τα σήματα είναι πολύ πιο ψηλά από ότι στα διαλύματα χωρίς PEDOT, κάτι που αναμένουμε λόγω των ιδιοτήτων του PEDOT [28].

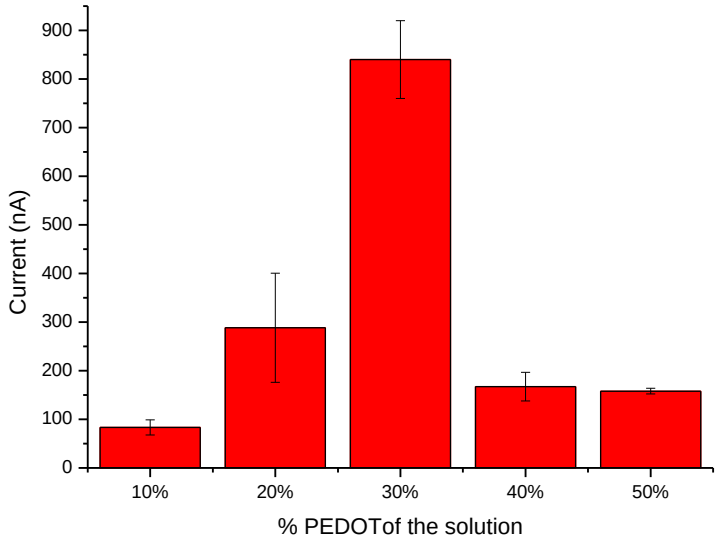
Τα συμπεράσματα από τα πειράματα είναι:

- 10% PEDOT: Το σήμα είναι πολύ χαμηλό. Ξεκινάει από περίπου 100nA και φτάνει μετά από δέκα κύκλους στα 11nA. Φαίνεται να είναι σταθερό, αλλά όπως θα δείξουμε παρακάτω (Σχήμα 8), το σήμα δεν διατηρείται σταθερό. Ο λόγος που φαίνεται στο σχήμα (Σχήμα 6) σταθερό είναι το γεγονός ότι τα άλλα σήματα έχουν επηρεάσει την κλίμακα και έχουν κυριαρχήσει στο ασθενές σήμα της αναλογίας αυτής.
- 20% PEDOT: Το σήμα είναι πιο ψηλό από ότι στο 10% PEDOT, αλλά μειώνεται πολύ. Ξεκινάει από περίπου 300nA και φτάνει μετά από δέκα κύκλους στα 50nA.
- 30% PEDOT: Το σήμα εκτοξεύεται και παίρνει τη μεγαλύτερη τιμή σε σχέση με όλες τις άλλες αναλογίες. Όμως, παρατηρούμε μεγάλη μείωση του σήματος ώστε μετά από 10 λεπτά να έχει φτάσει στο ένα τέταρτο του αρχικού. Ξεκινάει από περίπου 800nA και φτάνει μετά από δέκα κύκλους στα 150nA.
- 40% PEDOT: Το σήμα είναι αρκετά χαμηλό, σε σχέση με το 30% PEDOT, αλλά δείχνει να είναι πιο σταθερό από τα άλλα. Ξεκινάει από περίπου 170nA και φτάνει μετά από δέκα κύκλους στα 80nA.
- 50% PEDOT: Το σήμα είναι σχετικά χαμηλό, σε σχέση με το 30% PEDOT, αλλά δείχνει να είναι πιο σταθερό από τα άλλα. Ξεκινάει από περίπου 160nA και φτάνει μετά από δέκα κύκλους στα 100nA.

Ο σκοπός των πειραμάτων αυτών ήταν να έχουμε ένα μετρήσιμο και όσο το δυνατόν σταθερό σήμα. Έτσι, παρόλο που η αναλογία 30% PEDOT μας δίνει το μεγαλύτερο σήμα, φθίνει πολύ από αυτό που επιθυμούμε. Άρα, για τον σκοπό που θέλουμε, η αναλογία αυτή απορρίπτεται. Η αναλογία 20% PEDOT απορρίπτεται επίσης για τον λόγο ότι φθίνει με το πέρασμα του χρόνου και είναι εμφανής ακόμα και σε αυτό το σχήμα (Σχήμα 9). Για την αναλογία 10% PEDOT θα μπορούμε να βγάλουμε σε παρακάτω γραφική συμπεράσματα για την σταθερότητα του σήματος, καθώς εδώ δεν είναι εμφανής η συμπεριφορά λόγω της κλίμακας. Όμως, αξίζει να σημειωθεί ότι το παραγόμενο σήμα είναι πολύ χαμηλότερο από το σήμα όλων των άλλων αναλογιών και άρα θα πρέπει να απορρίψουμε και αυτή την αναλογία. Παρόλα αυτά αξίζει να παρατηρηθεί η συμπεριφορά του σήματος και σε αυτή την αναλογία, το οποίο και θα γίνει παρακάτω.

Έτσι, καταλήγουμε να είμαστε ανάμεσα στις αναλογίες 40% PEDOT και 50% PEDOT. Παρατηρούμε από την παραπάνω γραφική ότι οι αναλογίες αυτές είναι σχετικά κοντά και τείνουν να παρουσιάζουν ένα σταθερό σήμα. Πιο παρακάτω, λαμβάνοντας υπόψιν άλλες γραφικές θα φτάσουμε στο συμπέρασμα του ποιά αναλογία είναι η πιο καλή για το σκοπό που θέλουμε.

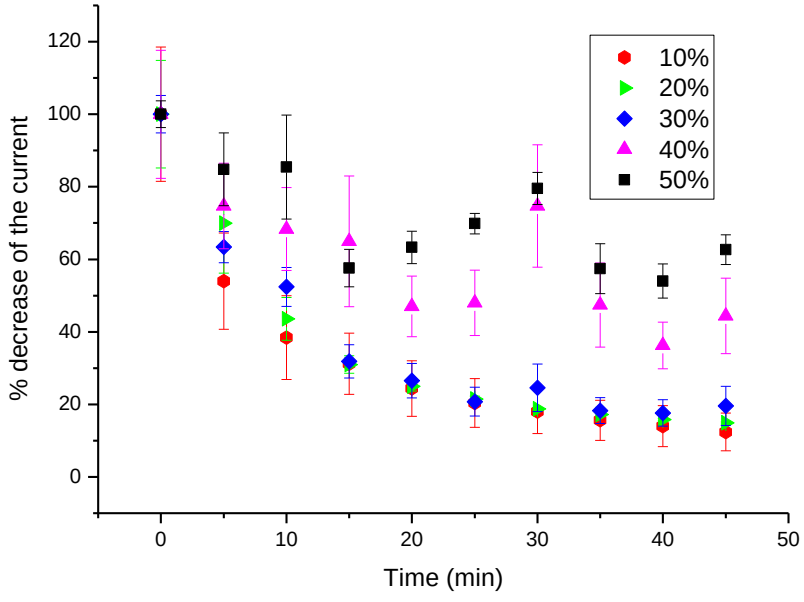
Εδώ αξίζει να σημειώσουμε ότι τα σφάλματα έχουν βγει από διαφορετικές μετρήσεις με την ίδια αναλογία.



Σχήμα 10

Στην παραπάνω γραφική (Σχήμα 10) έχουμε όλες τις πρώτες κορυφές από όλες τις αναλογίες όπου παρατηρούμε ξανά ότι στην αναλογία 30% PEDOT έχουμε το μέγιστο σήμα, αλλά ταυτόχρονα σε αυτή την αναλογία έχουμε σχετικά μεγάλο σφάλμα. Γενικά, δεν επιθυμούμε οι μετρήσεις να έχουν μεγάλο σφάλμα και άρα η αναλογία αυτή απορρίπτεται και λόγω του μεγάλου σφάλματος της. Παρόμοια, η αναλογία 20% PEDOT, η $2^{η}$ πιο ψηλή σε σήμα (Σχήμα 7), έχει επίσης πολύ μεγάλο σφάλμα. Η αναλογία 10% PEDOT έχει πολύ χαμηλό σήμα, όπως ήδη είχαμε δει από παραπάνω, αλλά έχει μικρό σφάλμα. Τέλος, οι αναλογίες 40% PEDOT και 50% PEDOT παρατηρούμε ότι έχουν πολύ κοντινά σήματα, αλλά η αναλογία 50% PEDOT έχει μικρότερο σφάλμα.

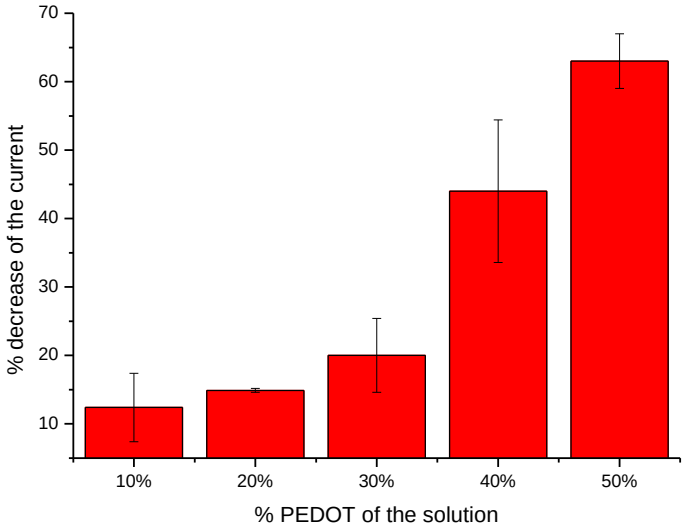
Στην παρακάτω γραφική (Σχήμα 11) έχουμε την ποσοστιαία μείωση του σήματος για διαφορετικές αναλογίες με την πάροδο του χρόνου, θεωρώντας σε κάθε αναλογία ότι το 100% του σήματος είναι η πρώτη κορυφή. Για αυτό, όλες οι μετρήσεις ξεκινάνε από το 100%.



Σχήμα 11

Παρατηρούμε ότι οι αναλογίες 30% και 20% παρουσιάζουν πολύ μεγάλη πτώση στο σήμα. Εδώ είναι εμφανής και το πόσο πολύ μειώνεται το σήμα στην αναλογία 10%, που δεν ήταν εμφανής στο Σχημα 6. Παρατηρούμε ότι οι τρείς αυτές αναλογίες έχουν περίπου την ίδια μείωση στο σήμα τους. Επαναλαμβάνουμε ότι τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με σκοπό να βρούμε αναλογίες του PEDOT όπου θα σταθεροποιούταν το σήμα. Αφού σε αυτές τις αναλογίες το σήμα μειώνεται αισθητά, τις απορρίπτουμε.

Παρατηρούμε και πάλι ότι τα σήματα 40% PEDOT και 50% PEDOT είναι αυτά με τις μικρότερες μειώσεις και άρα είναι τα πιο σταθερά. Για να επιλέξουμε ποια από αυτές τις δύο αναλογίες είναι η βέλτιστη, υπολογίζουμε την ποσοστιαία μείωση της $10^{ης}$ κορυφής όλων των αναλογιών σε σχέση με την $1^{η}$ κορυφή. Στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 12) παρουσιάζονται οι ποσοστιαίες αυτές μειώσεις. Οι αναλογίες 10%, 20% και 30% έχουν συμπληρωθεί για πληρότητα.



Σχήμα 12

Από αυτήν την γραφική είναι φανερό ότι η αναλογία 50% μας δίνει το πιο σταθερό και μετρήσιμο σήμα. Παρατηρούμε ότι η αναλογία 40% όχι μόνο έχει μεγαλύτερη μείωση από ότι η αναλογία 50%, αλλά παρουσιάζει και μεγάλο σφάλμα, που δεν το επιθυμούμε.

Επίσης, αξίζει να τονίσουμε κάτι που παρατηρούμε. Είδαμε στο σχήμα (Σχήμα 9) ότι η αναλογία 30% PEDOT είχε το πιο υψηλό σήμα στην $1^{η}$ κορυφή. Όμως, όπως παρατηρούμε σε αυτό το σχήμα (Σχήμα 12), η αναλογία αυτή έχει τέτοια μείωση στο σήμα που σε σχέση με τις άλλες αναλογίες δίνει το $3^{ο}$ σε σειρά υψηλότερο σήμα επί % μείωση στην $10^{η}$ κορυφή.

Από όλα τα παραπάνω καταλήγουμε ότι η αναλογία 50% PEDOT δίνει το πιο σταθερό σήμα και άρα επιλέγουμε αυτή ως τη βέλτιστη αναλογία.

Συμπεράσματα

Στα πλαίσια της εργασιάς αυτής πραγματοποιήθηκαν τρείς ενότητες πειραμάτων και προέκυψαν κάποια συμπεράσματα τα οποία συνοψίζουμε εδώ.

Γενικά, ως προς την τεχνική του LIFT, παρατηρήσαμε ότι είναι δυνατή η εναπόθεση σταγόνων. Επίσης, διαπιστώσαμε ότι μπορούμε να ακινητοποιήσουμε τις ολιγονουκλεοτιδικές αλυσίδες με τη βοήθεια του σιλανίου GOPTS πάνω στην επιφάνεια των μεμβρανών των αισθητήρων χωρητικότητας. Στην συνέχεια, παρατηρήθηκε πως επηρεάζει η ενέργεια της δέσμης του laser τις σταγόνες προς εναπόθεση από το σήμα που έδιναν οι δείκτες φθορισμού και διαπιστώσαμε ότι οι υψηλές ενέργειες χαλάνε τη ομοιομορφία των εναποτιθέμενων σταγόνων, με αποτέλεσμα την λήψη μη ομοιόμορφου σήματος φθορισμού, και παρατηρήθηκε ότι με την αύξηση της ενέργειας αισθητά δεν χάνουν τα βιοϋλικά την βιοενεργότητα τους.

Έπειτα, όσο αφορά την ανίχνευση ατελειών στην αλληλουχία των ολιγονουκλεοτιδικών αλυσίδων παρατηρήσαμε ότι η πλήρως συμπληρωματική δίνει σήμα υβριδοποίησης. Η αλυσίδα με το ένα miss-match δεν έδινε σήμα από το οποίο μπορούσαμε να βγάλουμε συμπεράσματα σχετικά με το αν πραγματοποιείται αυτού του τύπου η υβριδοποίηση. Άρα θα πρέπει να πραγματοποιηθούν και άλλα πειράματα ώστε να μπορούμε να βγάλουμε συμπεράσματα πάνω σε αυτό.

Στα πειράματα για την ανίχνευση του μολύβδου παρατηρήσαμε ότι είναι δυνατή η ανίχνευση του, όμως θα πρέπει να πραγματοποιηθούν και άλλα πειράματα ώστε να σιγουρευτούμε για τα αποτελέσματα που πήραμε.

Τέλος, από τα πειράματα με τις θυλακοειδείς μεμβράνες, διαπιστώσαμε ότι είναι δυνατή η ακινητοποίηση των θυλακοειδών μεμβρανών πάνω στο ηλεκτρόδιο εργασίας του αισθητήρα και ότι είναι δυνατή η ανίχνευση της φωτοσύνθεσης των θυλακοειδών μεμβρανών με αμπερομετρικούς αισθητήρες SPEs. Επίσης, παρατηρούμε ότι ο χρόνος ζωής των θυλακοειδών μεμβρανών μειώνεται μετά από το πέρασμα κάποιων ωρών και άρα η χρήση των αισθητήρων αυτών είναι για περιορισμενη χρονική διάρκεια. Επιπλέον, μελετήσαμε τη δυνατότητα αποθήκευσης των αισθητήρων μαζί με τις εναποτιθέμενες σταγόνες σε κατάψυξη και καταλλήξαμε στο συμπέρασμα ότι μπορούμε να φυλλάξουμε τις θυλακοειδείς μεμβράνες μαζί με τον αισθητήρα εώς και τέσσερις εβδομάδες και να μπορούν να χρησιμοποιηθούν και να δώσουν μετρήσιμο σήμα φώτοσύνθεσης. Τέλος, για να σταθεροποιήσουμε το σήμα που δίνουν οι θυλακοειδής μεμβράνες αναμίξαμε το διάλυμα των θυλακοειδών μεμβρανών με συγκεκριμένα ποσοστά PEDOT για να δούμε πως το πολυμερές θα επηρεάσει τη σταθερότητα του σήματος. Μελετήσαμε τη βέλτιστη αναλογία ως προς τη σταθερότητα του σήματος. Παρατηρήσαμε ότι η αναλογία 50% σε PEDOT είναι αυτή που σταθεροποιεί πιο πολύ το σήμα στην πάροδο του χρόνου, καθώς δείχνει την μικρότερη ποσοστιαία μείωση ανάμεσα σε όλες τις κορυφές του σήματος και έχει το μικρότερο σφάλμα μέτρησης.

Βιβλιογραφία

[1] Gardner J.W. (2000), Μικροαισθητήρες: Αρχές και Εφαρμογές, Θεσσαλονίκη: Εκδόσεις Τζιόλα

[2] Rodriguez-Mozaz S., Marco M.P., Lopez de Alda M.J. and Barcelo D. (2004), Biosensors for environmental applications: Future development trends, Pure Appl. Chem., Vol. 76, No.4, pp.723-752

[3] Mir M., Dondapati S.K., Duarte M.V., Chatzichristidi M., Misiakos K., Petrou P., Kakabakos S.E., Argitis P. and Katakis I. (2010), Electrochemical biosensor microarrayfunctionalized by means of biomolecule friendly photolithography,Biosensors and Bioelectronics, Vol. 25, pp. 2115–2121

[4] Wagata H., Gallage R., Yoshimura M. and Matsushita N. (2009), *Pattering of $BaTiO_3$ by inkjet deposition using a precursor solution*, Materials Science and Engineering B, Vol. 161 , pp.146–150

[5] http://www.laboratoryequipment.com/news/2009/02/nanopattern-device-combined-afm

[6] Bohandy J, Kim B.F and Adrian F.J (), Metal deposition from a supported metal film using an excimer laser, Journal of Applied Physics, Vol. 60, Issue 4

[7] Kaur K.S., Feinaeugle M., Banks D.P., Pietrantonio F.Di, Verona C.L., Sones C.L. and Eason R.W. (2012) Time-resolved shadowgraph imaging of femtosecond laser-induced forward transfer of solid materials, Applied Surface Science, Vol. 258, Issue 22, pp 8475-8483

[8] Chatzipetrou M., Tsekenis G., Tsouti V., Chatzandroulis S., Thanos D., Zergioti I.(2011), Direct laser printing of oligonucleotides for the fabrication of a label-free biosensor, SciVerse ScienceDirect, Vol. 25, pp 851-855

[9] Colina M., Serra P., Fernandez-Pradas J.M., Sevilla L. and Morenza J.L. (2004), DNA deposition through laser induced forward transfer, Biosensors and Bioelectronics, Vol. 20, Issue 8, pp 1638–1642

[10] Duocastella M., Fernández-Pradas J.M., Morenza J.L. and Serra P. (2010), Droplet printing through bubble contact in the laser forward transfer of liquids, Applied Surface Science, Vol. 257, pp 2825-2829

[11] Duocastella M., Colina M., Fernandez-Pradas J.M., Serra P. and Morenza J.L. (2007), Study of the laser-induced forward transfer of liquids for laser bioprinting, Applied Surface Science, Vol. 253, Issue 19, pp 7855–7859

[12] Patrascioiu A., Duocastella M., Fernández-Pradas J.M., Morenza J.L., Serra P. (2010), Liquids microprinting through a novel film-free femtosecond laser based technique, Applied Surface Science, Vol. 257, Issue !!!!!!!!!!!!!!!!!!, pp 5190-5194

[13] Brown Matthew S., Kattamis Nicholas T. and Craig B. Arnold (2011), Time-resolved dynamics of laser-induced micro-jets from thin liquid films, Microfluids and Nanofluids, Vol. 11, Issue 2, pp 199-207

[14] Mezel C., Souquet A., Hallo L. and Guillemot F. (2009), Bioprinting by laser-induced forward transfer for tissue engineering applicationsQ jet formation modelling, Biofabrication, Vol. 2, Number 1

[15] Tsekenis G., Chatzipetrou M., Tanner J., Chatzandroulis S. Thanos D., Tsoukalas D., Zergioti I. (2012), Surface functionalization studies and direct laser printing of oligonucleotides toward the fabrication of a micromembrane DNA capacitive biosensor, Sensors And Actuators B: Chemical

[μισσματψη- 16] Tsouti V., Boutopoulos C., Andreakou P., Ioannou M., Zergioti I., Goustouridis D., Kafetzopoulos D., Tsoukalas D., Normand P., Chatzandroulis S. (2010), Detection of DNA mutations using a capacitive micro-membrane array, Biosensors and Bioelectronics, Vol. 26, pp 1588-1592

[17] Hansen K. M. and Thundat T. (2005), Microcantiliver biosensors, Methods, Vol. 37, Issue 1, pp 57-64

[18] McKendry R., Zhang J., Arntz Y., Strunz T., Hegner M., Lang H. P., Baller M. K., Certa U., Meyer E., Guntherodt H.J. and Gerber C. (2002), Multiple label-free biodetection and quantitative DNA-binding assays on a nanomechanical cantilever array, http://www.pnas.org/content/99/15/9783.short

[19] Zebda A, Labeau M., Diard J. P., Lavalley V.and Stambouli V. (2010), Electrical resistivity dependence of semi-conductive oxide electrode on thelabel-free electrochemical detection of DNA, Sensors and Actuators:B Chemical, Vol. 144, pp 176-182

[20] Meyer Pamela A., Brown Mary J. and Falk Henry (2008), Global approach to reducing lead exposure and poisoning, Mutation Research/Reviews in Mutation Research, Vol. 659, Issue 1-2, pp166-175

[21] Swearingen C.B, Wernette D.P., . Cropek D.M., Lu Yi, Sweedler J.V. and Bohn P.W. (2005), Immobilization of a Catalytic DNA Molecular Beacon on Au for Pb(II) Detection, Analytical Chemistry, Vol. 77, Issue 2, pp 442-448

[22] Raffa V., Mazzolai B., MAttoli V., Mondini A. and Dario P. (2006), Model validation of a mercury sensor, based on the resistivity variation of a thin gold film, Sensors and Actuators: B, Vol. 114, pp 513-521

[23] Lina Y.W., Liub C.W. and Changb H.T. (2011), Fluorescence detection of mercury(II) and lead(II) ions using aptamer/reporter conjugates Talanta Talanta, Vol. 84, pp 324-329

[24] Lu Yi, Liu J., Li J., Bruesehoff R.J., Pavot C. M.-B., Brown A.K. (2003), New highly sensitive and selective catalytic DNA biosensors for metal ions, Biosensors and Bioelectronics, Vol. 18, pp 529-540

[25] Jung Y.C. and Bhushan B. (2007), Wetting transition of water droplets on superhydrophobic patterned surfaces, Scripta Materialia, Vol. 57, Issue 12, pp 1057-1060

[26] Takano Takumi, Masunaga Hiroyasu, Fujiwara Akihiko, Okuzaki Hidenori and Sasaki Takahiko (2012), PEDOT Nanocrystal in Highly Conductive PEDOT:PSS Polymer Films, Biomacromolecules, Vol. 45, Issue 9, pp3859-3865

[27] Kros Alexander,Sommerdilk Nico A.J.M. and Nolte Roeland J.M. (2004), Poly(pyrrole) versus poly(3,4-ethylenedioxythiophene):implications for biosensor applications, Sensors and Actuators B: Chemical, Vol. 106, Issue 1, pp289-295

[28] Bedford Nicholas M., Winget Douglas G., Punnamaraju Srikoundinya and Steckl Andrew J. (2011), Immobilization of Stable Thylakoid Vesicles in Conductive Nanofibers by Electrospinning, Biomacromolecules, Biomacromolecules, Vol. 12, Issue 3, pp 778-784