



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΥΣΙΚΗΣ
ΔΠΜΣ: “Μικροσυστήματα & Νανοδιατάξεις”

**Ανάπτυξη Ηλεκτροχημικών Αισθητήρων με Τεχνολογία
Εκτύπωσης Λείζερ για Περιβαλλοντικές Εφαρμογές**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
Γκούζου Άλκηστη

Επιβλέπουσα: Ιωάννα Ζεργιώτη
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ε.Μ.Π.

Αθήνα
Ιούνιος 2013



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΥΣΙΚΗΣ
ΔΠΜΣ: “Μικροσυστήματα & Νανοδιατάξεις”

**Ανάπτυξη Ηλεκτροχημικών Αισθητήρων με Τεχνολογία
Εκτύπωσης Λείζερ για Περιβαλλοντικές Εφαρμογές**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
Γκούζου Άλκηστη

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Ιωάννα Ζεργιώτη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ε.Μ.Π. (Επιβλέπουσα)
Ιωάννης Ράπτης, Αναπληρωτής Καθηγητής Ε.Μ.Π.
Δημήτριος Τσουκαλάς, Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Αθήνα
Ιούνιος 2013

“Knowledge is power.”
(Francis Bacon, 1561 – 1617)

“A life spent making mistakes is not only more honorable, but more useful than a life
spent doing nothing.”
(George Bernard Shaw, 1856 – 1950)

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στον Τομέα Φυσικής της Σχολής Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών Επιστημών του Ε.Μ.Π., στα πλαίσια του Διατμηματικού Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών “Μικροσυστήματα και Νανοδιατάξεις” το ακαδημαϊκό έτος 2012 – 2013. Την τριμελή εξεταστική επιτροπή αποτέλεσαν η επιβλέπουσα Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ε.Μ.Π. Ιωάννα Ζεργιώτη, ο Αναπληρωτής Καθηγητής Ε.Μ.Π. Ιωάννης Ράπτης και ο Καθηγητής Ε.Μ.Π. Δημήτριος Τσουκαλάς.

Χωρίς να θέλω να περιαυτολογήσω, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιωάννα Ζεργιώτη για την ανάθεση και την επίβλεψη αυτής της εργασίας, καθώς και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε ώστε να με δεχτεί στα εργαστήριά της και την ευκαιρία να έρθω σε επαφή με τον ευρύτερο επιστημονικό κόσμο, πέρα από τα ακαδημαϊκά όρια, χάρη στη δουλειά που ετοιμάσαμε μαζί.

Τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, τον Αναπληρωτή Καθηγητή Ιωάννη Ράπτη και τον Καθηγητή Δημήτριο Τσουκαλά για την καθημερινή αλληλεπίδραση και τη μέχρι στιγμής επικοινωνία καθ’ όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Το Δρ. Γεώργιο Τσέκενη και το Δρ. Ελευθέριο Τουλουπάκη για τις χρήσιμες σ’ εμένα γνώσεις τους ώστε να καταλάβω όσο το δυνατόν καλύτερα τους μηχανισμούς που διέπονται στον τομέα της Βιολογίας με τον οποίο ποτέ δεν ήμουν ιδιαίτερα εξοικειωμένη.

Τους μεταπτυχιακούς και διδακτορικούς φοιτητές της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Ι. Ζεργιώτη, το Γιάννη Θεοδωράκο, τη Μαρίνα Μακρύγιαννη, το Σίμο Παπάζογλου και τον Ευθύμη Σερπετζόγλου για το κλίμα συνεργασίας και εμπιστοσύνης, πραγματικά ήταν μεγάλη μου χαρά που μοιράστηκα μαζί σας τα ίδια εργαστήρια. Ιδιαίτερος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Υ.Δ. Μαριαννέζα Χατζηπέτρου για όλη τη βοήθεια, την υποστήριξη, τον επαγγελματισμό, την ανοχή και το ζήλο που έδειξε όλο αυτό το διάστημα που δουλέψαμε μαζί. Χωρίς τη δική της συμβολή, ελάχιστα θα ήταν αυτά που θα διαβάζατε στις σελίδες της εργασίας που κρατάτε στα χέρια σας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους φίλους και γνωστούς για την κατανόηση και το ενδιαφέρον που έδειξαν όλο αυτό το διάστημα. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον αδερφό μου, Στάθη, και τους γονείς μου, Σωτήρη και Κωνσταντίνα, για όλη τους την αγάπη και την συμπαράσταση όλα αυτά τα χρόνια.

Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη.....	1
Abstract.....	2
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΩΝ	3
1.1 Εισαγωγή.....	3
1.2 Αρχή λειτουργίας των βιοαισθητήρων.....	5
1.2.1 Βιοϋποδοχείς	6
1.2.2 Μορφομετατροπέας.....	7
1.3 Ηλεκτροχημικοί Αισθητήρες.....	9
1.3.1 Ποτενσιομετρικοί αισθητήρες.....	10
1.3.2 Αμπερομετρικοί αισθητήρες	11
1.3.3 Αγωγιμομετρικοί Αισθητήρες.....	12
1.4 Αναφορές Κεφαλαίου.....	12
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΜΕΣΗΣ ΕΚΤΥΠΩΣΗΣ.....	15
2.1 Εισαγωγή.....	15
2.2 Ορισμός και κατηγορίες της Άμεσης Εκτύπωσης.....	16
2.3 Άμεση εκτύπωση με τεχνολογία σταγονιδίων	16
2.3.1 Μέθοδος εκτύπωσης ψεκασμού μελάνης.....	16
2.3.2 Μέθοδος ψεκασμού αεροζόλ.....	19
2.4 Άμεση εκτύπωση με τεχνολογία αντλίας.....	21
2.5 Άμεση εκτύπωση με τεχνολογία ακίδας.....	23
2.6 Άμεση εκτύπωση με τεχνολογία λέιζερ.....	25
2.6.1 Μέθοδοι Άμεσης Εκτύπωσης FGDW και LGDW	25
2.6.2 Τεχνική Απευθείας Μικροεναπόθεσης με Λέιζερ.....	26
2.7 Συμπεράσματα.....	27
2.8 Η τεχνική LIFT στην ανάπτυξη Μικροαισθητήρων.....	28
2.9 Αναφορές Κεφαλαίου.....	29
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΤΕΧΝΙΚΗ ΑΠΕΥΘΕΙΑΣ ΜΙΚΡΟΕΝΑΠΟΘΕΣΗΣ ΜΕ ΛΕΙΖΕΡ	32
3.1 Αρχή λειτουργίας της τεχνικής LIFT.....	32
3.2 Πειραματική Διάταξη.....	34
3.2.1 Πηγή Λέιζερ.....	36
3.2.2 Εξασθενητής Δέσμης.....	36
3.2.3 Σύστημα Τηλεσκοπικών Φακών.....	37
3.2.4 Επίπεδα Κάτοπτρα.....	37

3.2.5	Μάσκα Δέσμης.....	37
3.2.6	Αντικειμενικός Φακός.....	37
3.2.7	Βάσεις Στήριξης Υποστρώματος Δότη και Αποδέκτη	37
3.2.8	Οπτικό Μικροσκόπιο	38
3.2.9	Βηματικοί Κινητήρες και Η/Υ.....	38
3.3	Αναφορές Κεφαλαίου.....	39
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ ΓΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗΣ DNA		41
4.1	Εισαγωγή.....	41
4.2	Προετοιμασία των Υποστρωμάτων των Αποδεκτών.....	42
4.3	Εναπόθεση των Ολιγονουκλεοτιδίων με την τεχνική LIFT.....	44
4.3.1	Ανίχνευση Υβριδοποίησης DNA με Φθορισμό	44
4.3.2	Ανίχνευση Υβριδοποίησης DNA με Ηλεκτροχημεία.....	45
4.4	Αναφορές Κεφαλαίου.....	54
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ ΑΠΤΙΝΩΝ ΓΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΙΟΝΤΩΝ Pb (II).....		58
5.1	Περιβαλλοντική Μόλυνση.....	58
5.2	Απτίνες και Περιβαλλοντικές Εφαρμογές.....	59
5.3	Βιοαισθητήρες για Ανίχνευση Ιόντων Βαρέων Μετάλλων	62
5.3.1	Ηλεκτροχημικοί Αισθητήρες.....	62
5.3.2	Αισθητήρες Φθορισμού	64
5.3.3	Αισθητήρες Μικροδοκών	67
5.4	Εναπόθεση των Απτινών με την τεχνική LIFT.....	68
5.5	Πρωτόκολλο Υβριδοποίησης και Ανίχνευσης Ιόντων Pb(II).....	69
5.5.1	Ανίχνευση Ιόντων Pb(II) με Φθορισμό.....	70
5.5.2	Ανίχνευση Ιόντων Pb(II) με Ηλεκτροχημεία	72
5.6	Αναφορές Κεφαλαίου.....	76
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΕΝΖΥΜΙΚΟΙ ΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ ΓΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΤΕΧΟΛΗΣ.....		78
6.1	Φαινολικές Ενώσεις και Λακάση	78
6.2	Ακινητοποίηση του Ενζύμου	79
6.3	Αρχή Λειτουργίας του Ενζυμικού Αισθητήρα.....	80
6.4	Πειραματική Διαδικασία.....	81
6.5	Ανίχνευση της Κατεχόλης.....	81
6.6	Αποτέλεσμα Εκτύπωσης στο Ηλεκτρόδιο Εργασίας.....	84
6.7	Ενζυμικοί Αισθητήρες για Περιβαλλοντικό Έλεγχο.....	87
6.7.1	Ανίχνευση Diuron με τον Ενζυμικό Αισθητήρα.....	87

6.7.2	Ανίχνευση Ιόντων Pb(II) με τον Ενζυμικό Αισθητήρα.....	88
6.8	Αναφορές Κεφαλαίου.....	89
	Συμπεράσματα.....	92
	Δημοσιεύσεις Αποτελεσμάτων.....	93

Περίληψη

Ο κλάδος της Μικροηλεκτρονικής με τη ραγδαία ανάπτυξή του προσέφερε νέες διεξόδους στην ανάγκη για ανίχνευση και καθορισμό διάφορων αναλυτών με τη χρήση των βιοαισθητήρων. Σε αυτούς, οι ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες έχουν τη δυνατότητα να ανιχνεύουν το ηλεκτροχημικό σήμα μίας οξειδοαναγωγικής αντίδρασης που προκύπτει από την πρόσδεση του βιοϋποδοχέα με τον αναλύτη και να το μετατρέπουν σε μετρήσιμο σήμα.

Ο βιοϋποδοχέας αφενός επιλέγεται αναλόγως τη χρήση του αισθητήρα. Ωστόσο, πρέπει αφετέρου να επιλεγθεί και η τεχνική εναπόθεσης αυτού πάνω στην επιφάνεια του αισθητήρα. Η τεχνική απευθείας μικροεναπόθεσης με λέιζερ (laser-induced forward transfer – LIFT) είναι από τις τεχνικές άμεσης εκτύπωσης που ξεχωρίζουν και που αξιοποιείται στην παρούσα εργασία για την ανάπτυξη ηλεκτροχημικών βιοαισθητήρων.

Με το βιοϋποδοχέα να είναι μία αλληλουχία DNA, αναπτύχθηκαν βιοαισθητήρες από εμπορικούς αμπερομετρικούς αισθητήρες (screen printed electrodes – SPEs) με ηλεκτρόδιο εργασίας από χρυσό για ανίχνευση υβριδοποίησης του DNA και για ανίχνευση ιόντων του βαρέου μετάλλου Pb(II), το οποίο έχει απασχολήσει τα τελευταία χρόνια την επιστημονική κοινότητα για τις δυσμενείς επιπτώσεις του στο περιβάλλον και στον άνθρωπο. Στην πρώτη εφαρμογή, ο αισθητήρας ανιχνεύει την υβριδοποίηση της δίκλωνης αλυσίδας DNA, ενώ στη δεύτερη ανιχνεύει τη διάσπασή της, όπως αυτή προκύπτει από την καταλυτική αντίδραση που υπάρχει ως πληροφορία στην αλληλουχία των βάσεων των επιμέρους αλυσίδων της παρουσία μολύβδου.

Τέλος, οι ίδιοι αμπερομετρικοί αισθητήρες με ηλεκτρόδιο εργασίας από γραφίτη εκτυπώθηκαν με το ένζυμο της λακάσης για την ανίχνευση μίας φαινολικής ένωσης, της κατεχόλης. Η δυναμική της τεχνικής LIFT έγκειται στο γεγονός ότι δεν πρόκειται μόνο για μία τεχνική εκτύπωσης του βιολογικού υλικού, αλλά επιπλέον και ως μία τεχνική ακινητοποίησης του ενζύμου πάνω στην επιφάνεια του αισθητήρα. Ο συγκεκριμένος βιοαισθητήρας θα μπορούσε να αξιοποιηθεί και ως μία μέθοδος έμμεσης ανίχνευσης ιόντων Pb(II), καθώς και διαφόρων φυτοφαρμάκων και ζιζανιοκτόνων.

Abstract

Biosensors are one of the fortunate outcomes generated by the fast-paced development of the field of Microelectronics, both for detecting and determining various analytes. One particular type of these sensors, the electrochemical ones, is designed to detect an electrochemical signal which stems from the redox reactions upon binding of the analyte to the bioreceptor's site.

While selecting the appropriate bioreceptor appears to be rather important concerning the sensor's potential use, the most suitable deposition technique must also be taken into account. Out of all the direct-write techniques, the laser-induced forward transfer (LIFT) stands out and is being used in this work as an advanced tool for the fabrication of electrochemical biosensors.

With the bioreceptor being a DNA sequence, DNA-based sensors were fabricated from commercial amperometric sensors, the screen printed electrodes (SPEs) with a golden working electrode. This device was able to detect the DNA hybridization and could be a potential solution for the detection of Pb(II) ions; a heavy metal which has rung the alarm of the scientific community due to its adverse effects on the environment and human beings. In the first application, the sensor detects the hybridization of the double-stranded DNA, whereas in the latter one it detects its cleavage which originates from the catalytic reaction dictated from the sequences of each single-stranded DNA in the presence of lead.

Finally, another type of SPEs with their working electrode made with graphite was printed with the laccase enzyme for the detection of a phenolic compound, namely catechol. The LIFT technique not only enables the successful deposition of the biomaterial, but also assures the immobilization of the enzyme onto the surface of the sensor. This biosensor could be exploited for the indirect detection of Pb(II) ions, as well as several herbicides and pesticides.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΩΝ

1.1 Εισαγωγή

Με την ανάπτυξη της Τεχνολογίας και της Μοριακής Βιολογίας, σημειώθηκε μεγάλη πρόοδος στην εξέταση της γονιδιακής έκφρασης υπό ειδικές συνθήκες και για την ανίχνευση νουκλεϊκών οξέων παθογόνων οργανισμών π.χ. επιβλαβών ιών σε δείγματα ελέγχου. Η πρόοδος αυτή επιτεύχθηκε με τη χρήση των μικροσυστοιχιών (microarrays) γονιδίων, οι οποίες αναπτύχθηκαν με σκοπό να καταστεί δυνατή η χαρτογράφηση ενός αριθμού από ολοκληρωμένες αλληλουχίες γονιδιωμάτων ώστε να διερευνηθεί το μεγάλο πλήθος από πλήρως χαρακτηρισμένα γονίδια. Η ισχύς της τεχνολογίας αυτής επιδείχθηκε από αντίστοιχες εργασίες τόσο από στο χώρο της βιομηχανίας [1–2], όσο και στον ακαδημαϊκό [3–4].

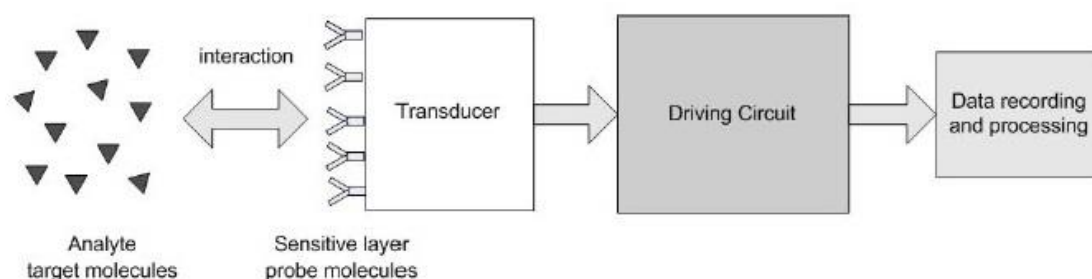
Οι μικροσυστοιχίες χρησιμοποιούνται για τη μέτρηση του αγγελιοφόρου ριβονουκλεϊκού οξέος (mRNA) [5], για το χαρακτηρισμό πολυμορφισμών νουκλεοτιδίων [6] και γενικά σαν διαγνωστικό εργαλείο ώστε να καθοριστεί η διαγραφή ή η ενίσχυση χρωμοσωμάτων [7]. Ωστόσο, το μέγεθος των δειγμάτων και το πλήθος των προπαρασκευαστικών σταδίων τα οποία απαιτούνται, περιορίζουν τη χρήση των μικροσυστοιχιών στη μελέτη της απόκρισης συγκεκριμένων ιστών ή συγκεκριμένων κυττάρων [8] και δεν επιτρέπουν την παραγωγή των αποτελεσμάτων σε πραγματικό χρόνο (real – time).

Στον αντίποδα, οι βιοαισθητήρες ανίχνευσης βιολογικού, και ειδικότερα, γενετικού υλικού, οι οποίοι αποτελούν τη μετεξέλιξη των μικροσυστοιχιών, διαθέτουν χαρακτηριστικά ώστε να υπερκεράσουν τα παραπάνω μειονεκτήματα και να προσφέρουν αναλυτικά εργαλεία για γενετικές ανιχνεύσεις, και γενικά ανιχνεύσεις βιολογικού υλικού, τα οποία θα διακρίνονται από ταχύτητα και υψηλή ευαισθησία [9]. Το κίνητρο για την ανάπτυξη αυτών των διατάξεων ικανά να ανιχνεύουν βιομοριακές αλληλεπιδράσεις, όπως την υβριδοποίηση DNA (DNA hybridization), την αλληλεπίδραση αντιγόνου – αντισώματος (antigen – antibody binding), την αλληλεπίδραση πρωτεΐνων – ligand (protein – ligand binding), κ.ά., είναι η ικανότητα τους να χρησιμοποιούνται για έγκαιρη διάγνωση.

Γενικότερα, τα μικροσυστήματα είναι “πολύ μικρά συστήματα” ή “συστήματα που αποτελούνται από μικρά μέρη” και εμφανίστηκαν το 1960 κατά τη διάρκεια της προσπάθειας δημιουργίας ολοκληρωμένων αισθητήρων. Το κίνητρο για την εφαρμογή είναι το χαμηλό κόστος και η δυνατότητα να συνδυαστεί ο αισθητήρας με τα απαραίτητα κυκλώματα στην ίδια ψηφίδα πυριτίου [10]. Γι’ αυτό και ο όρος μικροσυστήματα αναφέρεται στους ολοκληρωμένους αισθητήρες, επενεργητές και στα ηλεκτρονικά που χρησιμοποιούνται για την επεξεργασία του σήματος και όλα αυτά στο ίδιο υπόστρωμα. Η ανάπτυξη της μικροηλεκτρονικής και της μικρομηχανικής δημιούργησαν παγκόσμιο ενδιαφέρον γύρω από το πεδίο των μικροσυστημάτων, τα οποία τώρα καλούνται Μικροηλεκτρομηχανικά Συστήματα

(MEMS, Microelectromechanical Systems), και των εφαρμογών τους σε αρκετές πλευρές της καθημερινής ζωής. Σήμερα οι αισθητήρες αποτελούν το 40% των μικροηλεκτρομηχανικών συστημάτων και τα πλεονεκτήματά τους αφορούν τόσο οικονομικούς όσο και τεχνολογικούς παράγοντες [11].

Ένας αισθητήρας είναι μια συσκευή που ανιχνεύει ένα σήμα και το μετατρέπει σε μετρήσιμη ποσότητα. Ο τύπος του αισθητήρα που ανιχνεύει βιολογικά συστατικά χρησιμοποιώντας βιολογικούς παράγοντες καλείται βιοαισθητήρας (biosensors ή affinity biosensors). Οι βιοαισθητήρες αποτελούνται από τρία μέρη: ένα βιολογικό ευαίσθητο παράγοντα, ένα μετατροπέα και το κύκλωμα οδήγησης (Εικόνα 1.1). Σε ότι αφορά τον βιολογικό παράγοντα, ο οποίος, στις περισσότερες περιπτώσεις, είναι ακινητοποιημένα μόρια (probe molecules), αυτός δένεται επιλεκτικά με συγκεκριμένους αναλύτες ή μόρια – στόχους (analyte, target molecule). Ο μετατροπέας (transducer) που είναι και το πιο σημαντικό μέρος του βιοαισθητήρα μετατρέπει το σήμα που προέρχεται από την αλληλεπίδραση probe – target σε μετρήσιμο σήμα. Τελικά αυτό το σήμα μετατρέπεται σε πιο σταθερό και ενισχυμένο ηλεκτρικό σήμα μέσω του κυκλώματος οδήγησης.



Εικόνα 1.1: Σχηματική απεικόνιση ενός βιοαισθητήρα [12].

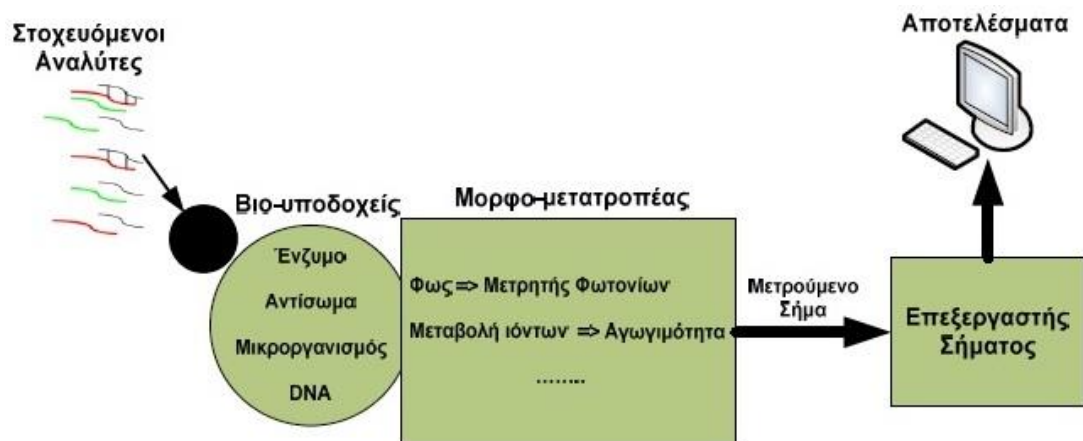
Οι σημαντικότερες προκλήσεις που θέτει η τεχνολογία βιοαισθητήρων αφορούν: 1) στην ενσωμάτωση στοιχείων μικροηλεκτρονικής σε τεχνολογίες ανίχνευσης βιολογικού υλικού με βάση τα μικροροϊκά κυκλώματα (microfluidic chips) με τρόπο που θα επιτρέπει τη βιομηχανοποίηση και την παραγωγή μεγάλης κλίμακας, 2) στην αυτοματοποίηση της διαδικασίας ανίχνευσης του μεταβαλλόμενου χαρακτηριστικού μεγέθους του βιοαισθητήρα και συσχέτισής του με το βιολογικό φαινόμενο και 3) στην δυνατότητα άμεσης μετατροπής του μεταβαλλόμενου χαρακτηριστικού μεγέθους του βιοαισθητήρα σε μετρούμενο σήμα χωρίς την ανάγκη για πολύπλοκη επεξεργασία του σήματος ή/και στατιστική ανάλυση.

Μεταξύ των πεδίων εφαρμογής των βιοαισθητήρων περιλαμβάνονται η μοριακή διαγνωστική [13–14], η γονιδιωματική φαρμακολογία (pharmacogenomics) [15], η ανάλυση φαρμάκων (drug screening) [16], η ιατρική διαγνωστική [17], η ανάλυση τροφίμων [18] και ο περιβαλλοντολογικός έλεγχος [19].

1.2 Αρχή λειτουργίας των βιοαισθητήρων

Οι βιοαισθητήρες αποτελούνται από δύο βασικές συνιστώσες: τον βιοϋποδοχέα (bio – receptor) και τον μορφομετατροπέα (transducer). Ο βιοϋποδοχέας είναι κατάλληλο βιομόριο το οποίο αναγνωρίζει το προσδιοριζόμενο αναλύτη (analyte) και αλληλεπιδρά με αυτόν. Ο μορφομετατροπέας μετατρέπει το γεγονός της αναγνώρισης του αναλύτη σε μετρίσιμο σήμα (ηλεκτρικό, οπτικό κ.ά.). Τις δύο συνιστώσες συμπληρώνει ένας επεξεργαστής του μετρούμενου σήματος για την εξαγωγή συμπερασμάτων και την επικοινωνία ή/και παρουσίαση των αποτελεσμάτων.

Βασικό πλεονέκτημα των βιοαισθητήρων είναι η δυνατότητα ενσωμάτωσης των δύο βασικών συνιστωσών – δυνητικά και της τρίτης – σε ένα κοινό αισθητήρα (Εικόνα 1.2). Ο συνδυασμός επιτρέπει την ανίχνευση και τη μέτρηση του αναλύτη, χωρίς τη χρήση αντιδραστηρίων. Για παράδειγμα, η συγκέντρωση γλυκόζης σε δείγμα αίματος, μπορεί να μετρηθεί άμεσα με τοποθέτηση του βιοαισθητήρα στο δείγμα. Η διαδικασία αυτή βρίσκεται σε αντίθεση με αντίστοιχες συμβατικές εργαστηριακές διαδικασίες οι οποίες απαιτούν πολλαπλά στάδια και τη χρήση συγκεκριμένων αντιδραστηρίων σε κάθε ένα από αυτά.



Εικόνα 1.2: Διαμόρφωση ενός βιοαισθητήρα από τις βασικές του συνιστώσες [12].

Οι βιοαισθητήρες έχουν γενικά τη δυνατότητα να είναι επισημασμένοι με δείκτες ή όχι. Οι δείκτες αποτελούν τον εύκολο τρόπο ανίχνευσης της αλληλεπίδρασης μεταξύ των ακινητοποιημένων βιομορίων και των μορίων – στόχων. Τα μόρια στόχοι επισημαίνονται με δείκτες φθορισμού, ενεργά ένζυμα, μαγνητικές χάντρες, ραδιενεργά είδη ή κβαντικές τελείες [20–21]. Η επισήμανση των μορίων – στόχων συμβαίνει είτε πριν την αλληλεπίδραση είτε ένα στάδιο μετά τη πρόσδεση στα στοιχεία αίσθησης. Χρησιμοποιώντας μικροσυστοιχίες, τα μόρια ακινητοποιούνται σε διαφορετικές πλευρές του ίδιου κομματιού γυαλιού και το σήμα παρατηρείται στις θέσεις στις οποίες τα επισημασμένα μόρια – στόχοι αλληλεπιδρούν με τα ακινητοποιημένα μόρια. Αυτές οι συστοιχίες επιτρέπουν τη

γρήγορη και εύκολη ανάλυση γονιδιώματος καθώς έχουν τη δυνατότητα να περιλαμβάνουν εκατομμύρια στοιχεία βιοαίσθησης (dots) σε ένα τετραγωνικό εκατοστό [22].

Ωστόσο οι τεχνικές που χρησιμοποιούν δείκτες παρουσιάζουν αρκετά μειονεκτήματα αφού είναι χρονοβόρες, έχουν υψηλό κόστος και μπορούν να επηρεάσουν την αλληλεπίδραση μεταξύ probe και target. Επιπλέον, με αυτή τη μέθοδο, η αλληλεπίδραση δεν μπορεί να ανιχνευτεί σε πραγματικό χρόνο. Εκτός από αυτά, για να μετρηθεί ο φθορισμός ή το σήμα που προέρχεται από τεχνικές που χρησιμοποιούνται δείκτες απαιτούνται συστήματα ογκώδη και υψηλού κόστους τα οποία εμποδίζουν τη δυνατότητα δημιουργίας μικροσυστημάτων ανάλυσης στα σημεία περίθαλψης.

Το μεγάλο ενδιαφέρον για τη μη γενικευμένη ιατρική οδήγησε στην ανάγκη δημιουργίας γρήγορων, φτηνών και φορητών συσκευών που φανερώνουν το γενετικό προφίλ με ευκολία και ακρίβεια. Έτσι, δημιουργήθηκαν μικροσυστήματα και αξιοποιήθηκαν μέθοδοι χωρίς δείκτες, όπου σε αυτή τη κατηγορία ανήκουν οι ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες, οι οποίοι μπορεί να είναι ποτενσιομετρικοί, αμπερομετρικοί ή αγωγιμομετρικοί.

Προς το παρόν, στους αισθητήρες όπου δεν χρησιμοποιούνται δείκτες οι πυκνότητες των στοιχείων αίσθησης δεν μπορεί να είναι πολύ υψηλές και η ευαισθησία τους είναι υπό διερεύνηση. Ωστόσο, τα εμπόδια που εμφανίζουν οι μέθοδοι με δείκτες δεν παρουσιάζονται στις τεχνικές χωρίς επισήμανση καθώς τα μόρια – στόχοι που ανιχνεύονται δεν είναι τροποποιημένα. Στους αισθητήρες χωρίς δείκτες δεν χρειάζονται επιπλέον παράγοντες για την ανίχνευση και ο όγκος και το κόστος των διατάξεων μπορούν να μειωθούν σημαντικά. Επίσης η ηλεκτρική ανίχνευση μπορεί να προσφέρει χαμηλή κατανάλωση ισχύος και ολοκλήρωση του συστήματος εξόδου στον αισθητήρα. Ένα σημαντικό πλεονέκτημα των χωρίς επισήμανση αισθητήρων είναι ότι η αλληλεπίδραση ανιχνεύεται σε πραγματικό χρόνο. Οι μετρήσεις αυτές επιτρέπουν τη μελέτη της κινητικής των αλληλεπιδράσεων και κατά συνέπεια την κατανόηση των φυσικών διαδικασιών που λαμβάνουν χώρα [23].

1.2.1 Βιοϋποδοχείς

Για την αναγνώριση του αναλύτη, χρησιμοποιούνται ως βιοϋποδοχείς ένζυμα, αντισώματα και νουκλεϊκά οξέα. Σημαντικό στοιχείο για τη λειτουργία ενός βιοαισθητήρα είναι η ακινητοποίηση του μορίου του βιοϋποδοχέα στο πεδίο δράσης (επιφάνεια) του μορφομετατροπέα. Η ακινητοποίηση μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με φυσική παγίδευση ή με χημική προσκόλληση. Στη διαδικασία αυτή απαιτούνται ελάχιστες ποσότητες μορίων του βιοϋποδοχέα, οι οποίοι στη συνέχεια μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε επαναληπτικές μετρήσεις.

Τα ένζυμα αποτελούν το συνηθέστερο τύπο βιοϋποδοχέα στις εφαρμογές βιοαισθητήρων. Επίσης, τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιούνται, με διαρκώς αυξανόμενο ρυθμό, αντισώματα και πρωτεΐνες. Η εξειδίκευση ενός βιοαισθητήρα – αναφορικά με την δυνατότητά του να εντοπίζει μόνο τον αναλύτη απορρίπτοντας άλλα στοιχεία – βασίζεται στην εξειδίκευση του αντίστοιχου βιοϋποδοχέα. Οι συνηθέστεροι τύποι βιοϋποδοχέων έχουν ως εξής:

- **Ένζυμα:** Ένα ένζυμο διαθέτει τριδιάστατη δομή η οποία ενσωματώνει μόνο ένα συγκεκριμένο υπόστρωμα. Ένα ένζυμο έχει προέλθει από μια πρωτεΐνη η οποία έχει συντεθεί στο κύτταρο από αμινοξέα με βάση την κωδικοποίηση του DNA. Τα ένζυμα δρουν ως καταλύτες βιοχημικών αντιδράσεων οι οποίες πραγματοποιούνται στο κύτταρο, τα αποτελέσματα των οποίων ανιχνεύονται από τον μορφομετατροπέα. Για να διατηρηθεί υψηλή η δραστηριότητα των ενζύμων, η θερμοκρασία και το pH του περιβάλλοντος πρέπει να διατηρηθεί σε κατάλληλα επίπεδα.
- **Αντισώματα:** Τα απλούστερα αντισώματα περιγράφονται συνήθως ως μόρια με δύο όμοια σημεία στα οποία μπορούν να προσκολληθούν αντιγόνα. Σε αντίθεση με τα ένζυμα τα οποία δρουν ως καταλύτες, τα αντισώματα προσελκύουν αντιγόνα αφαιρώντας τα από το βιολογικό σύστημα. Ο μορφομετατροπέας ανιχνεύει τη μείωση/απουσία των αντισωμάτων στο βιολογικό σύστημα.
- **Πρωτεΐνες:** Οι πρωτεΐνες – βιοϋποδοχείς είναι πρωτεϊνικά μόρια τα οποία αναπτύσσουν δυνάμεις συνάφειας με ορμόνες, αντισώματα, ένζυμα και άλλα βιολογικά ενεργά στοιχεία για τα οποία και δρουν ως βιοϋποδοχείς.
- **Άλλοι βιοϋποδοχείς:** Στην θεωρία, οποιοδήποτε βιομόριο το οποίο διαθέτει την δυνατότητα αναγνώρισης του αναλύτη μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν βιοϋποδοχέας. Στην πράξη, ολόκληρα κύτταρα έχουν χρησιμοποιηθεί για το σκοπό αυτό.

1.2.2 Μορφομετατροπέας

Ο μορφομετατροπέας μετατρέπει την αναγνώριση ενός βιολογικού φαινομένου σε μετρήσιμο μέγεθος. Τυπικά, αυτό επιτυγχάνεται μετρώντας την μεταβολή ενός χαρακτηριστικού μεγέθους, η οποία λαμβάνει χώρα κατά την αντίδραση του βιοϋποδοχέα με τον αναλύτη. Για παράδειγμα, το ένζυμο της γλυκοζοξειδάσης, το οποίο χρησιμοποιείται σαν βιοϋποδοχέας στους βιοαισθητήρες μέτρησης γλυκόζης, καταλύει την αντίδραση της γλυκόζης και του οξυγόνου. Για να μετρηθεί η συγκέντρωση της γλυκόζης μπορούν να χρησιμοποιηθούν τρεις διαφορετικοί τύποι μορφομετατροπέων:

- Αισθητήρας οξυγόνου για τη μέτρηση της συγκέντρωσης του.
- Αισθητήρας pH για τη μέτρηση της οξύτητας των προϊόντων της αντίδρασης.

- Αισθητήρας υπεροξειδίου για τη μέτρηση της συγκέντρωσης υπεροξειδίου του οξυγόνου (επίσης προϊόν της αντίδρασης).

Όλοι οι παραπάνω μορφομετατροπείς μετατρέπουν τις σχετικές συγκεντρώσεις σε ηλεκτρικά σήματα (ρεύμα, τάση και ρεύμα αντίστοιχα).

Οι αντιδράσεις οι οποίες εμπλέκονται στη αναγνώριση του βιολογικού υλικού συχνά παράγουν χημικά στοιχεία τα οποία είναι δυνατόν να μετρηθούν με ηλεκτροχημικές μεθόδους. Παρακάτω ακολουθεί μια σύντομη αναφορά στους συνηθέστερους τύπους μορφομετατροπέων ανεξάρτητα από τη κατηγορία στην οποία αυτή ανήκουν.

- **Αμπερομετρικοί:** Η αμπερομέτρηση εκμεταλλεύεται την παραγωγή υπεροξειδίων του υδρογόνου (H_2O_2) ή διοξειδίων του οξυγόνου κατά την βιολογική αντίδραση του βιοϋποδοχέα με τον αναλύτη. Τα προϊόντα αυτά είναι δυνατόν να μετρηθούν με ένα ζεύγος ηλεκτροδίων εφαρμόζοντας κατάλληλη τάση στο ένα ηλεκτρόδιο, σε σχέση με την τάση αναφοράς στο άλλο ηλεκτρόδιο. Τότε τα προσδιοριζόμενα στοιχεία (H_2O_2 ή O_2) απωθούνται από το ηλεκτρόδιο γεγονός το οποίο παράγει ροή ηλεκτρικού ρεύματος.
- **Ποτενσιομετρικοί:** Κατά την ποτενσιομέτρηση, χρησιμοποιείται μια μεμβράνη ως ηλεκτρόδιο της οποίας μετράται το ηλεκτρικό δυναμικό. Η διαφορά δυναμικού προκύπτει από την διαφορά στη συγκέντρωση θετικά φορτισμένων ιόντων (πχ. H^+) κατά μήκος της μεμβράνης.
- **Αγωγιμομετρικοί:** Η μέτρηση της αγωγιμότητας χρησιμοποιείται για τον καθορισμό του ρυθμού της βιολογικής αντίδρασης μετρώντας τις διαφοροποιήσεις στην αγωγιμότητα η οποία προκαλείται από τη μετακίνηση ιόντων. Πολλές βιολογικές αντιδράσεις στις οποίες χρησιμοποιείται ένζυμο ως βιοϋποδοχέας, καταλήγουν στην διαφοροποίηση της συνολικής συγκέντρωσης ιόντων. Το γεγονός αυτό καταδεικνύει την καταλληλότητά τους για χρήση σε βιοαισθητήρες μέτρησης της αγωγιμότητας.
- **Χωρητικοί:** Η μέτρηση της χωρητικότητας μπορεί να αξιοποιηθεί ως μορφομετατροπέας στις περιπτώσεις όπου η βιολογική αντίδραση αναγνώρισης προκαλεί μεταβολές στη διηλεκτρική σταθερά του μέσου στην περιοχή του βιοϋποδοχέα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η αντίδραση μεταξύ αντιγόνων και αντισωμάτων.
- **Φωτομετρικοί:** Στη φωτομέτρηση μετράται το φως το οποίο εκπέμπεται από μόρια – στόχους. Για τη λειτουργία της μεθόδου ένα εκ των αντιδραστηρίων ή των προϊόντων της σχετικής με την αναγνώριση βιολογικής αντίδρασης συνδέεται με φθορίζοντα μόρια. Συνήθως, γίνεται χρήση οπτικής ίνας για την οδήγηση του σήματος φωτός από τον εκπομπό στον συλλέκτη. Εναλλακτικά, το δείγμα φωτοβολείται και γίνεται χρήση κάμερας για την ανίχνευση μεταβολών στις φωτεινές ενδείξεις.
- **Πιεζοηλεκτρικοί:** Οι πιεζοηλεκτρικές συσκευές και οι συσκευές ακουστικών συχνοτήτων αξιοποιούν επιφάνειες οι οποίες είναι ευαίσθητες στις αλλαγές

της μάζας που βρίσκεται στην επιφάνειά τους. Αυτού του τύπου οι μορφομετατροπείς αξιοποιούνται σε βιολογικές αντιδράσεις αναγνώρισης οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα την αλλαγή της μάζας των βιοϋποδοχέων ως αποτέλεσμα της προσκόλλησης ή αποκόλλησης του αναλύτη. Στη συγκεκριμένη μέτρηση, η αλλαγή της μάζας εκφράζεται με αλλαγή στο ηλεκτρικό φορτίο.

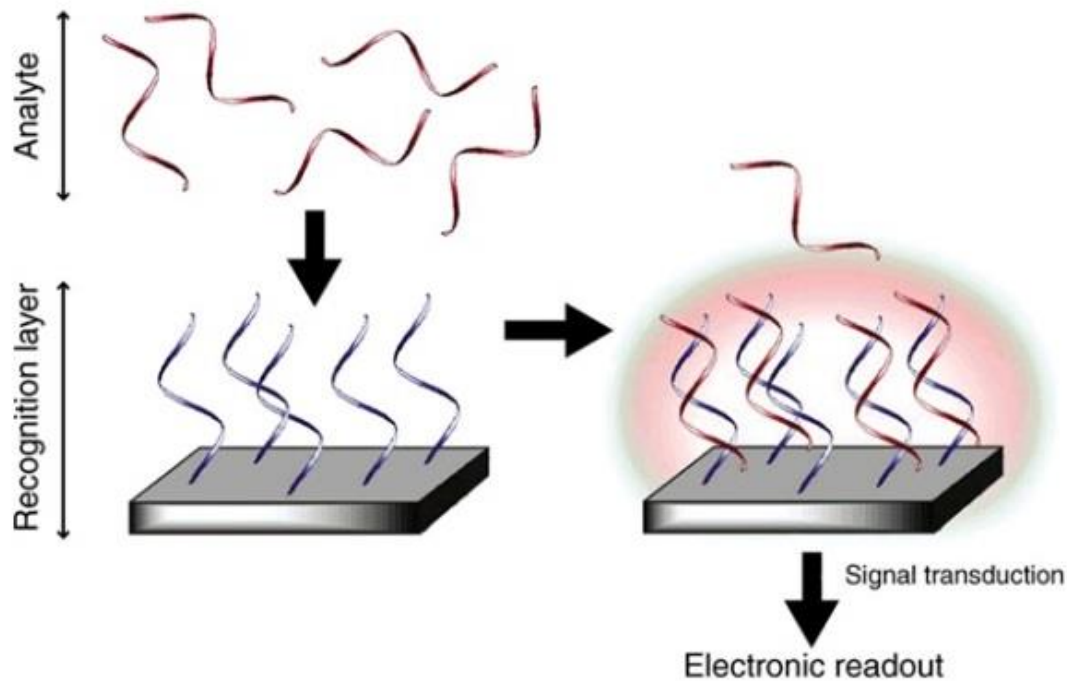
- **Θερμοκρασιακοί:** Όλες οι χημικές αντιδράσεις συνοδεύονται από απορρόφηση (ενδοθερμικές αντιδράσεις) ή έκλυση θερμότητας (εξωθερμικές αντιδράσεις). Επομένως είναι δυνατό να μετρηθούν μεταβολές στη θερμοκρασία και να συσχετιστούν με την βιολογική αντίδραση αναγνώρισης μεταξύ του βιοϋποδοχέα και του αναλύτη.

1.3 Ηλεκτροχημικοί Αισθητήρες

Οι ηλεκτροχημικοί αισθητήρες (και κατ' επέκταση, ηλεκτροχημικοί τύποι μορφομετατροπέων) χρησιμοποιούνται συχνά στην πράξη, καθώς μπορούν να ανιχνεύουν ανοσοβιολογικές δοκιμασίες (immunoassays) με πιο ασφαλή και γρήγορο τρόπο σε σχέση με άλλες μεθόδους ανίχνευσης βιολογικού υλικού. Σε αυτό συνίσταται το γεγονός ότι η ανίχνευση δεν λαμβάνει χώρα σε ολόκληρο τον όγκο του διαλύματος, παρά μόνο στην διεπαφή μεταξύ διαλύματος και ηλεκτροδίου. Επιπλέον, η αρχή λειτουργίας ενός ηλεκτροχημικού μορφομετατροπέα επιτρέπει την μετάβαση σε πολύ μικρότερο όγκο δείγματος.

Για την κατασκευή ηλεκτροχημικού αισθητήρα μίας ανοσοβιολογικής δοκιμασίας, είναι απαραίτητη η προετοιμασία της διάταξης με τρόπο ώστε θα ανιχνεύει αποκλειστικά και μόνο την ουσία/στόχο, η οποία καλείται προσδιοριζόμενη ουσία. Αρχικά, το ηλεκτρόδιο καλύπτεται σε πρώτη φάση με ένα λεπτό στρώμα ευγενούς μετάλλου (συχνά χρησιμοποιείται χρυσός) όπου προσδένεται το σύμπλεγμα αντιγόνου – αντισώματος, και ακριβώς σε αυτή την πρόσδεση στηρίζεται η μέθοδος ανίχνευσης του ηλεκτροχημικού αισθητήρα.

Καθώς οι περισσότερες αντιδράσεις πρόσδεσης αντιγόνου – αντισώματος δεν είναι αντιδράσεις οξειδοαναγωγής, εισάγεται μία ακόμα ουσία που ως στόχο έχει να προκαλέσει αντιδράσεις οξειδοαναγωγής, δρώντας ως στοιχείο επισήμανσης (label). Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, η ουσία αυτή προσδένεται στο σύμπλεγμα αντισώματος – αντιγόνου προκαλώντας μία αντίδραση οξειδοαναγωγής. Το ηλεκτροχημικό σήμα που προκύπτει από αυτή την αντίδραση χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της ποσότητας της προσδιοριζόμενης ουσίας που βρίσκεται στο δείγμα. Επιπλέον, εάν υπάρχει πρόσδεση της προσδιοριζόμενης ουσίας, θα δημιουργηθεί στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου ένα στρώμα αυτής της ουσίας, πέραν του στρώματος των ακινητοποιημένων αντιγόνων.



Εικόνα 1.3: Σχηματική αναπαράσταση της αρχής λειτουργίας ενός ηλεκτροχημικού αισθητήρα.

Όπως θα εξεταστεί στην συνέχεια, έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι ανίχνευσης των αλλαγών που προέρχονται από τον σχηματισμό αυτού του στρώματος ουσίας στο ηλεκτρόδιο. Αισθητήρες όπως οι ποτενσιομετρικοί, οι αμπερομετρικοί και οι αγωγιμομετρικοί είναι παραδείγματα των μεθόδων που χρησιμοποιούνται σε ηλεκτροχημικές ανοσοβιολογικές δοκιμασίες. Οι βασικές αρχές των αισθητήρων αυτών αναλύονται παρακάτω.

1.3.1 Ποτενσιομετρικοί αισθητήρες

Οι ποτενσιομετρικοί αισθητήρες βασίζονται στη διαφορά δυναμικού μεταξύ του ηλεκτροδίου εργασίας (working electrode) και του ηλεκτροδίου αναφοράς (reference electrode) ως αποτέλεσμα της αντίδρασης μεταξύ ενός αντισώματος και του αντιγόνου του. Το δυναμικού του ηλεκτροδίου εργασίας πρέπει να είναι ανάλογο της συγκέντρωσης της προσδιοριζόμενης ουσίας. Το βασικό μειονέκτημα αυτού του τύπου είναι ότι η μεταβολή της τάσης που συμβαίνει ως αποτέλεσμα της παραπάνω αντίδρασης είναι σχετικά μικρή. Επιπλέον, στην ανίχνευση αυτής της αντίδρασης εμφανίζονται παρεμβολές από άλλες αντιδράσεις που πιθανώς συμβαίνουν ταυτόχρονα στο δείγμα. Έτσι, αυτού του είδους οι ανιχνευτές εμφανίζουν ταυτόχρονα μειωμένη ευαισθησία αλλά και μειωμένη αξιοπιστία.

Άλλα μειονεκτήματα είναι ότι το δυναμικού του ηλεκτροδίου εργασίας δε συσχετίζεται τελικά με τη συγκέντρωση της προσδιοριζόμενης ουσίας, ο αισθητήρας γίνεται λιγότερο επιλεκτικός λόγω παρεμποδίσεων από άλλα ιόντα, ο λόγος

σήματος προς θόρυβο είναι χαμηλός και τέλος το σήμα εξαρτάται τόσο από την ιονική ισχύ όσο και από το pH του διαλύματος.

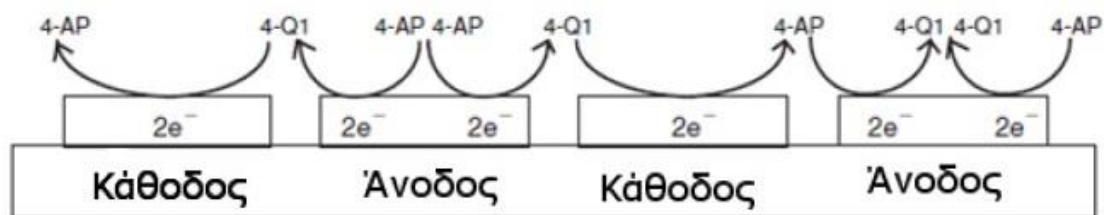
Μία πρόσφατη εφαρμογή ποτενσιομετρικού αισθητήρα στοχεύει την ανίχνευση συμπλεγμάτων αντιγόνου – αντισώματος τα οποία έχουν επισημανθεί από ένα ένζυμο [24]. Το σύμπλεγμα αυτό σχηματίζεται στην επιφάνεια ενός ηλεκτροδίου το οποίο έχει καλυφθεί από πολυπυρρόλη (polypyrrole). Στη μελέτη τους, οι Purvis et al. [24] παρατηρούν ότι η αλλαγή στην τάση είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της προσδιοριζόμενης ουσίας.

1.3.2 Αμπερομετρικοί αισθητήρες

Στους κλάδους της Χημείας και της Βιοχημείας, η αμπερομετρία αφορά στην ανίχνευση ιόντων σε ένα διάλυμα μέσω ηλεκτρικού σήματος ή αλλαγών αυτού. Οι αμπερομετρικοί αισθητήρες περιλαμβάνουν ένα ηλεκτροχημικό σύστημα τριών ηλεκτροδίων, αποτελούμενο από ένα ηλεκτρόδιο αναφοράς, ένα ηλεκτρόδιο εργασίας και ένα βοηθητικό ηλεκτρόδιο (counter electrode). Η εφαρμογή ορισμένου δυναμικού μεταξύ του ηλεκτροδίου εργασίας και του ηλεκτροδίου αναφοράς προκαλεί την οξείδωση ή την αναγωγή ηλεκτρικά ενεργών ουσιών του διαλύματος στο ηλεκτρόδιο εργασίας. Αποτέλεσμα είναι η διέλευση του ρεύματος, η ένταση του οποίου μπορεί να συσχετιστεί με τη συγκέντρωση της ηλεκτρικά ενεργού προσδιοριζόμενης ουσίας στο διάλυμα.

Το ηλεκτρόδιο εργασίας είναι συνήθως από χρυσό ή λευκόχρυσο με μια επίστρωση με πόρους στην πλευρά ανίχνευσης επιτρέποντας στην προσδιορισμένη ουσία που βρίσκεται στο διάλυμα να διαχυθεί μέσω της επιφάνειας του ηλεκτροδίου, η οποία δρα ως ένας καταλύτης για ηλεκτροχημικές αντιδράσεις οξειδοαναγωγής. Η λειτουργία τους βασίζεται στην ηλεκτρική σύνδεση του στοιχείου βιοαναγνώρισης με τον αμπερομετρικό αισθητήρα.

Στην περίπτωση όμως που τόσο η προσδιοριζόμενη ουσία όσο και η ουσία φερόμενη ως αντιγόνο δεν είναι ηλεκτρικά ενεργές, απαραίτητη είναι η προ – επεξεργασία είτε του αντιγόνου είτε του αντισώματος έτσι ώστε να έχουμε αντίδραση οξειδοαναγωγής που μπορεί να ανιχνευθεί από τους αισθητήρες. Γι' αυτό το σκοπό χρησιμοποιούνται συχνά τα ένζυμα οξειδοοδουκτάση (oxidoreductase – HRP) και το υδρολυτικό ένζυμο όξινος φωσφατάση (acid phosphatase – AP). Αυτά τα αντιδρώντα δίνουν ένα ηλεκτρικά ενεργό προϊόν με την μεσολάβηση ενός καταλύτη, ο οποίος μπορεί να τοποθετηθεί στο ηλεκτρόδιο εργασίας. Στην συνέχεια, το μέγεθος του μετρούμενου ρεύματος μπορεί να συσχετιστεί με την ποσότητα της μετρούμενης ουσίας που είναι παρούσα στο δείγμα, καθώς το ένζυμο όξινος φωσφατάση οξειδώνεται στην ουσία quinone imine (Q1, Εικόνα 1.4).



Εικόνα 1.4: Τα ηλεκτρόδια οδοντωτής δομής (Interdigitated Array microelectrodes – IDA) ως αμπερομετρικοί αισθητήρες για ανίχνευση αντιδράσεων οξειδοαναγωγής [12].

Πρόσφατα, η εξέλιξη στα ένζυμα επισήμανσης οδήγησε στην ενίσχυση του σήματος από την αντίδραση οξειδοαναγωγής, ακόμα και αν χρησιμοποιείται μικρή ποσότητα ενζύμων. Τα μειονεκτήματα αυτής της τεχνικής αφορούν την μεταφορά του ηλεκτρονίου από την αντίδραση οξειδοαναγωγής στο ηλεκτρόδιο εργασίας. Σε κάποιες περιπτώσεις, η σχεδίαση ενός ηλεκτροχημικού βιοαισθητήρα μέτρησης ρεύματος μπορεί να είναι τέτοια ώστε το ένζυμο που συμμετέχει στην αντίδραση οξειδοαναγωγής να βρίσκεται σε κάποια απόσταση από την επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Ακόμα, η πιθανή παρουσία ουσιών στο δείγμα που παρεμβάλλονται στην μεταφορά των ηλεκτρονίων καθιστά αδύνατη την εφαρμογή της τεχνικής μέτρησης ρεύματος.

1.3.3 Αγωγιμομετρικοί Αισθητήρες

Οι αγωγιμομετρικοί αισθητήρες μετρούν την ικανότητα μίας ουσίας (π.χ. διαλύματα ηλεκτρολυτών) να επιτρέπει τη διέλευση ηλεκτρικού ρεύματος μεταξύ των ηλεκτροδίων. Οι αλλαγές στην αγωγιμότητα οφείλονται στην πρόσδεση του συμπλέγματος αντιγόνου – αντισώματος στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Καθώς η συμπεριφορά του ηλεκτροδίου με επικάλυψη της επιφάνειάς του μόνο από τα ακινητοποιημένα αντισώματα είναι γνωστή, εάν παρατηρηθεί αλλαγή στην μορφή του ανιχνευόμενου ρεύματος, τότε αυτό θα οφείλεται στο συσσωμάτωμα αντιγόνου και ακινητοποιημένου αντισώματος στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου.

Επιπλέον, καθώς το σύμπλεγμα αντιγόνου – αντισώματος είναι ηλεκτρικά μη ενεργό, η κάλυψη της επιφάνειας του ηλεκτροδίου από αυτό θα εμποδίζει την απορρόφηση ηλεκτρονίων από την επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Εάν στο διάλυμα βρίσκονται ουσίες που αντιδρούν με αντιδράσεις οξειδοαναγωγής, τότε στην περίπτωση που υπάρχει κάλυψη της επιφάνειας του ηλεκτροδίου, τότε το ρεύμα που θα παρατηρείται θα είναι πολύ λιγότερο για την ίδια αντίδραση.

1.4 Αναφορές Κεφαλαίου

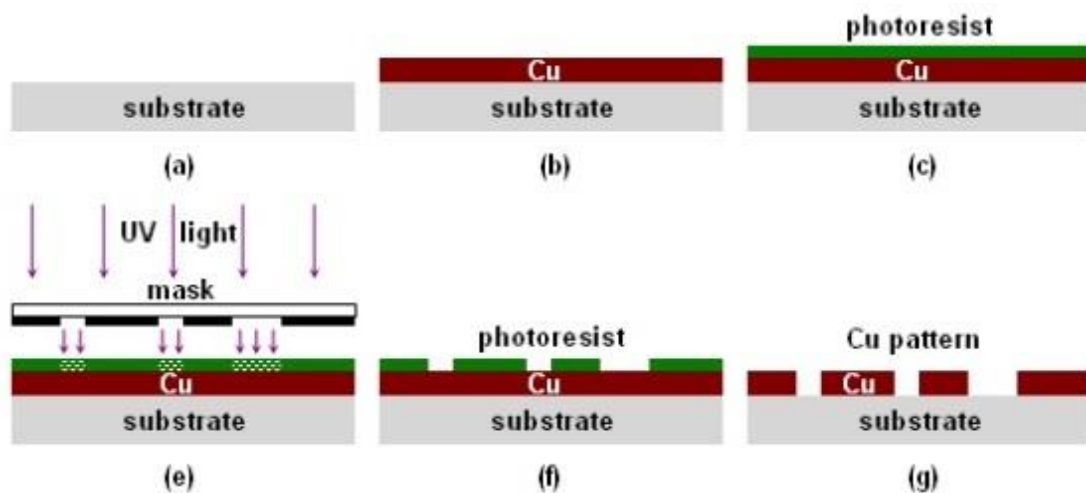
1. M. Chee, R. Yang, E. Hubbell, A. Berno, X. C. Huang, D. Stern, J. Winkler, D. J. Lockhart, M. S. Morris, S. P. Fodor, "Accessing genetic information with high-density DNA arrays", *Science*, **274**, 610–614 (1996).
2. D. J. Lockhart, H. Dong, M. C. Byrne, M. T. Follettie, M. V. Gallo, M. S. Chee, M. Mittmann, C. Wang, M. Kobayashi, H. Horton, E. L. Brown, "Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays", *Nature Biotechnology*, **14**, 1675–1680 (1996).
3. J. L. DeRisi, V. R. Iyer, P. O. Brown, "Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale", *Science*, **278**, 680–686 (1997).
4. J. L. DeRisi, L. Penland, P. O. Brown, M. L. Bittner, P. S. Meltzer, M. Ray, Y. Chen, Y. A. Su, J. M. Trent, "Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer", *Nature Genetics*, **14**, 457–460 (1996).
5. S. Cagnin, M. Biscuola, C. Patuzzo, E. Trabetti, A. Pasquali, P. Laveder, G. Faggian, M. Iafrancesco, A. Mazzucco, P. F. Pignatti, G. Lanfranchi, "Reconstruction and functional analysis of altered molecular pathways in human atherosclerotic arteries", *BioMed Central Genomics*, **10**, 1–15 (2009).
6. A. Dötsch, C. Pommerenke, F. Bredenbruch, R. Geffers, S. Haussler, "Evaluation of a microarray-hybridization based method applicable for discovery of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *Pseudomonas aeruginosa* genome", *BioMed Central Genomics*, **10**, 1–13 (2009).
7. J. Trolet, P. Hupe, I. Huon, I. Lebigot, C. Decraene, O. Delattre, X. Sastre-Garau, S. Saule, J. P. Thiery, C. Plancher, B. Asselain, L. Desjardins, P. Mariani, S. Piperno-Neumann, E. Barillot, J. Couturier, "Genomic profiling and identification of high-risk uveal melanoma by array CGH analysis of primary tumors and liver metastases", *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, **50**, 2572–2580 (2009).
8. R. B. Stoughton, "Applications of DNA microarrays in biology", *Annual Review of Biochemistry*, **74**, 53–82 (2005).
9. S. Hahn, S. Mergenthaler, B. Zimmermann, W. Holzgreve, "Nucleic acid based biosensors: the desires of the user", *Bioelectrochemistry*, **67**, 151–154 (2005).
10. S. D. Senturia, "Microsystems Design", Kluwer Academic Publishers, 2nd Printing (2001).
11. J. Bryzek, S. Roundy, B. Bircumshaw, C. Chung, K. Castellino, J.R. Stetter, M. Vestel, "MARVELOUS MEMS: Advanced IC Sensors and Microstructures for High Volume. Applications", *IEEE Circuits and Devices Magazine*, March/April, 8–28 (2006).
12. NCSR-IMEL / LoC, "Τεχνικές Προδιαγραφές Βιοαισθητήρων", 1–149 (2010).
13. A. Tiwari, S. Gong, "Electrochemical detection of a breast cancer susceptible gene using cDNA immobilized chitosan-co-polyaniline electrode", *Talanta*, **77**, 1217–1222 (2009).

14. X. Mao, Y. Ma, A. Zhang, L. Zhang, L. Zeng, G. Liu, "Disposable Nucleic Acid Biosensors Based on Gold Nanoparticle Probes and Lateral Flow Strip", *Analytical Chemistry*, **81**, 1660–1668 (2009).
15. S. E. Tolley, H. K. Wang, R. S. Smith, D. A. Christensen, J. N. Herron, "Single-chain polymorphism analysis in long QT syndrome using planar waveguide fluorescent biosensors", *Analytical Biochemistry*, **315**, 223–237 (2003).
16. M. Minunni, S. Tombelli, M. Mascini, A. Bilia, M. C. Bergonzi, F. F. Vincieri, "An optical DNA-based biosensor for the analysis of bioactive constituents with application in drug and herbal drug screening", *Talanta*, **65**, 578–585 (2005).
17. P. Vattanaviboon, K. Sangseekhiow, P. Winichagoon, C. Promptmas, "Detection and haplotype differentiation of Southeast Asian alphathalassemia using polymerase chain reaction and a piezoelectric biosensor immobilized with a single oligonucleotide probe", *Translational Research*, **151**, 246–254 (2008).
18. E. R. Richter, "Biosensors: applications for dairy food industry", *Journal of Dairy Science*, **76**, 3114–3117 (1993).
19. M. J. LaGier, J. W. Fell, K. D. Goodwin, "Electrochemical detection of harmful algae and other microbial contaminants in coastal waters using hand-held biosensors", *Marine Pollution Bulletin*, **54**, 757–770 (2007).
20. P. S. Waggoner, H. G. Craighead, "Micro- and nanomechanical sensors for environmental, chemical, and biological detection", *Lab on a Chip*, **7**, 1238–1255 (2007).
21. J. S. Daniels, N. Pourmand, "Label-Free Impedance Biosensors: Opportunities and Challenges", *Electroanalysis*, **19**, 1239–1257 (2007).
22. G. C. Kennedy, H. Matsuzaki, S. Dong, W. M. Liu, J. Huang, G. Liu, S. Su, M. Cao, W. Chen, J. Zhang, W. Liu, G. Yang, X. Di, T. Ryder, Z. He, U. Surti, M. S. Phillips, M. T. Boyce–Jacino, S. P. A. Fodor, K. W. Jones, "Large-scale genotyping of complex DNA", *Nature Biotechnology*, **21**, 1233–1237 (2003).
23. P. M. Levine, P. Gong, R. Levicky, K. L. Shepard, "Real-time, multiplexed electrochemical DNA detection using an active complementary metal-oxide semiconductor biosensor array with integrated sensor electronics", *Biosensors and Bioelectronics*, **24**, 1995–2001 (2009).
24. D. Purvis, O. Leonardova, D. Farmakovskiy, V. Cherkasov, "An ultrasensitive and stable potentiometric immunosensor", *Biosensors and Bioelectronics*, **18**, 1385–1390 (2003).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΜΕΣΗΣ ΕΚΤΥΠΩΣΗΣ

2.1 Εισαγωγή

Η τεχνολογία άμεσης εκτύπωσης (direct – write) διαθέτει πολλά πλεονεκτήματα έναντι των συμβατικών μεθόδων όπου, για παράδειγμα, η διαδικασία εναπόθεσης υμενίου συνοδεύεται από την επακόλουθη απομάκρυνση αρκετού από αυτού του στρώματος [1].



Εικόνα 2.1: Η συμβατική μέθοδος της λιθογραφίας [1].

Η Εικόνα 2.1 παρουσιάζει μία τέτοια διαδικασία βασισμένη στη μέθοδο της λιθογραφίας. Σε αυτή την περίπτωση, ένα αγώγιμο στρώμα εναποτίθεται αρχικά πάνω σε ένα υπόστρωμα και εν συνεχεία εναποτίθεται ένα φωτοπολυμερές (photoresist). Έπειτα, με τη χρήση ειδικών μασκών, μεταφέρεται το επιθυμητό μοτίβο (pattern) στο στρώμα του φωτοπολυμερούς και ακολουθεί η διαδικασία της εγχάραξης ώστε να απομακρυνθούν οι μη επιθυμητές περιοχές του αγώγιμου υλικού και να διατηρηθεί το απαιτούμενο αγώγιμο μοτίβο. Αυτή η διαδικασία απαιτεί πολλά στάδια κατασκευής, καθώς και τη προσωρινή χρήση και τη μερική ή ολική απομάκρυνση διαφόρων στρωμάτων από υλικά. Ως εκ τούτου, προκαλείται σπατάλη μεγάλων ποσοτήτων υλικών και υψηλή κατανάλωση ενέργειας [2].

Έτσι, η άμεση εκτύπωση αποτελεί την αναδυόμενη εναλλακτική τεχνική για την κατασκευή μικροηλεκτρονικών διατάξεων, συγκεκριμένα και βιοαισθητήρων. Ένα ακόμα πλεονέκτημά της είναι ότι μπορεί να ενσωματωθεί απ' ευθείας στην έξοδο ειδικού λογισμικού για τη δημιουργία μοτίβων σε κυκλώματα, τα οποία μπορούν στη συνέχεια να προσαρμοστούν για ψηφιακή απεικόνιση. Αυτό έχει ως συνέπεια το ότι επιτρέπεται η ταχεία προτυποποίηση ενός νέου προϊόντος από τον αρχικό του κίβλας σχεδιασμό, εν αντιθέσει με τη δαπανηρή και χρονοβόρα διαδικασία της λιθογραφίας με μάσκες. Επιπλέον, οι τεχνικές άμεσης εκτύπωσης

ελαχιστοποιούν την ποσότητα χρήσης των υλικών και μειώνουν σημαντικά την κατανάλωση της ενέργειας [3], αποτρέποντας επιπλέον επιβάρυνση του περιβάλλοντος η οποία σχετίζεται με την κατασκευή μικροδιατάξεων. Τέλος, με τεχνικές άμεσης εκτύπωσης, τα υλικά μπορούν να εναποτεθούν μόνο όπου χρειάζονται χωρίς επιπλέον στάδια εγχάραξης και απομάκρυνσης. Αυτό απλοποιεί τη διαδικασία κατασκευής και μειώνει την ανάγκη για επεξεργασία και απόρριψη επικίνδυνων και τοξικών ουσιών.

2.2 Ορισμός και κατηγορίες της Άμεσης Εκτύπωσης

Έχουν υπάρξει πολλοί ορισμοί της άμεσης εκτύπωσης σε πολλές δημοσιεύσεις από διάφορους ερευνητές [4–6]. Σε αυτή την εργασία, η άμεση εκτύπωση μπορεί να οριστεί, συνδυάζοντας διάφορους από τους προηγούμενους ορισμούς, ως τεχνικές που επιτρέπουν την εναπόθεση σε ηλεκτρονικές διατάξεις και σε λειτουργικά ή δομικά μοτίβα διαφόρων ειδών υλικών από όπου προκύπτει άμεσα μία προκαθορισμένη διάταξη χωρίς τη χρήση μασκών ή επακόλουθων μεθόδων εγχάραξης. Μετά την εναπόθεση του υλικού πάνω στο υπόστρωμα, ακολουθεί μία διαδικασία θερμικής επεξεργασίας, όπως η πυροσυσσωμάτωση, η οποία είναι απαραίτητη ώστε το εναποτιθέμενο υλικό να επιτύχει την πλήρη απόδοσή του.

Τα τελευταία χρόνια έχουν δημιουργηθεί και αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι άμεσης εκτύπωσης. Ωστόσο, όποιες διατάξεις και αν εμπλέκονται στην υλοποίηση, ή όποιες και αν είναι οι βασικές αρχές λειτουργίας πίσω από κάθε τεχνική, οι περισσότερες από τις υπάρχουσες τεχνικές άμεσης εκτύπωσης μπορούν να ταξινομηθούν σε τέσσερις κατηγορίες: (1) άμεση εκτύπωση με τεχνολογία σταγονιδίων, (2) με τεχνολογία αντλίας, (3) με τεχνολογία ακίδας, και (4) με τεχνολογία λέιζερ.

2.3 Άμεση εκτύπωση με τεχνολογία σταγονιδίων

Οι μέθοδοι άμεσης εκτύπωσης με τεχνολογία σταγονιδίων βασίζονται στην εκτίναξη σταγονιδίων ενός υγρού υλικού από ένα ή περισσότερα ακροφύσια. Η κύριες υποκατηγορίες των μεθόδων με τεχνολογία σταγονιδίων είναι η τεχνική εκτύπωσης ψεκασμού μελάνης (ink jet printing) και η τεχνική ψεκασμού αεροζόλ (Aerosol Jet). Σε αυτές τις διαδικασίες το προς εκτίναξη υλικό πρέπει να είναι σε υγρή φάση και σε θερμοκρασίες συμβατές με το διαθέσιμο εξοπλισμό.

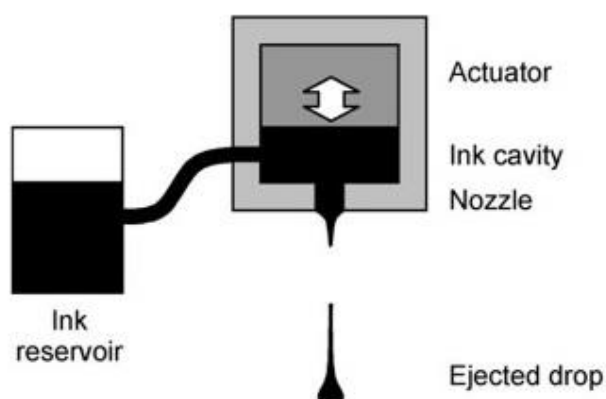
2.3.1 Μέθοδος εκτύπωσης ψεκασμού μελάνης

Η τεχνική αυτή έχει δείξει την αξιοσημείωτη ισχύ του σε εκτυπώσεις τόσο οικιακές όσο και προσωπικών υπολογιστών γραφείου, και έχει αξιοποιηθεί εκτενώς

σε βιομηχανικές και εμπορικές εφαρμογές. Η ιδέα εφαρμογής της εκτύπωσης ψεκασμού μελάνης σε τομείς όπως η κατασκευή ηλεκτρονικών και η παραγωγή στερεών ελευθέρως μορφής (solid freeform – SFF) αναπτύχθηκε κατά τη διάρκεια του 1980 [4], αλλά μόλις τελευταία οι εφαρμογές σε εκτύπωση ηλεκτρονικών, MEMS, ασύρματες τηλεπικοινωνίες κ.ά. αποτέλεσαν την κινητήρια δύναμη πίσω από την προσαρμογή της εκτύπωσης ψεκασμού μελάνης [4].

Υπάρχουν δύο τύποι εκτύπωσης ψεκασμού μελάνης, ο συνεχής (continuous ink jet – CIJ) και ο βηματικός (drop on demand – DOD). Για τα συστήματα βηματικού τύπου, υπάρχουν δύο τρόποι μεθόδου ενεργοποίησης: για χρήση σε εμπορικούς εκτυπωτές ψεκασμού μελάνης, τα ακροφύσια πιεζοηλεκτρικού κρυστάλλου και τα ακροφύσια θερμικών θαλάμων.

Στα ακροφύσια θερμικών θαλάμων, όπου απαιτείται η εκτύπωση ενός σταγονιδίου, εφαρμόζεται ένας ηλεκτρικός παλμός σε ένα μικρό ωμικό θερμαντήρα του ακροφυσίου, και η παραγόμενη θερμότητα προκαλεί την εξάτμιση μίας μικρής ποσότητας του πτητικού μελανιού προς την δημιουργία μίας φυσαλίδας. Όταν αυτό επιτευχθεί, δημιουργείται διαφορά πιέσεων μεταξύ του εσωτερικού και του εξωτερικού του ακροφυσίου, η οποία προκαλεί την εκτίναξη του σταγονιδίου από το στόμιο και την προώθησή της προς το για εκτύπωση υπόστρωμα. Καθώς ο θερμαντήρας ψύχεται, η φυσαλίδα αποκόπτεται και λαμβάνει ξανά χώρα διαφορά πιέσεων μεταξύ του εσωτερικού και του εξωτερικού στην κοιλότητα της μελάνης, όμως τώρα η μελάνη απορροφάται μέσα στην κοιλότητα από το ρεζερβουάρ για να αντικαταστήσει το υλικό που έχει εκτοξευτεί και να επανέλθει η ισορροπία των πιέσεων (Εικόνα 2.2).

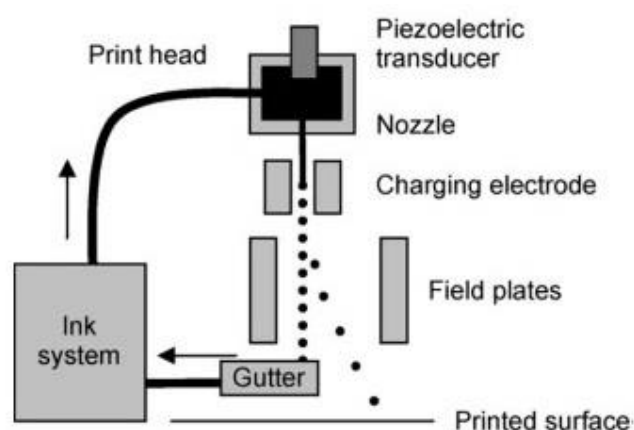


Εικόνα 2.2: Σχηματική αναπαράσταση της εκτύπωσης ψεκασμού μελάνης με ακροφύσια θερμικού θαλάμου [7].

Στις κεφαλές πιεζοηλεκτρικού τύπου εκτύπωσης μελάνης, ο μηχανισμός ενεργοποίησης βασίζεται στην παραμόρφωση ενός πιεζοηλεκτρικού υλικού η οποία προκαλεί την πίεση ώστε να εκτοξευτεί το σταγονίδιο από το ακροφύσιο. Τα πιεζοηλεκτρικά υλικά είναι ικανά να μετατρέψουν εξωτερικά μηχανικά ερεθίσματα σε ηλεκτρικά και τανάπαλιν. Έτσι, όταν εφαρμόζεται ένα μεταβαλλόμενο ηλεκτρικό

δυναμικό στο πιεζοηλεκτρικό υλικό, αυτό παραμορφώνεται ως απάντηση προς το ηλεκτρικό ερέθισμα. Αν η κυματομορφή δυναμικού που εφαρμόζεται στο πιεζοηλεκτρικό υλικό είναι παροδική, αναμένεται μία παραμόρφωση του παλμού που αντιστοιχεί στον παλμό δυναμικού. Η διαστολή των υλικών λόγω αυτού του δυναμικού ωθεί ένα σταγονίδιο μελάνης από το στόμιο και η μελάνη αποσύρεται από το ρεζερβουάρ για να ξαναγεμίσει την κοιλότητα για να αντισταθμίσει τη διαφορά πιέσεων όταν το δυναμικό του σταγονιδίου εξαλείφεται και το πιεζοηλεκτρικό υλικό επανέρχεται στις διαστάσεις της προηγούμενης σταθερής του κατάστασης.

Η μέγιστη θερμοκρασία κατά την οποία ένα υλικό μπορεί να εκτοξευτεί περιορίζεται από το πιεζοηλεκτρικό υλικό, το οποίο θα σταματήσει να λειτουργεί πάνω από μία ορισμένη θερμοκρασία κατωφλίου. Σε σύστημα συνεχούς τύπου εκτύπωσης μελάνης, ο μετατροπέας, ο οποίος τυπικά έχει κατασκευαστεί από πιεζοηλεκτρικό υλικό, χρησιμοποιείται για να παράγει κύματα πίεσης μέσα σε ένα υπό πίεση ρεζερβουάρ μελάνης ως απάντηση προς τη συνεχή εφαρμογή ενός μεταβαλλόμενου ρεύματος. Καθώς ο μετατροπέας ενδέχεται να είναι μακριά από το ρεζερβουάρ, ο συνεχής τύπος εκτίναξης δεν έχει τα ίδια όρια θερμοκρασίας όπως στο βηματικό. Η συμπίεση στο ρεζερβουάρ εξασφαλίζει τη συνεχή ροή του προς εκτίναξη υλικού το οποίο περνά μέσω του ακροφυσίου και απορρέει από το στόμιο, όπου και σπάει σε μεμονωμένα ομοιόμορφα σταγονίδια ως απάντηση προς την κυματομορφή. Η ροή των σταγονιδίων ακολούθως μεταφέρεται μέσω ενός πεδίου ηλεκτροστατικού φορτίου για να αποκτήσουν ηλεκτροστατικό φορτίο, ώστε η χρήση ενός πεδίου εκτροπής να επιτρέψει την κατεύθυνση της ροής αυτής πάνω στις επιθυμητές περιοχές του υποστρώματος. Όσα σταγονίδια δεν εκτραπούν από το πεδίο εκτροπής συλλέγονται και κατευθύνονται σε ένα διάκενο όπου ανακυκλώνονται για μετέπειτα επαναχρησιμοποίηση (Εικόνα 2.3).



Εικόνα 2.3: Σχηματική αναπαράσταση εκτύπωσης ψεκασμού μελάνης με ακροφύσια πιεζοηλεκτρικού κρυστάλλου [7].

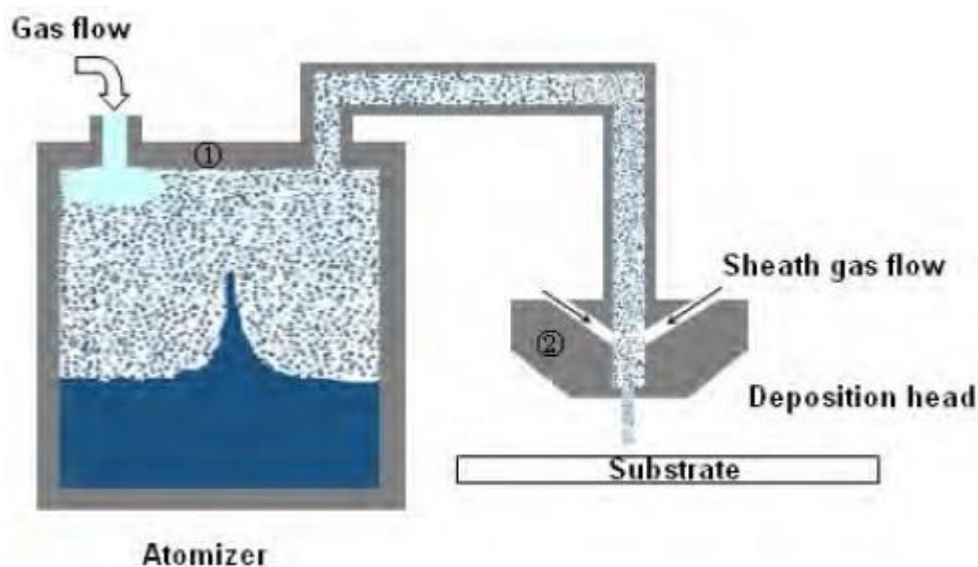
Και οι δύο τύποι συστήματος είναι διαθέσιμοι από μία ποικιλία προμηθευτών είτε ως κεφαλές εκτύπωσης είτε ως ένα εξ ολοκλήρου σύστημα εκτύπωσης. Υπάρχουν αρκετά σύνολα κεφαλών εκτύπωσης προς επιλογή, ανάλογα με τις ειδικές απαιτήσεις της εκάστοτε εφαρμογής. Η διάμετρος του στομίου του ακροφυσίου ελέγχει τον όγκο των σταγονιδίων και συνεπώς μπορεί να επιτευχθεί η βέλτιστη διακριτική ικανότητα της εκτύπωσης. Η διακριτική ικανότητα εξαρτάται επίσης από διάφορους άλλους παράγοντες, όπως η διαβρεξιμότητα της “μελάνης” πάνω στο υπόστρωμα, η ταχύτητα στεγνώματος της μελάνης, και ούτω καθεξής. Για συστήματα συνεχούς τύπου εκτύπωσης, το μέγεθος των σταγονιδίων ποικίλει από 20 σε 1 μm , με τα 150 μm να αποτελούν το πιο σύνηθες μέγεθος εκτύπωσης, ενώ για συστήματα βηματικού τύπου εκτύπωσης, η επιτεύξιμη διάμετρος των σταγονιδίων κυμαίνεται από 15 σε 100 μm [8].

2.3.2 Μέθοδος ψεκασμού αεροζόλ

Η τεχνική ψεκασμού αεροζόλ είναι κατοχυρωμένο προϊόν της Optomec®. Το σύστημα ψεκασμού αεροζόλ αποτελείται κυρίως από δύο βασικά στοιχεία, τον ψεκαστήρα και την κεφαλή εναπόθεσης, σημειωμένα ως ① και ② στην Εικόνα 2.4 αντίστοιχα. Το προς εναπόθεση ακατέργαστο υλικό πρέπει να είναι σε υγρή μορφή και τοποθετείται πρώτα μέσα σε ένα ψεκαστήρα, είτε υπερήχων είτε πεπιεσμένου αέρα, ο οποίος χρησιμοποιείται για να δημιουργήσει από το υλικό ένα πυκνό ατμό σταγονιδίων μεγέθους μεταξύ 1 με 5 μm – μια διαδικασία γνωστή ως “ομίχλη ενεργοποίησης”. Κατόπιν, η παραγόμενη ομίχλη, ή το αεροζόλ, μεταφέρεται σε έναν ερμητικά εγκλεισμένο πίδακα, μέσα σε κάτι που είναι γνωστό ως κεφαλή εναπόθεσης, μέσω μίας ροής αερίου η οποία διατρέχει το εσωτερικό του ψεκαστήρα και στη συνέχεια μεταβιβάζεται εντός της κεφαλής εναπόθεσης. Η ροή αεροζόλ που μεταφέρθηκε στην κεφαλή εστιάζεται με τη σειρά της από μία δεύτερη ροή αερίου που εισάγεται εντός του πίδακα. Αυτές οι δύο ροές αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και δημιουργούν μία ομοαξονική δακτυλιοειδή ροή η οποία διαφεύγει από την κεφαλή εναπόθεσης μέσω ενός ακροφυσίου που διαθέτει και καταλήγει στο υπόστρωμα.

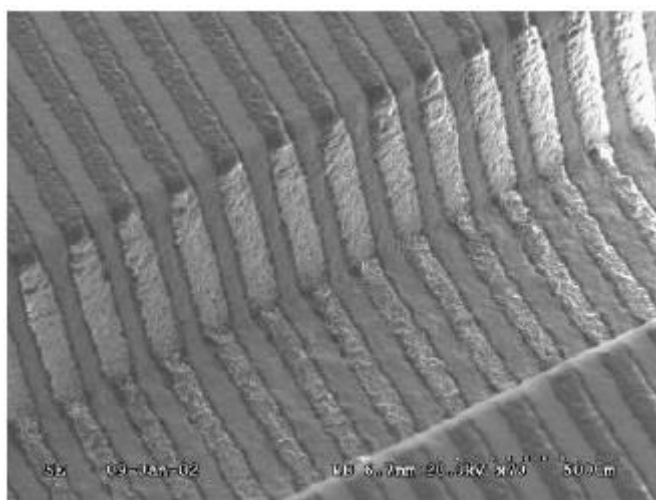
Η Optomec® διαθέτει μία λειτουργική μονάδα λέιζερ η οποία μπορεί να ενταχθεί στο σύστημα για να ολοκληρωθεί μία τοπικά επακόλουθη θερμική επεξεργασία του εναποτιθέμενου υλικού, όπως η πυροσυσσωμάτωση νανο ή μικροσωματιδίων, και συγκεκριμένα για ορισμένα υλικά, όπως ο χρυσός και ο άργυρος, έχειδειχθεί ότι είναι ικανά να επιτύχουν ιδιότητες τόσο καλές όσο τα ογκώδη (bulk) υλικά, και χωρίς να καταστρέφει υποστρώματα τα οποία χαρακτηρίζονται από χαμηλή ικανότητα αντοχής θερμοκρασίας. Η διαδικασία εκτύπωσης της τεχνικής του συστήματος ψεκασμού αεροζόλ παρέχει ένα μέσο εκτύπωσης μη επαφής, όπως η εκτύπωση ψεκασμού μελάνης, το οποίο την καθιστά

συμβατική με μεθόδους όπου πρέπει να αποφεύγεται η μόλυνση του υποστρώματος.



Εικόνα 2.4: Σχηματική αναπαράσταση της αρχής λειτουργίας του συστήματος ψεκασμού αεροζόλ της Optomec® [9].

Το σύστημα ψεκασμού αεροζόλ μπορεί να εκτυπώσει πολύ λεπτές γραμμές των 10 μm , με ελάχιστο βήμα εκτύπωσης τα 20 μm , αλλά και πολύ πλατιές των 150 μm . Η ικανότητα χειρισμού των υλικών όσον αφορά το ιξώδες κυμαίνεται μέσα σε ένα ευρύ φάσμα τιμών, μεταξύ 0.001 και 2.5 Pascal \cdot sec, και έτσι επιτρέπεται η εναπόθεση ευρείας ποικιλίας υλικών [9].



Εικόνα 2.5: Γραμμές αργύρου πάχους 60 μm εκτυπωμένες πάνω σε ένα χαρακώμα βάθους 500 μm με το σύστημα ψεκασμού αεροζόλ [9].

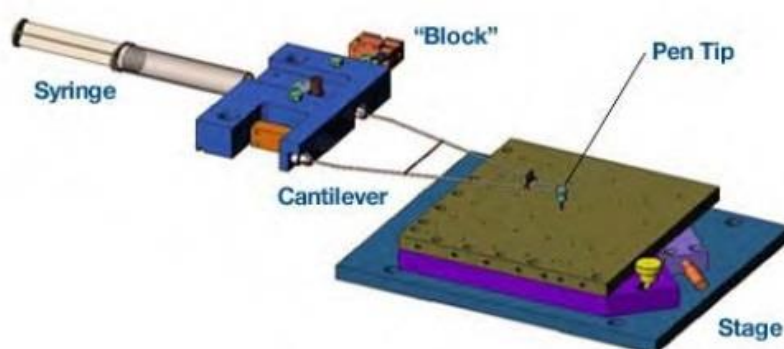
Η Εικόνα 2.5 είναι ένα παράδειγμα γραμμών αργύρου που έχουν εκτυπωθεί πάνω σε ένα χαρακώμα χρησιμοποιώντας την εκτύπωση ψεκασμού αεροζόλ, όπου

το πάχος γραμμής είναι 60 μm και το βάθος του χαρακώματος είναι 500 μm . Η εκτύπωση ψεκασμού αεροζόλ είναι ιδιαίτερα κατάλληλη για τέτοιες τρισδιάστατες εφαρμογές, καθώς η κεφαλή εναπόθεσης μπορεί να κλίνει υπό μία γωνία για να εφάπτεται του περιγράμματος του υποστρώματος χωρίς να το ακουμπά. Σε σύγκριση με τη συμβατική εκτύπωση ψεκασμού μελάνης, η τεχνική ψεκασμού αεροζόλ παρουσιάζει τα ακόλουθα πλεονεκτήματα: η απόσταση στασιμότητάς της μπορεί να προσαρμοστεί μεταξύ 1 και 5 mm αντί να ρυθμιστεί όπως σε ένα σύστημα ψεκασμού μελάνης, το αεροζόλ είναι μία συνεχής ροή που αποτελείται από καλά εστιασμένα μικροσταγονίδια υψηλής πυκνότητας, με αποτέλεσμα την ικανότητα καλής ανάλυσης της εκτύπωσης, και τέλος, το ακροφύσιο είναι πιο ανθεκτικό και είναι σχεδόν απίθανο να φράξει [10].

2.4 Άμεση εκτύπωση με τεχνολογία αντλίας

Η τεχνική άμεσης εκτύπωσης με τεχνολογία αντλίας (filament based direct write – FBDW) επίσης απαιτεί ένα προς εναπόθεση υγρό υλικό, ωστόσο διαφέρει από τις μεθόδους άμεσης εκτύπωσης ψεκασμού μελάνης στο ότι το υλικό ρέει συνεχόμενα αντί να εκτινάσσεται ως σταγονίδια και επιπλέον το ιξώδες ενδέχεται να διαφέρει κατά ένα πολύ μεγαλύτερο εύρος. Εδώ παρουσιάζονται δύο παραδείγματα αυτής της τεχνικής, διαθέσιμα στο εμπόριο: το MicroPen και το nScrypt.

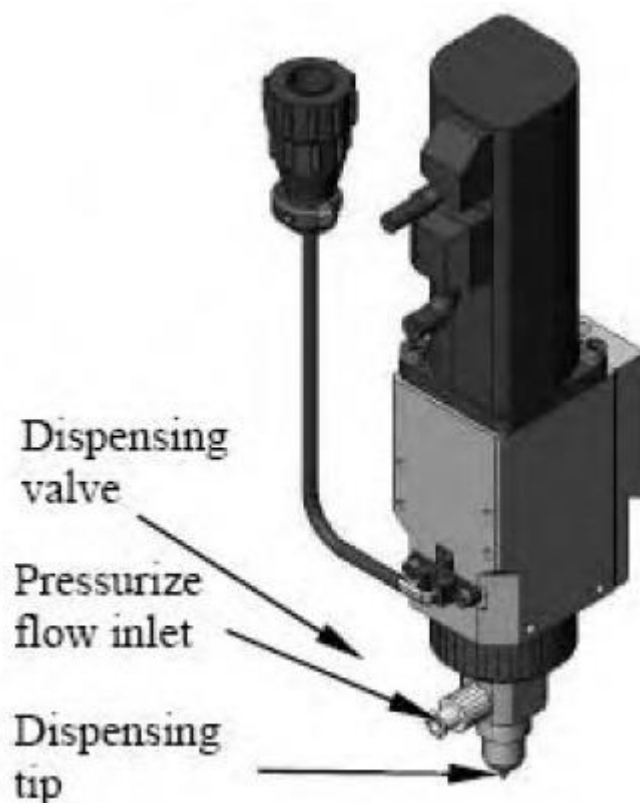
Η αρχή λειτουργίας του MicroPen μπορεί να περιγραφθεί ως ακολούθως: το προς εναπόθεση υλικό τοποθετείται αρχικά μέσα σε μία σύριγγα, η οποία είναι συνδεδεμένη με την κεφαλή γραφής, αποκαλούμενη ως “μπλοκ” από τον προμηθευτή του συστήματος. Το υλικό πιέζεται έξω από τη σύριγγα μέσα στην κεφαλή γραφής συμπιέζοντας το έμβολο της σύριγγας μέσω ενός ωθητήρα πεπιεσμένου αέρα. Το υλικό, αφού μεταφέρθηκε στο “μπλοκ”, εν συνεχεία συμπιέζεται σχεδόν μέχρι τα 14 MPa (2000 psi), και ύστερα ρέει μέσα σε μία μικροτριχοειδής ακίδα γραφής, η οποία εναποθέτει το υλικό πάνω στο υπόστρωμα. Μία σχηματική αναπαράσταση του συστήματος γραφής MicroPen παρουσιάζεται στην Εικόνα 2.6.



Εικόνα 2.6: Αναπαράσταση του συστήματος MicroPen [11].

Η άμεση εκτύπωση με το MicroPen μπορεί να εναποθέσει ενδεχομένως οποιοδήποτε υγρό υλικό με τιμές του ιξώδους να κυμαίνονται από 0.005 σε 500 Pascal • sec, και πρόκειται για αρκετά ευρύ φάσμα. Το MicroPen επιπλέον διαθέτει τη δυνατότητα να πραγματοποιήσει την εναπόθεση των υλικών πάνω σε μία ποικιλία υποστρωμάτων, συμπεριλαμβανομένων εύκαμπτων και μη επίπεδων υποστρωμάτων. Τέλος, το MicroPen είναι και αυτό με τη σειρά του μία τεχνική τεχνολογίας μη επαφής, με την μικροτριχοειδή ακίδα γραφής να μην ακουμπά την επιφάνεια.

Άλλη μία τεχνική άμεσης εκτύπωσης με τεχνολογία αντλίας είναι το nScrypt, όπου ένα εργαλείο εναπόθεσης για άμεση εκτύπωση είναι ενσωματωμένο με την καινοτόμα αντλία του nScrypt, τη λεγόμενη Smart Pump™, η οποία παρουσιάζεται στην Εικόνα 2.7.



Εικόνα 2.7: Η Smart Pump™ του nScrypt [12].

Η ενσωματωμένη αυτή “έξυπνη αντλία” είναι σε θέση να εναποθέσει υλικά με ιξώδες έως 1000 Pascal • sec με ακρίβεια στον έλεγχο της πίεσης του αέρα, του ανοίγματος της βαλβίδας και του ύψους της εναπόθεσης [12]. Με την έναρξη της εναπόθεσης, μία βαλβίδα ανοίγει έτσι ώστε να επιτρέψει στο προς εναπόθεση υλικό να ρεύσει μέσω της ακίδας εναπόθεσης πάνω στο υπόστρωμα. Μόλις σταματήσει η εναπόθεση, η βαλβίδα κλείνει για να εμποδίσει τη διαρροή του υλικού. Ένα πλεονέκτημα της “έξυπνης αντλίας” είναι ότι διαθέτει ένα μηχανισμό κίνησης με αναρρόφηση προς τα πίσω των υλικών μέσα στο ακροφύσιο

εναπόθεσης μόλις αυτή διακοπεί. Μέσα στο θάλαμο της ακίδας εναπόθεσης διατηρείται αρνητική πίεση ώστε, όταν σταματήσει η εναπόθεση, να επάγει την αναρρόφηση προς τα πίσω του υλικού. Αυτό το χαρακτηριστικό επιτρέπει στο στόμιο να μείνει καθαρό και απαλλαγμένο από συσσωματώματα του υλικού, μειώνοντας την πιθανότητα να φραχτεί το ακροφύσιο, και παρέχει στο σύστημα μία συνεπή λειτουργία κάθε φορά που ξεκινάει η εναπόθεση. Συνεπώς, η εκτύπωση γραμμών μπορεί να ελέγχεται με ακρίβεια και επιπλέον το πλάτος αυτών των γραμμών του υλικού μπορεί να διατηρηθεί με συνέπεια χωρίς διογκώσεις στα άκρα.

2.5 Άμεση εκτύπωση με τεχνολογία ακίδας

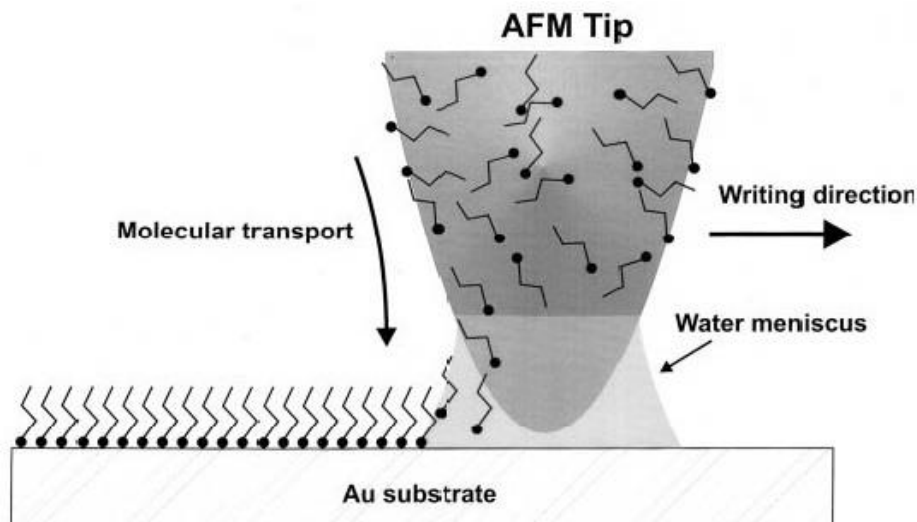
Η τεχνική νανολιθογραφίας με πένα εμβάπτισματος (dip-pen nanolithography – DPN) χρησιμοποιεί μία ακίδα μικροσκοπίου ατομικής δύναμης (atomic force microscope – AFM) για μεταφέρει μόρια από την ακίδα εναπόθεσης AFM πάνω σε υποστρώματα, κάτι το οποίο είναι ιδιαίτερα χρήσιμο σε εφαρμογές της νανοκλίμακας.

Οι Piner et al. ανακάλυψαν αυτή την τεχνική ενώ ερευνούσαν ένα πρόβλημα που προκαλούσε σύγχυση στους ερευνητές για μεγάλο χρονικό διάστημα όσον αφορούσε τη μικροσκοπία ατομικής δύναμης, το ότι το συμπυκνωμένο νερό μπορούσε είτε να μεταφερθεί από το υπόστρωμα στην ακίδα AFM είτε αντίστροφα, αναλόγως τη σχετική υγρασία και τις ιδιότητες διαβρεξιμότητας του υποστρώματος [13]. Λόγω του τριχοειδούς φαινομένου, η ακίδα AFM είναι σε θέση να εναποθέσει τη μελάνη που είναι προσκολλημένη σε αυτήν, αφού έχει προηγηθεί η εμβάπτιση, πάνω σε υποστρώματα τα οποία έλκουν τη μελάνη, με τον ίδιο τρόπο όπως το ένα φύλλο χαρτί έλκει μία γραφίδα εμβάπτισης, όπως φαίνεται στην Εικόνα 2.8.

Με τις συμβατικές ακίδες προβόλου AFM, η νανολιθογραφία με πένα εμβάπτισης μπορεί να εκτυπώσει γραμμές πάχους 12 nm και χωρικής διακριτικής ικανότητας 5 nm. Αυτή η διακριτική ικανότητα μπορεί να βελτιωθεί περαιτέρω με τη χρήση πιο μυτερών προβόλων, ωστόσο η βέλτιστη αυτή ικανότητα που μπορεί να επιτευχθεί δεν έχει ακόμα προσδιοριστεί [4].

Η θερμική νανολιθογραφία με πένα εμβάπτισης (thermal dip-pen nanolithography – tDPN) είναι μία τροποποιημένη εκδοχή της προηγούμενης τεχνικής η οποία χρησιμοποιεί μία ακίδα μικροσκοπίου ατομικής δύναμης συμβατή με τη θερμοκρασία. Η μύτη της πέννας επικαλύπτεται αρχικά με το προς εναπόθεση υλικό υπό στερεή μορφή. Μόλις θερμανθεί, το υλικό με το οποίο έχει επικαλυφθεί η πένα θα λιώσει λόγω μεταφοράς της θερμότητας και θα ρεύσει από την επιφάνεια του άκρου της πέννας προς το υπόστρωμα. Γενικά υποστηρίζεται ότι η χρήση εύτηκτων μελανών προβάλλει πολλά πλεονεκτήματα. Η διαδικασία της εκτύπωσης μπορεί να ενεργοποιηθεί και να απενεργοποιηθεί άμεσα και ο ρυθμός ροής της μελάνης μπορεί να μεταβληθεί εύκολα ελέγχοντας τη θερμοκρασία της μύτης της πέννας. Αρκετές περίπλοκες τρισδιάστατες δομές μπορούν να

δημιουργηθούν μέσω της εκτύπωσης από στρώμα σε στρώμα, με το αρχικό εναποτιθέμενο στρώμα να είναι στερεό. Το γεγονός ότι η τεχνική της θερμικής νανολιθογραφίας με πένα εμβάπτισης μπορεί να λειτουργήσει και υπό κενό, την θέτει συμβατική με άλλες παραδοσιακές μεθόδους κατασκευής ημιαγωγών [14].



Εικόνα 2.8: Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου DPN [13].

Το βέλτιστο πάχος εκτύπωσης που έχουν επιτύχει οι ερευνητές με την tDPN είναι κοντά στα 75 nm. Οι ερευνητές έχουν επίσης δείξει την επιτυχή εκτύπωση του μετάλλου του ινδίου πάνω σε ένα υπόστρωμα και ισχυρίζονται ότι η δυνατή θερμοκρασία λειτουργίας είναι πολύ μεγαλύτερη από το σημείο τήξεως του ινδίου, μέχρι και 1000°C. Ένα βασικό χαρακτηριστικό της tDPN έγκειται στο γεγονός ότι επιτρέπει στη μελάνη να εναποτεθεί με τέτοια μεγάλη θερμική ενέργεια ώστε να την κάνει να οργανωθεί σε μονοστοιβάδες ακριβώς πριν τη στερεοποίησή της [14].

Η λιθογραφία με πένα από πολυμερές (polymer pen lithography) είναι μία τεχνική άμεσης εκτύπωσης με τεχνολογία ακίδας που χαρακτηρίζεται από υψηλή απόδοση και χαμηλό κόστος και πρόκειται για μία ακόμα παραλλαγή της νανολιθογραφίας με πένα εμβάπτισης. Για την ακρίβεια, δεν χρησιμοποιεί μία ακίδα AFM για να εναποθέσει τα υλικά, αλλά αντιθέτως μία ακίδα από πολυμερές. Αυτό που την χαρακτηρίζει ως τεχνική υψηλής απόδοσης συμπληρώνει την αδυναμία της DPN στη μικροκλίμακα, γεγονός που την καθιστά μία πολλά υποσχόμενη μέθοδο για κατασκευές στη μεγάλη κλίμακα. Χιλιάδες, ή ακόμα και εκατομμύρια, πένες από πολυμερές μπορούν να δημιουργήσουν από κοινού μία συστοιχία τέτοιων πολυμερικών πενών όπου με την ταυτόχρονη εναπόθεση των υλικών πάνω στο υπόστρωμα μπορούν να εκτυπώσουν σε μεγαλύτερο εύρος σε σύγκριση με τη χρήση μεμονωμένων πενών [15]. Όταν οι ακίδες της συστοιχίας πολυμερικών πενών ακουμπήσουν το υπόστρωμα, η μελάνη με την οποία αυτές έχουν επικαλυφθεί μπορεί να προσγειωθεί πάνω σε αυτό.

2.6 Άμεση εκτύπωση με τεχνολογία λέιζερ

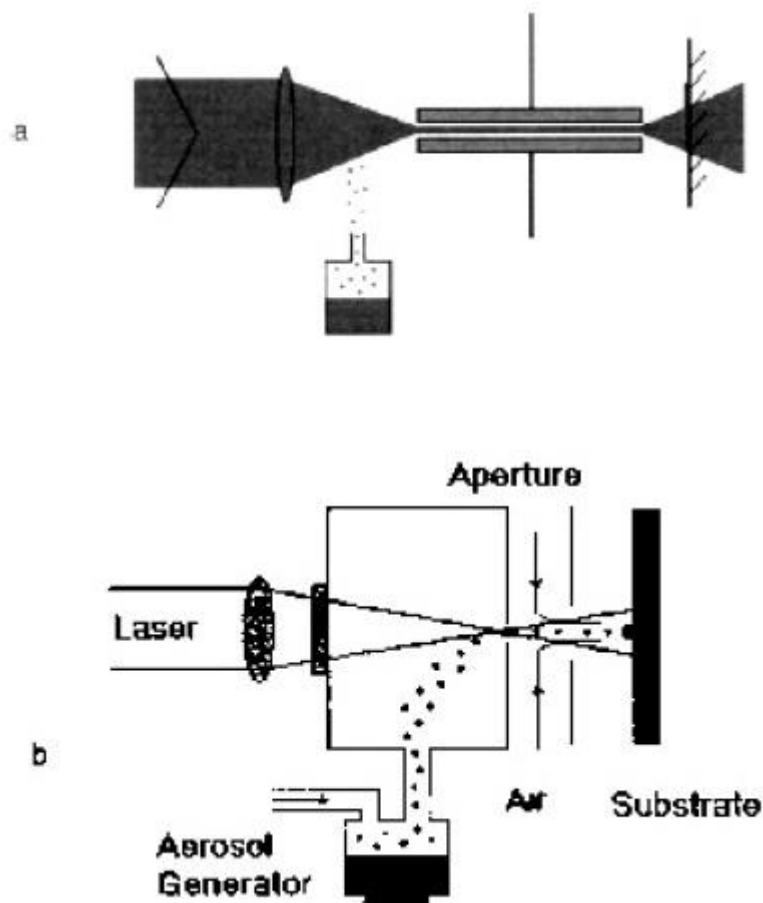
Η τεχνική άμεσης εκτύπωσης με τεχνολογία λέιζερ βασίζεται στη χρήση ενός λέιζερ για την επεξεργασία υλικών ώστε αυτά να εναποθεθούν πάνω σε ένα υπόστρωμα. Η δημοφιλία του λέιζερ για άμεση εκτύπωση προκύπτει αναπόφευκτα από μία διαδικασία, τη μικρομηχανική με λέιζερ (laser micromachining), ωστόσο υπάρχουν πολλές άλλες μέθοδοι που εκμεταλλεύονται τα πλεονεκτήματα του λέιζερ, όπως η χημική εναπόθεση ατμών με λέιζερ (laser chemical vapor deposition – LCVD) [16], η ηλεκτρολυτική επιμετάλλωση (electroplating) με τη χρήση λέιζερ [17–18], η παλμική εξάχνωση με λέιζερ υποβοηθούμενη από μήτρα για άμεση εκτύπωση (matrix assisted pulsed laser evaporation direct write – MAPLE DW) [19], κλπ.. Μερικές μέθοδοι με λέιζερ για κατασκευή μοτίβων είναι αυτόνομες, αλλά μπορούν να θεωρηθούν και ως εργαλεία άμεσης εκτύπωσης, ωστόσο θα ακολουθήσουν μόνο μέθοδοι εναπόθεσης υλικών, σύμφωνα με τον ορισμό που δόθηκε προηγουμένως ως τεχνικές εκτύπωσης όπου δεν απαιτείται το βήμα της εγχάραξης.

2.6.1 Μέθοδοι Άμεσης Εκτύπωσης FGDW και LGDW

Ακολουθεί μία περιγραφή στις μεθόδους άμεσης εκτύπωσης καθοδηγούμενης από ροή (flow-guided direct write – FGDW) και καθοδηγούμενης από λέιζερ (laser-guided direct write – LGDW). Σε αυτές τις τεχνικές, ένα πρόδρομο υγρό ή ένα κολλοειδές αιωρούμενο αρχικά μετασχηματίζεται σε ένα αεροζόλ μέσω συσκευών υπερήχων εξαέρωσης ή νεφελοποίησης πεπιεσμένου αέρα, αναλόγως το μέγεθος των σωματιδίων του πρόδρομου υγρού ή του κολλοειδούς αιωρούμενου, όπως ακριβώς στην “ομίχλη ενεργοποίησης” στα συστήματα ψεκασμού αεροζόλ. Αυτό το πυκνό αεροζόλ εισάγεται στη συνέχεια στις συσκευές εναπόθεσης και εστιάζεται δημιουργώντας μία ευρύτερη δέσμη χάρη στις οπτικές και υδροδυναμικές δυνάμεις που προκύπτουν από τη μεταφορά ορμής μεταξύ της δέσμης του λέιζερ και των σωματιδίων του αεροζόλ.

Για το σύστημα άμεσης εκτύπωσης καθοδηγούμενης από λέιζερ, το λέιζερ και η παραγόμενη ομίχλη μεταφέρονται μαζί μέσα από μία κοίλη οπτική ίνα που οδηγεί τα σωματίδια προς το υπόστρωμα (Εικόνα 2.9 (a)). Ο ρυθμός εναπόθεσης κυμαίνεται από 1 σε 10000 σωματίδια ανά δευτερόλεπτο. Όμως, για το σύστημα άμεσης εκτύπωσης καθοδηγούμενης από ροή, ο ρυθμός εναπόθεσης μπορεί να είναι μεγαλύτερος από 10000 σωματίδια ανά δευτερόλεπτο, και η ταχύτητα αυτών μπορεί να αυξηθεί από 1 m/s σε 10 m/s. Η ακρίβεια για την άμεση εκτύπωση καθοδηγούμενη από λέιζερ και την καθοδηγούμενη από ροή είναι 2 μm και 25 μm αντίστοιχα [4]. Στην άμεση εκτύπωση καθοδηγούμενη από ροή, ένας κλειστός θάλαμος τροφοδοτείται από το παραγόμενο αεροζόλ μέσω μίας ροής αερίου και τα σωματίδιά του εξέρχονται από ένα στόμιο διαμέτρου 1 mm. Ύστερα, τα σωματίδια

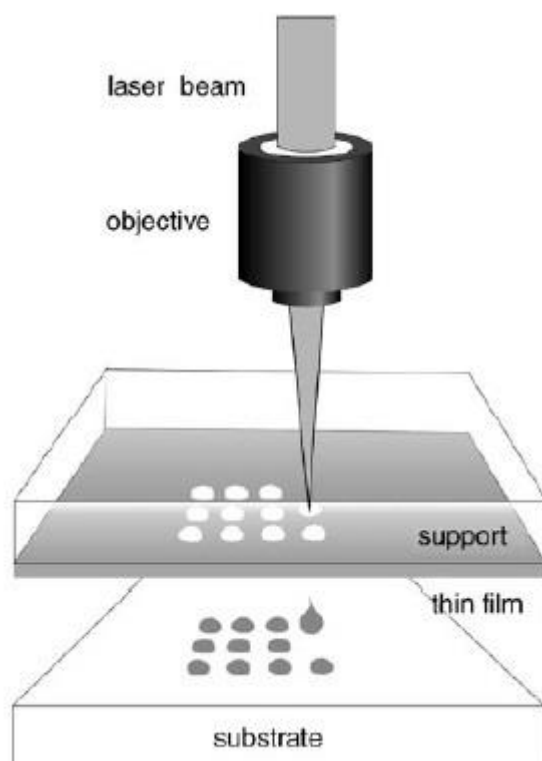
ενώνονται με μία δεύτερη ροή αερίου η οποία δημιουργεί ένα κυλινδρικό μανδύα για να κρατήσει ανέπαφη την ομίχλη. Αυτές οι συνδυασμένες ροές εν συνεχεία περνούν μέσα από μία μικρή οπή για να εστιαστούν ξανά περαιτέρω και να εναποθεθούν πάνω στο υπόστρωμα με τη βοήθεια μίας δέσμης λέιζερ (Εικόνα 2.9 (b)).



Εικόνα 2.9: Αναπαράσταση των συστημάτων (a) LGDW και (b) FGDW [4].

2.6.2 Τεχνική Απευθείας Μικροεναπόθεσης με Λέιζερ

Η τεχνική της απευθείας μικροεναπόθεσης με λέιζερ (laser induced forward transfer – LIFT) είναι άλλη μία τεχνική άμεσης εναπόθεσης με τεχνολογία λέιζερ. Η βασική αρχή της απεικονίζεται στην Εικόνα 2.10. Το προς εκτύπωση υλικό αρχικά εναποτίθεται σε μορφή λεπτού υμενίου σε ένα υπόστρωμα δότη το οποίο επιτρέπει τη διέλευση της δέσμης του λέιζερ. Το υπόστρωμα του δότη με το λεπτό υμένιο πλησιάζουν κοντά στο υπόστρωμα του αποδέκτη. Η δέσμη του λέιζερ εστιάζεται στη διεπιφάνεια του διαφανούς υποστρώματος του δότη και του στρώματος του λεπτού υμενίου και προκαλεί τη μερική εξάτμιση του υλικού/στόχου και ωθεί το εναπομένον πάχος του υλικού προς το υπόστρωμα του αποδέκτη.



Εικόνα 2.10: Σχηματική αναπαράσταση της τεχνικής LIFT [20].

2.7 Συμπεράσματα

Σε αυτή την εργασία, συζητήθηκαν οι κύριοι τύποι για την τεχνική άμεσης εκτύπωσης και παρουσιάστηκαν παραδείγματα για τον καθένα. Δόθηκε ιδιαίτερη σημασία στις βασικές αρχές της κάθε μεθόδου, μαζί με ορισμένα παραδείγματα για τις εφαρμογές. Ο Πίνακας 2.1 [4, 7, 9, 13–15] συγκρίνει τα βασικά χαρακτηριστικά αυτών των μεθόδων που έχουν ήδη συζητηθεί. Για ορισμένες από αυτές τις διαδικασίες ο αναφερόμενος ρυθμός εναπόθεσης είναι ογκομετρικός, ενώ για τις υπόλοιπες είναι γραμμικός.

Παρόλο που οι διαδικασίες άμεσης εκτύπωσης τώρα αρχίζουν να επιδεικνύουν το δυνητικό αντίκτυπο στη μελλοντική κατασκευή μικροηλεκτρονικών, εξακολουθούν να υπάρχουν ορισμένα εμπόδια τεχνικής φύσεως και πρέπει να ξεπεραστούν αρκετές προκλήσεις πριν επιτευχθεί οποιαδήποτε περαιτέρω πρόοδος όσον αφορά τις ευρύτερες βιομηχανικές εφαρμογές. Για παράδειγμα, στις τεχνικές ψεκασμού μελάνης, όχι μόνο η σύνθεση της μελάνης αποτελεί μεγάλη πρόκληση από άποψη ρεολογικών ιδιοτήτων, αιωρούμενων σωματιδίων, διαβρεξιμότητας, πρόσφυσης κ.ά. [21–22], αλλά και οι αλληλεπιδράσεις της μελάνης με τα υποστρώματα είναι κρίσιμες για τον καθορισμό της σταθερότητας, της πληρότητας και διακριτικής ικανότητας των μικροδομών που πραγματοποιούνται με τη τεχνική ψεκασμού μελάνης. Δεδομένου ότι η διαδικασία της εναπόθεσης πρέπει να είναι προσαρμοσμένη με τη λειτουργικότητα των υλικών τα οποία διαμορφώνονται σε

μελάνη, είναι εξαιρετικά σημαντικό να ληφθεί υπόψη η εξέλιξη των υλικών κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας. Επιπλέον, η πλήρη ενσωμάτωση μέσω της δημιουργίας πολυστρωματικών δομών ή ολοκληρωμένων τρισδιάστατων δομών απαιτεί ακριβή τοποθέτηση και ακρίβεια στην ευθυγράμμιση, και επίσης η επιτεύξιμη διακριτική ικανότητα της εναπόθεσης συνεπάγεται περαιτέρω εξέλιξη στην ουσιαστική κατανόηση των διαδικασιών αυτών.

DW techniques		Resolution	Material viscosity range (Pa·s) or types		Writing speed	3D capability*
Droplet-based DW	Inkjet	Continuous	Droplet size 20μm-1mm typically 150 μm	<0.01	60mm ³ /s	●●
		DOD	Droplet size 15 - 200μm	<0.04	0.3mm ³ /s	
	Aerosol Jet	Line width 10-150μm thickness 10nm-5μm	<2.5	0.25mm ³ /s (single nozzle)	●●●	
FBDW		50μm	<1.000	50mm/s typically	●●●	
Tip-based DW	DPN	12nm line width and 5nm spatial resolution	Thiol molecules, macromolecules, nanoparticles		0.2-5 μm/s	●
Laser beam DW	LGDW	2 μm	Non-absorbent droplets and solid particulates	Close to that of Aerosol Jet	10-4mm ³ /s	●●
	FGDW	25μm	Atomizable fluids and colloids		0.25mm ³ /s	●●
	LIFT	10-200μm	Solids		3 -50mm/s	●●

* ● little 3D capability, ●● moderate 3D capability, ●●● excellent 3D capability

Πίνακας 2.1: Σύγκριση χαρακτηριστικών των μεθόδων άμεσης εκτύπωσης [1].

2.8 Η τεχνική LIFT στην ανάπτυξη Μικροαισθητήρων

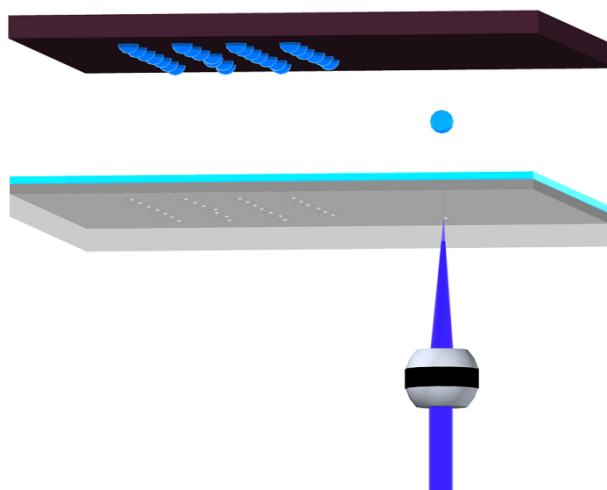
Η ανάπτυξη των Μικρομηχανικών συστημάτων αίσθησης, όπως αυτά περιγράφηκαν στο Κεφάλαιο 1, δημιούργησε νέες προκλήσεις και έθεσε ιδιαίτερες απαιτήσεις στην επιλεκτική εναπόθεση των βιομορίων που θα αποτελέσουν το στοιχείο βιοαναγνώρισης στο βιοαισθητήρα. Οι βασικές προϋποθέσεις που πρέπει να πληρούν οι τεχνικές εναπόθεσης που θα αξιοποιηθούν είναι η υψηλή διακριτική ικανότητα στην εκτύπωση και η προστασία των ευαίσθητων υποστρωμάτων των μικροαισθητήρων από την επαφή με το φορέα του υλικού.

Η επαφή του φορέα του υλικού με το υπόστρωμα του μικροαισθητήρα θα ήταν καταστροφική για λεπτεπίλεπτες δομές μικρής μηχανικής αντοχής (π.χ. η υπέρλεπτη μεμβράνη ενός αισθητήρα χωρητικότητας). Σαν αποτέλεσμα, αποκλείονται αρκετές από τις συμβατικές τεχνικές εναπόθεσης, όπως η εκτύπωση μικροεπαφής (micro contact printing), η εκτύπωση μεταξοτυπίας (screen printing) και άλλες παραλλαγές μεθόδων εκτύπωσης που βασίζονται στην επαφή και τη χρήση στάμπας (όπως η τεχνική roll to roll).

Η τεχνική LIFT είναι μία τεχνική εναπόθεσης στην οποία δεν απαιτείται επαφή (non – contact printing) και μπορεί να πραγματοποιηθεί σε ατμοσφαιρικές συνθήκες πίεσης, και ως εκ τούτου εξασφαλίζει την προστασία των ευαίσθητων υποστρωμάτων των μικροαισθητήρων. Επιπλέον, αυτή η μέθοδος ταχείας

προτυποποίησης δεν αξιοποιεί καθόλου τις μάσκες, οι οποίες είναι απαραίτητες στη φωτολιθογραφία. Κατά συνέπεια, η τεχνική απευθείας μικροεναπόθεσης με λέιζερ μπορεί να προσαρμοστεί εύκολα και με χαμηλό κόστος ώστε να καλύψει τις απαιτήσεις για εναπόθεση πλήθους διαφορετικών υλικών σε υποστρώματα μικροαισθητήρων διαφορετικής μορφολογίας. Επίσης, το ιξώδες των προς εναπόθεση υλικών είναι αρκετά διευρυμένο και μπορεί να πραγματοποιηθεί εκτύπωση τόσο υλικών στερεής φάσης όσο και υγρής.

Η ελάχιστη διακριτική ικανότητα είναι της τάξης των μερικών μικρομέτρων και ανταποκρίνεται στις ανάγκες που θέτουν οι περισσότεροι μικροαισθητήρες. Μία τυπική διάταξη απευθείας μικροεναπόθεσης με λέιζερ έχει ενσωματωμένο ένα οπτικό μικροσκόπιο το οποίο καθιστά το σύστημα εκτύπωσης κατάλληλο για την επί τόπου ευθυγράμμιση και επιλεκτική μεταφορά υλικού σε μεγάλη ποικιλία διαφορετικών υποστρωμάτων μικροαισθητήρων, ενώ εξυπηρετεί και τον επί τόπου έλεγχο του αποτελέσματος της εναπόθεσης.



Εικόνα 2.11: Η διαδικασία της εκτύπωσης με τη χρήση της τεχνικής LIFT [23].

2.9 Αναφορές Κεφαλαίου

1. Y. Zhang, C. Liu, D. Whalley, “Direct-write Techniques for Maskless Production of Microelectronics: A Review of Current State-of-the-art Technologies”, International Conference on Electronic Packaging Technology & High Density Packaging, 497–503 (2009).
2. E. D. Williams, R. U. Ayres, M. Heller, “The 1.7 Kilogram Microchip: Energy and Material Use in the Production of Semiconductor Devices”, Environmental Science and Technology, **36**, 5504–5510 (2002).
3. M. Mantysalo, P. Mansikkamaki, J. Miettinen, K. Kaija, S. Pienimaa, R. Ronkka, K. Hashizume, A. Kamigori, Y. Matsuba, K. Oyama, N. Terada, H. Saito, M. Kuchiki, M. Tsubouchi, “Evaluation of Inkjet Technology for Electronic

- Packaging and System Integration”, Proceedings of the 57th IEEE Electronic Components and Technology Conference, Reno, Nevada, 89–94 (2007).
4. A. Piqué, D. B. Chrisey, “Direct-Write Technologies for Rapid Prototyping Applications: Sensors, Electronics, and integrated Power Sources”, Academic Press, San Diego, CA, 1–551 (2002).
 5. J. A. Lewis, G. M. Gratson, “Direct Writing in Three Dimensions”, *Materials Today*, **7**, 32–39 (2004).
 6. C. J. Robinson, B. Stucker, A. J. Lopes, R. Wicker, J. A. Palmer, “Integration of Direct-Write (DW) and Ultrasonic Consolidation (UC) Technologies to Create Advanced Structures with Embedded Electrical Circuitry”, Proceedings of the 17th Solid Freeform Fabrication Symposium, Austin, TX, 60–69 (2006).
 7. K. K. B. Hon, L. Li, I. M. Hutchings, “Direct writing technology—advances and developments”, *CIRP Annals - Manufacturing Technology*, **57**, 601–620 (2008).
 8. D. Wallace, D. Hayes, T. Chen, V. Shah, D. Radulescu, P. Cooley, K. Wachtler, A. Nallani, “Ink-jet as a MEMS Manufacturing Tool”, Proceedings of the SMTA Pan Pacific Microelectronics Symposium, Hawaii, 1–9(2006).
 9. B. King, M. Renn, “Aerosol Jet Direct Write Printing for Mil-Aero Electronic Applications”, 1–6, <http://www.optomec.com/> (2008).
 10. B. E. Kahn, “The M³D Aerosol Jet System, an Alternative to Inkjet Printing for Printed Electronics”, *Organic and Printed Electronics*, **1**, 14–17 (2007).
 11. [http://www.micropen.com /](http://www.micropen.com/).
 12. B. Li, P. A. Clark, K. H. Church, “Robust Direct-Write Dispensing Tool and Solutions for Micro/Meso-Scale Manufacturing and Packaging”, Proceedings of the ASME International Manufacturing Science and Engineering Conference, Atlanta, Georgia, 1–7 (2007).
 13. R. D. Piner, J. Zhu, F. Xu, S. Hong, C. A. Mirkin, “‘Dip-Pen’ Nanolithography”, *Science*, **283**, 661–663 (1999).
 14. P. E Sheehan, W. P. King, A. R. Laracuate, M. Yang, L. J. Whitman, “Thermal Dip Pen Nanolithography”, *NRL Review Chemical/Biochemical Research*, 1–2 (2006).
 15. F. Huo, Z. Zheng, et al, “Polymer Pen Lithography”, *Science*, **321**, 1658–1660 (2008).
 16. K. Williams, J. Maxwell, K. Larsson, M. Boman, “Freeform Fabrication of Functional Microsolenoids, Electromagnets and Helical Springs Using High-pressure Laser Chemical Vapor Deposition”, Proceedings of the 12th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems, Orlando, Florida, 232–237 (1999).
 17. R. J. von Gutfeld, L. T. Romankiw, R. E. Acosta, “Laser-Enhanced Plating and Etching: Mechanisms and Applications”, *IBM Journal of Research and Development*, **26**, 136–144 (1982).

18. R. J. von Gutfeld, E. E. Tynan, R. L. Melcher, S. E. Blum, "Laser Enhanced Electroplating and Maskless Pattern Generation", *Applied Physics Letters*, **35**, 651–653 (1979).
19. A. Piqué, D. B. Chrisey, R. C. Y. Auyeung, J. Fitz–Gerald, H. D. Wu, R. A. McGill, S. Lakeou, P. K. Wu, V. Nguyen, M. Duignan, "A novel Laser Transfer Process for Direct Writing of Electronic and Sensor Materials", *Applied Physics A: Materials Science & Processing*, **69**, S279-S284 (1999).
20. M. Colina, P. Serra, J. M. Fernández–Pradas, L. Sevilla, J. L. Morenza, "DNA Deposition through Laser Induced Forward Transfer", *Biosensors and Bioelectronics*, **20**, 1638–1642 (2005).
21. D. Kim, S. Jeong, B. K. Park, J. Moon, "Direct Writing of Silver Conductive Patterns: Improvement of Film Morphology and Conductance by Controlling Solvent Compositions" , *Applied Physics Letters*, **89**, 264101–264103 (2006).
22. I. K. Shim, Y. I. Lee, K. J. Lee, J. Joung, "An Organometallic Route to Highly Monodispersed Silver Nanoparticles and Their Application to Ink-Jet Printing", *Materials Chemistry and Physics*, **110**, 316–321 (2008).
23. M. Chatzipetrou, G. Tsekenis, V. Tsouti, S. Chatzandroulis, D. Thanos, I. Zergioti, "Direct laser printing of oligonucleotides for the fabrication of a label-free biosensor", *Procedia Engineering*, **25**, 851–855 (2011).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΤΕΧΝΙΚΗ ΑΠΕΥΘΕΙΑΣ ΜΙΚΡΟΕΝΑΠΟΘΕΣΗΣ ΜΕ ΛΕΙΖΕΡ

3.1 Αρχή λειτουργίας της τεχνικής LIFT

Για να γίνει κατανοητός ο μηχανισμός εναπόθεσης με τη τεχνική LIFT, θα πρέπει αρχικά να γίνει αναφορά στο υπόστρωμα δότη που χρησιμοποιείται για την μετέπειτα εναπόθεση του υλικού στο υπόστρωμα του αποδέκτη. Το υπόστρωμα του δότη είναι πολυστρωματικό [1]: αποτελείται από ένα πλακίδιο χαλαζία (quartz), το οποίο έχει επιστρωθεί με τη τεχνική spin coating από ένα ενδιάμεσο απορροφητικό στρώμα (dynamic release layer – DRL) πάχους 40 nm, όπου σε αυτή την περίπτωση είναι στρώμα τιτανίου (Ti), και ένα ομοιόμορφο στρώμα πάχους 20 μm του υγρού υλικού προς εναπόθεση που έχει τοποθετηθεί με πιπέτα. Όλο το υπόστρωμα του δότη έχει πάχος 1 mm και διάμετρο 2.5 cm (Εικόνα 3.1).

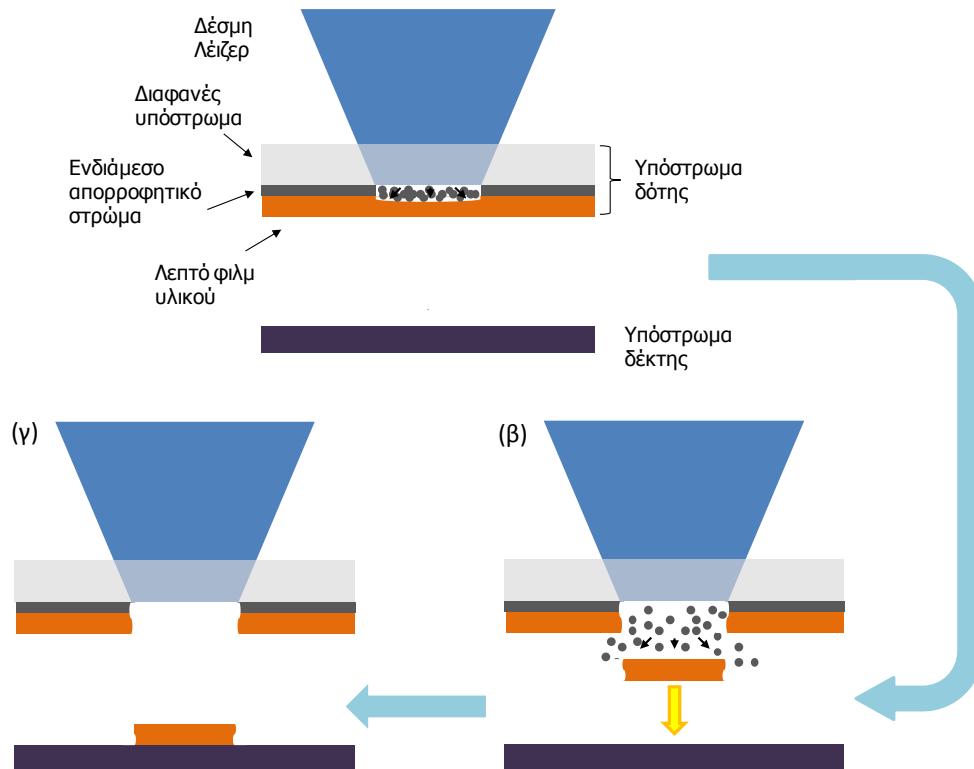


Εικόνα 3.1: Το υπόστρωμα του δότη.

Το quartz είναι διαφανές στην περιοχή του υπερώθρου, του υπεριώδους και του ορατού φάσματος της ακτινοβολίας, κάτι το οποίο συνεπάγεται ότι επιτρέπει στη δέσμη του λέιζερ να διέρχεται μέσα από αυτό χωρίς να την απορροφά. Το τιτάνιο που χρησιμοποιείται εδώ είναι βιοσυμβατό, δηλαδή ενδείκνυται για χρήση σε εφαρμογές εναπόθεσης βιολογικών υλικών, και επιπλέον έχει πολύ καλή πρόσφυση με το quartz, με αποτέλεσμα το υπόστρωμα του δότη να επαναχρησιμοποιείται χωρίς να αφαιρείται ποσότητα του τιτανίου από τις πλύσεις με ddH₂O.

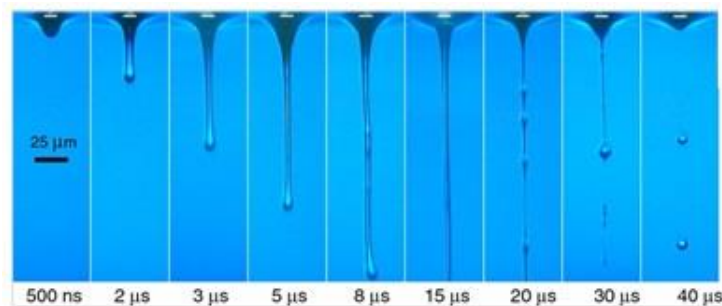
Μόλις απελευθερωθεί η δέσμη του λέιζερ από την κοιλότητά του (βλ. Ενότητα 3.2.1), συναντά πρώτα το quartz, το οποίο επειδή είναι διαφανές στο μήκος κύματος του λέιζερ, δεν επηρεάζει τη δέσμη, δηλαδή δεν την απορροφά, και άρα αυτή περνάει μέσα από αυτό χωρίς καμία απώλεια. Ωστόσο, το τιτάνιο, το επόμενο στρώμα που συναντά, απορροφά τη δέσμη με αποτέλεσμα αυτό να θερμαίνεται η/και αποδομείται τοπικά (Εικόνα 3.2 (α)). Αυτό έχει σα συνέπεια τη δημιουργία ενός θύλακα υψηλής πίεσης αέρα στη διεπιφάνεια του τιτανίου και του διαλύματος, ο οποίος έχει μεγαλύτερη πίεση από την ατμοσφαιρική. Επειδή πρέπει να επανέλθει η ισορροπία των πιέσεων, ο θύλακας, λόγω μικρού μεγέθους και

μεγάλης πίεσης, εκτονώνεται μέχρι το σημείο όπου η εσωτερική του πίεση θα είναι ίση με την ατμοσφαιρική.



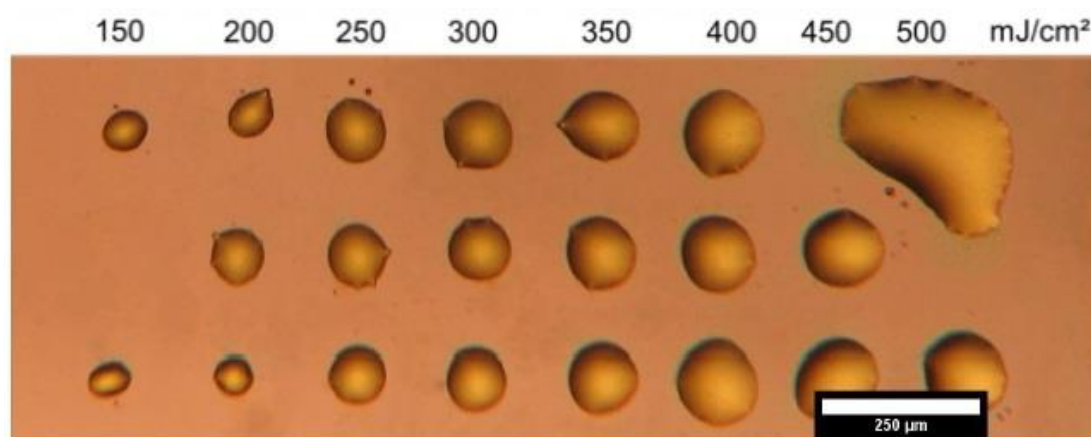
Εικόνα 3.2: Αναπαράσταση της τεχνικής LIFT με χρήση ενδιάμεσου απορροφητικού στρώματος (DRL) (α) Η ακτινοβολία του DRL προκαλεί την θέρμανσή του ή και την αποδόμησή του ανάλογα με την πυκνότητα ενέργειας του λέιζερ. (β) Η εκτόνωση του θύλακα αερίων που δημιουργείται ωθεί προς τα εμπρός το υπερκείμενο κομμάτι του λεπτού φιλμ. (γ) Ο σχηματισμός της δομής λαμβάνει χώρα με την εναπόθεση του λεπτού φιλμ στο υπόστρωμα του αποδέκτη [2].

Σε αυτό το σημείο ο θύλακας θα σπάσει και άρα το συγκεκριμένο τμήμα του διαλύματος θα ελευθερωθεί (Εικόνα 3.2 (β)) με τη μορφή ενός κατευθυντικού jet και θα προσγειωθεί πάνω στο υπόστρωμα του αποδέκτη (Εικόνα 3.2 (γ)).



Εικόνα 3.3: Απεικόνιση της διαδικασίας LIFT υγρής φάσης με τη μέθοδο χρονοεξαρτώμενης απεικόνισης [3].

Το σταγονίδιο (droplet) που προκύπτει πρέπει να έχει συγκεκριμένο μέγεθος: δεν πρέπει να είναι ούτε πολύ μικρό, πράγμα το οποίο σημαίνει ελάχιστο υλικό στο υπόστρωμα του αποδέκτη και άρα μικρή απόδοσή του, αλλά ούτε και πολύ μεγάλο, όπου θα δημιουργούνται συσσωματώματα μεταξύ των εναποτιθέμενων σταγονιδίων και δεν θα υπάρχει ομοιομορφία που και πάλι συνεπάγεται όχι καλή απόδοση για το μικροσύστημα. Πραγματοποιούνται δοκιμές με διάφορες πυκνότητες ενέργειας (energy fluence) ούτως ώστε να γίνει σαφές ποια είναι η βέλτιστη ενέργεια. Στην Εικόνα 3.4, είναι φανερό ότι η πυκνότητα ενέργειας 250 mJ/cm^2 δίνει το καλύτερο μέγεθος και σχήμα στα σταγονίδια.



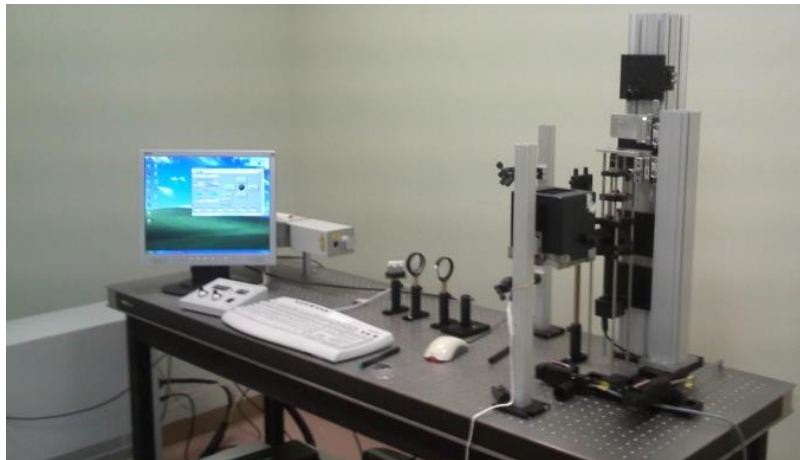
Εικόνα 3.4: Εναπόθεση με την τεχνική LIFT ολιγονουκλεοτιδίων συγκέντρωσης $10 \mu\text{M}$ διαλυμένα σε $1 \text{ M phosphate buffer pH } 8$ και $2\% \text{ sodium dodecyl sulphate (SDS)}$ σε επίπεδες επιφάνειες GOPTS/LTO/Si για διαφορετικές πυκνότητες ενέργειας της δέσμης του λέιζερ [4].

Αξίζει να σημειωθεί ότι μπορεί το τιτάνιο να θερμαίνεται ή/και να αποδομείται τοπικά, ωστόσο το βιολογικό δείγμα δεν καταστρέφεται ούτε επηρεάζεται η λειτουργικότητά του, με αποτέλεσμα να παραμένει ανεπηρέαστο κατά τη διάρκεια της εναπόθεσης [5]. Έχουν πραγματοποιηθεί πολλές εργασίες μελέτης του μηχανισμού εναπόθεσης, τόσο σε πειραματικό [3, 6–10] όσο και σε θεωρητικό επίπεδο [11–15], ούτως ώστε να κατανοηθεί όσο το δυνατόν καλύτερα ο σχηματισμός των θυλάκων υψηλής πίεσης και η εξάρτηση του μεγέθους και του σχήματος του σταγονιδίου από την πυκνότητα ενέργειας της δέσμης του λέιζερ, με απώτερο σκοπό τη βελτίωση της τεχνικής LIFT.

3.2 Πειραματική Διάταξη

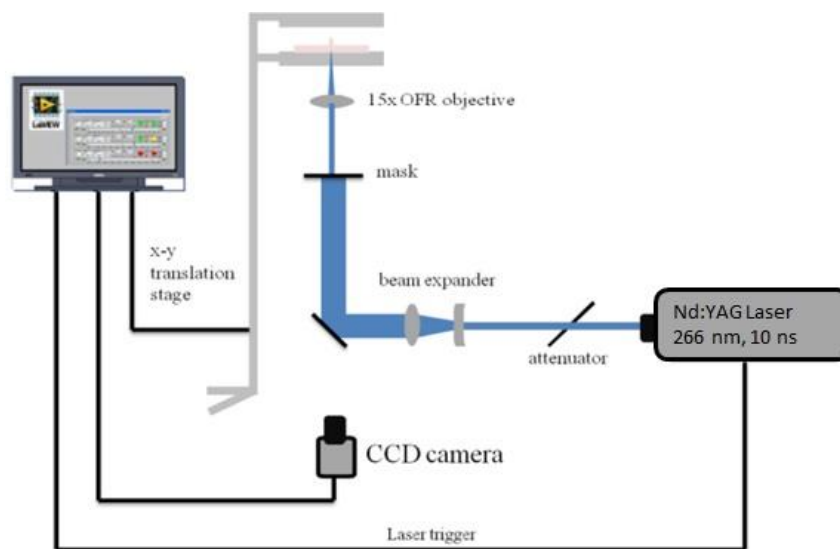
Τα πειράματα που ακολουθούν πραγματοποιήθηκαν πάνω σε έναν αυτοματοποιημένο σταθμό μικρομηχανικής κατάλληλο για την απευθείας μικροεναπόθεση υλικών υγρής φάσης με λέιζερ. Το εργαστήριο στο οποίο βρίσκεται

η διάταξη αυτή υπάγεται στον Τομέα Φυσικής της Σχολής Ε.Μ.Φ.Ε. του Ε.Μ.Π. και η Εικόνα 3.5 παρουσιάζει αυτή τη διάταξη.



Εικόνα 3.5: Φωτογραφία της πειραματικής διάταξης για εναπόθεση υλικών υγρής φάσης με λέιζερ.

Ο σταθμός εναπόθεσης αποτελείται από μία πηγή Λέιζερ, μια βάση στήριξης του υποστρώματος δότη (ΒΣΥΔ), μια βάση στήριξης του υποστρώματος αποδέκτη (ΒΣΥΑ) ελεγχόμενη από βηματικούς κινητήρες, έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή και ορισμένα οπτικά στοιχεία (Εικόνα 3.6).



Εικόνα 3.6: Σχηματική αναπαράσταση της πειραματικής διάταξης για εναπόθεση υλικών υγρής φάσης με λέιζερ.

Στόχος της πειραματικής αυτής διάταξης είναι η ελεγχόμενη απεικόνιση της μάσκας, σε μικρομετρικές διαστάσεις, στο υπόστρωμα του αποδέκτη μέσω ενός αντικειμενικού φακού. Παράλληλα, υπήρχε ανάγκη για ανάπτυξη ενός ανεστραμμένου μικροσκοπίου για απεικόνιση των διεργασιών σε πραγματικό

χρόνο. Τα στοιχεία του σταθμού εναπόθεσης και οι λειτουργίες τους παρουσιάζονται αναλυτικά στις παρακάτω παραγράφους.

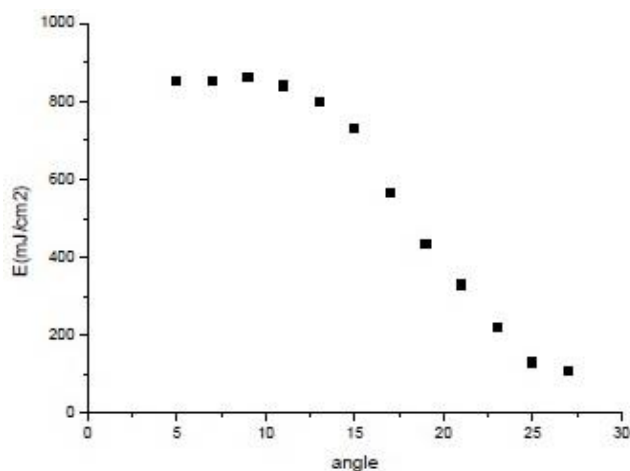
3.2.1 Πηγή Λείζερ

Η πηγή ακτινοβολίας που χρησιμοποιήθηκε είναι ένα Nd:YAG (Neodymium-doped Yttrium Aluminium Garnet) λέιζερ. Το μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε έχει μέγιστη ονομαστική ισχύ εξόδου 300 mJ για το μήκος κύματος 1064 nm της βασικής αρμονικής. Το σύστημα λέιζερ παρείχε την δυνατότητα εκπομπής και των τριών βασικών αρμονικών (2^η – 532 nm, 3^η – 355 nm, 4^η – 266 nm) με χρήση κατάλληλων κρυστάλλων διπλασιασμού συχνότητας και κατόπτρων στο εσωτερικό της κοιλότητάς του. Όλα τα πειράματα εναπόθεσης πραγματοποιήθηκαν με την 4^η αρμονική για την οποία το εύρος του παλμού μετρήθηκε, με τη βοήθεια ενός παλμογράφου και ενός ενεργόμετρου, σε 10 nsec.

3.2.2 Εξασθενητής Δέσμης

Ο εξασθενητής είναι ένα πλακίδιο που παρεμβάλλεται αμέσως μετά την κοιλότητα του λέιζερ με την ιδιότητα να εξασθενεί της έξοδο της δέσμης του. Με την περιστροφή του εξασθενητή, ανακλάται μέρος της δέσμης με αποτέλεσμα η δέσμη που απομένει να χαρακτηρίζεται από μικρότερη πυκνότητα ενέργειας. Δηλαδή, για μεγαλύτερες γωνίες ως προς τη βάση περιστροφής του, ο εξασθενητής επέτρεπε λιγότερη πυκνότητα ενέργειας στη δέσμη του λέιζερ. Οι γωνίες περιστροφής του εξασθενητή επιλέγονται με το πρόγραμμα LabVIEW του Η/Υ.

Με τη βοήθεια ενός παλμογράφου και ενός ενεργόμετρου, προκύπτει η τάση εξόδου ΔV για τις διαδοχικές γωνίες. Ρυθμίζοντας τη μάσκα (βλ. Ενότητα 3.2.5) ώστε να δίνει αποτύπωμα (spot size) διαμέτρου 50 μm πάνω στο υπόστρωμα δότη, η ενέργεια υπολογίζεται από τη σχέση:



$$E = \frac{\Delta V * \pi R^2}{1480} \left(\frac{mJ}{cm^2} \right)$$

Εικόνα 3.7: Διάγραμμα βαθμονόμησης της πυκνότητας ενέργειας της δέσμης του λέιζερ συναρτήσει της γωνίας του εξασθενητή.

3.2.3 Σύστημα Τηλεσκοπικών Φακών

Το σύστημα τηλεσκοπικών φακών αποτελείται από έναν αποκλίνοντα φακό ($f_1 = -150 \text{ mm}$) και έναν συγκλίνοντα φακό ($f_2 = 300 \text{ mm}$) τοποθετημένων σε απόσταση 150 mm ώστε να αποτελούν ένα τηλεσκόπιο. Το τηλεσκόπιο μεγεθύνει κατά ένα παράγοντα 2 την διάμετρο της δέσμης ($M = f_2/f_1 = 2$) έτσι ώστε να γίνει αποτελεσματικότερη η επιλογή ενός ομογενούς κομματιού της από την μάσκα (βλ. Ενότητα 3.2.5).

3.2.4 Επίπεδα Κάτοπτρα

Στη συνέχεια, παρεμβάλλονται δύο επίπεδα κάτοπτρα τα οποία αντανakλούν πλήρως τη δέσμη του λέιζερ στο μήκος κύματος που έχει επιλεχθεί (266 nm). Η χρησιμότητά τους έγκειται στο να κατευθύνουν τη δέσμη στην επιθυμητή πορεία.

3.2.5 Μάσκα Δέσμης

Η μεταβλητή μάσκα ρυθμίζει το αποτύπωμα (spot size) της δέσμης του λέιζερ. Η οπή της έχει εξαγωνικό σχήμα, όπου στα υγρά υλικά, λόγω ιξώδους, συνεπάγεται σφαιρικό σχήμα, δηλαδή ένα σταγονίδιο. Λόγω του ότι το σύστημα τηλεσκοπικών φακών διεύρυνε και εστίασε τη δέσμη, με τη χρήση της μάσκας επιτυγχάνεται μία ομοιόμορφη δέσμη, όπου η πυκνότητα ενέργειας που τη χαρακτηρίζει είναι όσο το δυνατόν πιο ισοκαταταμημένη σε όλα τα σημεία της.

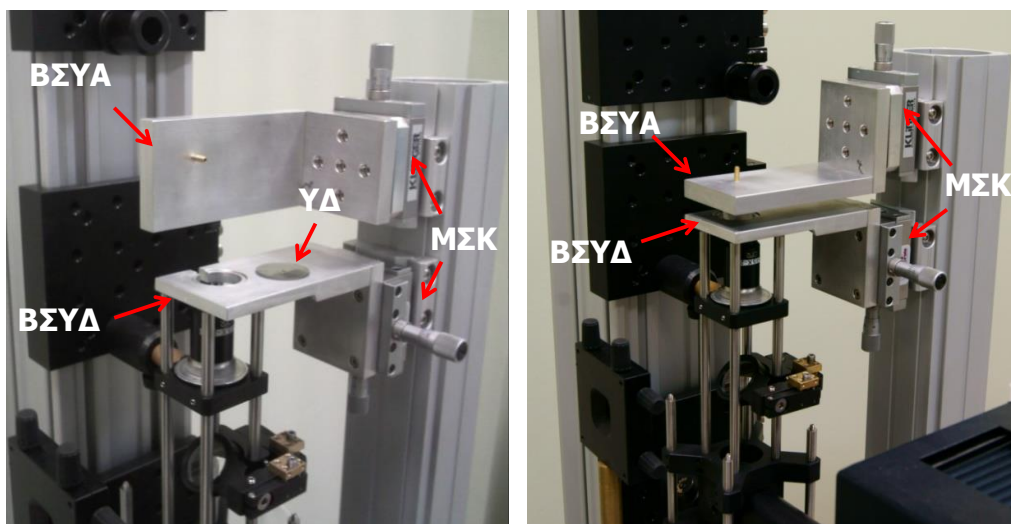
3.2.6 Αντικειμενικός Φακός

Ο αντικειμενικός φακός LMU-15X-266 έχει αριθμητικό άνοιγμα 0.32 και παρόλο που χρησιμοποιείται για την εστίαση της δέσμης πάνω στο υπόστρωμα του δότη, σε συνδυασμό με τη χρήση της μάσκας δημιουργεί φαινόμενα περίθλασης. Η εμφάνιση αυτών των φαινομένων είναι αναμενόμενη καθώς η δέσμη μίας ορισμένης διαμέτρου περνά από ένα εμπόδιο (τη μάσκα) που έχει μικρότερη διάμετρο. Για να μειωθούν σημαντικά αυτά τα φαινόμενα, πρέπει να βρεθεί η βέλτιστη απόσταση της μάσκας από τον αντικειμενικό φακό.

3.2.7 Βάσεις Στήριξης Υποστρώματος Δότη και Αποδέκτη

Οι βάσεις στήριξης του υποστρώματος του δότη και του αποδέκτη αποτελούνται από δύο παράλληλες πλάκες αλουμινίου κατάλληλα προσαρμοσμένες σε δύο μικρομετρικά συστήματα κίνησης. Τα μικρομετρικά

συστήματα κίνησης παρείχαν δυνατότητα ελέγχου της απόστασης μεταξύ των πλακών με ακρίβεια 20 μm. Επίσης, τα μικρομετρικά συστήματα κίνησης επιτρέπουν την ταυτόχρονη κίνηση των βάσεων πάνω – κάτω και αριστερά – δεξιά, αλλά μόνο προς μία κατεύθυνση ανά κίνηση. Η στήριξη του υποστρώματος του δότη γίνεται με την τοποθέτησή του στην ειδικά διαμορφωμένη κοιλότητα της αντίστοιχης βάσης στήριξης. Για το υπόστρωμα του αποδέκτη, η στήριξη γινόταν με χρήση ρητίνης στην αντίστοιχη βάση ενώ το σύστημα παρέχει και την δυνατότητα στήριξης μέσω κενού.



ΒΣΥΑ: Βάση στήριξης υποστρώματος αποδέκτη
ΒΣΥΔ: Βάση στήριξης υποστρώματος δότη
ΜΣΚ: Μικρομετρικό σύστημα κίνησης
ΥΔ: Υπόστρωμα δότης

Εικόνα 3.8: Φωτογραφίες των βάσεων στήριξης των υποστρωμάτων του δότη και του αποδέκτη [2].

3.2.8 Οπτικό Μικροσκόπιο

Το ανεστραμμένο οπτικό μικροσκόπιο, το οποίο είναι ομοαξονικό σε σχέση με τον αντικειμενικό φακό, είναι συνδεδεμένο με μία CCD κάμερα η οποία φωτίζεται με τη βοήθεια ενός διαχωριστή δέσμης, ο οποίος λαμβάνει φως από μία απλή θερμιονική λάμπα και αφενός φωτίζει το υπόστρωμα του δότη και αφετέρου τη CCD κάμερα. Με αυτό το σύστημα, είναι δυνατή η ακριβής ευθυγράμμιση των υποστρωμάτων του δότη και του αποδέκτη, ο έλεγχος του προφίλ της δέσμης και ο επιτόπου έλεγχος των αποτελεσμάτων της εναπόθεσης.

3.2.9 Βηματικοί Κινητήρες και Η/Υ

Για την αυτοματοποίηση της πειραματικής διάταξης χρησιμοποιήθηκαν τρεις βηματικοί κινητήρες. Οι δύο πρώτοι βηματικοί κινητήρες παρείχαν σχετική κίνηση

του υποστρώματος δότη και του υποστρώματος αποδέκτη στους άξονες x και y, δίνοντας την δυνατότητα εκτύπωσης δυσδιάστατων δομών. Ο τρίτος βηματικός κινητήρας παρείχε ελεγχόμενη περιστροφική κίνηση του εξασθενητή της δέσμης λέιζερ, όπως αναφέρθηκε και στην Ενότητα 3.2.2. Η υλοποίηση του αυτοματισμού έγινε με χρήση του LabVIEW και την ανάπτυξη ενός σχετικού προγράμματος που παρέχει τις δυνατότητες για εξωτερικό έλεγχο της πυροδότησης του λέιζερ (επιλογή συχνότητας ή/και πλήθους παλμών), συγχρονισμό των βηματικών κινητήρων και του λέιζερ για την εναπόθεση απλών ή σύνθετων δυσδιάστατων δομών, και για αυτοματοποιημένη επιλογή της πυκνότητας ενέργειας της δέσμης λέιζερ μέσω ελέγχου του βηματικού κινητήρα που ελέγχει την περιστροφή του εξασθενητή.

3.3 Αναφορές Κεφαλαίου

1. W. A. Tolbert, I.-Y. S. Lee, M. M. Doxtader, E. W. Ellis, D. D. Dlott, “High-speed color imaging by laser ablation transfer with a dynamic release layer: fundamental mechanisms”, *Journal of Imaging Science and Technology*, **37**, 411–421 (1993).
2. Χ. Μπουτόπουλος, “Αλληλεπίδραση Ακτινοβολίας Λέιζερ και Οργανικών Υλικών με Εφαρμογές σε Μικρο – αισθητήρες”, Διδακτορική Διατριβή, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Σχολή Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών Επιστημών, Αθήνα (2011).
3. M. S. Brown, N. T. Kattamis, C. B. Arnold, “Time-resolved dynamics of laser-induced micro-jets from thin liquid films”, *Microfluidics and Nanofluidics*, **11**, 199–207 (2011).
4. Μ. Χατζηπέτρου, “Ενεργοποίηση βιοαισθητήρων και εκτύπωση βιολογικού υλικού με laser”, Μεταπτυχιακή Εργασία, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Σχολή Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών Επιστημών, Αθήνα (2010).
5. M. Colina, P. Serra, J. M. Fernández–Pradas, L. Sevilla, J. L. Morenza, “DNA deposition through laser induced forward transfer”, *Biosensors and Bioelectronics*, **20**, 1638–1642 (2005).
6. M. Duocastella, J. M. Fernández–Pradas, J. L. Morenza, P. Serra, “Time-resolved imaging of the laser forward transfer of liquids”, *Journal of Applied Physics*, **106**, 084907-1–084907-7 (2009).
7. M. Gruene, C. Unger, L. Koch, A. Deiwick, B. Chichkov, “Dispensing pico to nanolitre of a natural hydrogel by laser-assisted bioprinting”, *Biomedical Engineering Online*, **10**, 1–11 (2011).
8. J. A. Barron, H. D. Young, D. D. Dlott, M. M. Darfler, D. B. Krizman, B. R. Ringeisen, “Printing of protein microarrays via a capillary-free fluid jetting mechanism”, *Proteomics*, **5**, 4138–4144 (2005).
9. D. Young, R. C. Y. Auyeung, A. Piqué, D. B. Chrisey, D. D. Dlott, “Plume and jetting regimes in a laser based forward transfer process as observed by time-

- resolved optical microscopy”, *Applied Surface Science*, **197–198**, 181–187 (2002).
10. A. Pearson, E. Cox, J. R. Blake, S. R. Otto, “Bubble interactions near a free surface”, *Engineering Analysis with Boundary Elements*, **28**, 295–313 (2004).
 11. M. V. Shugaev, N. M. Bulgakova, “Thermodynamic and stress analysis of laser-induced forward transfer of metals”, *Applied Physics A: Materials Science & Processing*, **101**, 103–109 (2010).
 12. D. A. Willis, V. Grosu, “The effect of melting-induced volumetric expansion on initiation of laser-induced forward transfer”, *Applied Surface Science*, **253**, 4759–4763 (2007).
 13. C. Mézel, L. Hallo, A. Souquet, J. Breil, D. Hébert, F. Guillemot, “Self-consistent modeling of jet formation process in the nanosecond laser pulse regime”, *Physics of Plasmas*, **16**, 123112-1–123112-12 (2009).
 14. A. Prosperetti, “A generalization of the Rayleigh–Plesset equation of bubble dynamics”, *Physics of Fluids*, **25**, 409–410 (1982).
 15. L. Xiu–Mei, H. Jie, L. Jian, N. Xiao–Wu, “Growth and collapse of laser-induced bubbles in glycerol–water mixtures”, *Chinese Physics B*, **17**, 2574–2579 (2008).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ ΓΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗΣ DNA

4.1 Εισαγωγή

Στη Μοριακή Βιολογία, η διαδικασία ανίχνευσης της υβριδοποίησης DNA αφορά μία ακινητοποιημένη μονόκλωνη αλυσίδα DNA (single-stranded DNA – ssDNA), την probe, συνήθως μήκους 100 με 1000 βάσεις, η οποία αξιοποιείται για την ανίχνευση της παρουσίας ολιγονουκλεοτιδικών αλληλουχιών/στόχων, τις target, των οποίων οι βάσεις είναι πλήρως συμπληρωματικές με τις αντίστοιχες βάσεις της ssDNA. Λόγω αυτής της συμπληρωματικότητας, δημιουργούνται δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των ζευγαρωτών βάσεων και σχηματίζεται μία δίκλωνη αλυσίδα DNA (double-stranded DNA – dsDNA).

Οι δοκιμές υβριδοποίησης για την ανίχνευση συγκεκριμένων αλληλουχιών νουκλεϊκών οξέων αξιοποιούνται ευρέως σε διάφορους τομείς της έρευνας καθώς και σε κλινικές και ιατροδικαστικές εξετάσεις ρουτίνας. Έχουν μελετηθεί εκτενώς τα τελευταία χρόνια οι εφαρμογές των βιοαισθητήρων σε αυτό τον τομέα λόγω της πολλά υποσχόμενης, γρήγορης και χαμηλού κόστους λύσης που προσφέρουν στις εξετάσεις DNA. Αυτή η τεχνολογία βασίζεται στην ακινητοποίηση μίας μονόκλωνης αλυσίδας DNA (ssDNA) πάνω σε διάφορους ηλεκτροχημικούς μετατροπείς οι οποίοι μεταφράζουν το συμβάν της υβριδοποίησης σε ηλεκτρικό σήμα. Ο Mikkelsen κατευθύνθηκε κυρίως προς τη βολταμετρική παρακολούθηση αυτής της διεργασίας. Η έρευνά του κινήθηκε ως επί το πλείστον προς την εφαρμογή των ηλεκτρικά ενεργών ligands που παρεμβάλλονται μεταξύ των βάσεων του DNA (DNA intercalators) και των συνδετικών ουσιών στο έλασσον αυλάκι (minor groove) του DNA ως δείκτες οξειδοαναγωγής οι οποίοι υποβοήθησαν την υβριδοποίηση [1].

Άλλοι δείκτες οξειδοαναγωγής που έχουν αξιοποιηθεί είναι το μόριο της δαουνομυκίνης [2], καθώς και συμπλέγματα μετάλλων όπως κοβαλτίου – φαινανθρολίνης [3–4], κοβαλτίου – διπυριδίνης [5–6] και ρουθηνίου – διπυριδίνης [7–8], αντικαρκινικοί δείκτες όπως η εχινομυκίνη [9–10] και η επιρουμπικίνη [11], και τέλος, οργανικές χρωστικές όπως το κυανούν του μεθυλενίου [12–17]. Συνηθίζεται επίσης η επισήμανση της ακινητοποιημένης μονόκλωνης αλυσίδας DNA με ένζυμα [18–30] τα οποία λόγω της ηλεκτροχημικής αντίδρασης που καταλύουν, βοηθούν περαιτέρω στην ανίχνευση υβριδοποίησης.

Πέραν από τους δείκτες, η υβριδοποίηση έγινε αντιληπτή σε αισθητήρες μικροδοκών από τους Hansen et al. [31] και τους McKendry et al. [32], καθώς και σε ηλεκτρόδια ημιαγωγικών οξειδίων από τους Zebda et al. [33]. Ωστόσο, επειδή αυτή η εργασία εστιάζει στην τεχνική LIFT για εκτύπωση βιολογικού υλικού, και συγκεκριμένα ολιγονουκλεοτιδικών ακολουθιών, αξίζει να αναφερθεί ότι πραγματοποιήθηκαν δοκιμές με τη χρήση αυτής της μεθόδου [34–35], οι οποίες

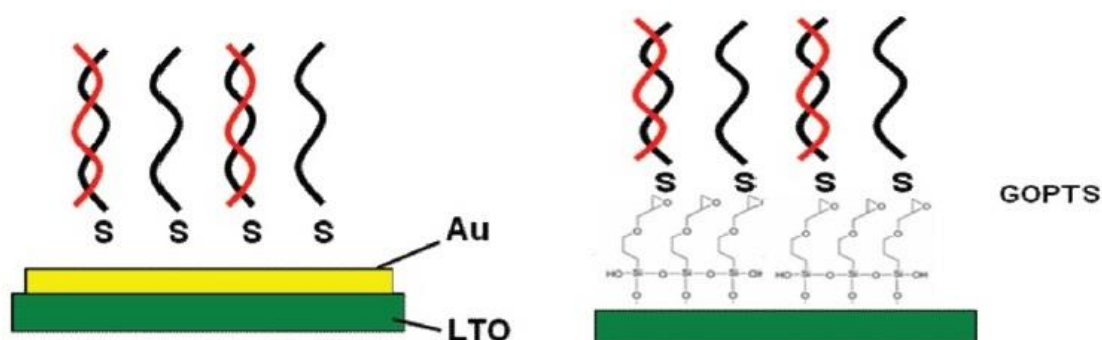
έδειξαν ότι η διαδικασία αυτή δεν αλλοιώνει τη μονόκλωνη αλυσίδα κατά την εναπόθεσή της, οπότε δεν επηρεάζεται και η υβριδοποίηση του DNA.

4.2 Προετοιμασία των Υποστρώματων των Αποδεκτών

Πριν την εναπόθεση με την τεχνική LIFT, τα υποστρώματα των αποδεκτών που θα χρησιμοποιηθούν θα πρέπει αρχικά να υποστούν χημική τροποποίηση, καθώς η μονόκλωνη αλυσίδα DNA (ssDNA) δεν θα μπορεί να ακινητοποιηθεί στην επιφάνειά τους χωρίς να προσδεθεί με ομάδες θειόλης. Τα πρωτόκολλα που ακολουθούνται για τον καθαρισμό και την προετοιμασία του υποστρώματος συνήθως περιλαμβάνουν διαδικασίες χημικής τροποποίησης οι οποίες ως σκοπό έχουν αφενός να “καθαρίσουν” την επιφάνεια από ανεπιθύμητα σωματίδια και παράγοντες μόλυνσης (π.χ. σκόνη) και αφετέρου να εισάγουν συστοιχίες των λειτουργικών ομάδων μέσω της διαβροχής της επιφάνειας με κατάλληλες χημικές ενώσεις οι οποίες προσδένονται στην επιφάνεια του. Η πρόσδεση αυτή μπορεί να είναι είτε φυσική είτε χημική υπό την έννοια της φυσικής προσρόφησης στην επιφάνεια και της ανάπτυξης χημικών δεσμών μεταξύ των μορίων του εκάστοτε χημικού παράγοντα και της επιφάνειας του υποστρώματος.

Οι μέθοδοι ακινητοποίησης που χρησιμοποιήθηκαν, όπως βλέπουμε και στην Εικόνα 4.1, ήταν:

- η εναπόθεση στρώματος χρυσού πριν την εκτύπωση του βιολογικού υλικού [36] και
- η χρήση ενός σιλανίου, του 3-glycidoxypropyltrimethoxysilane (GOPTS) [37].



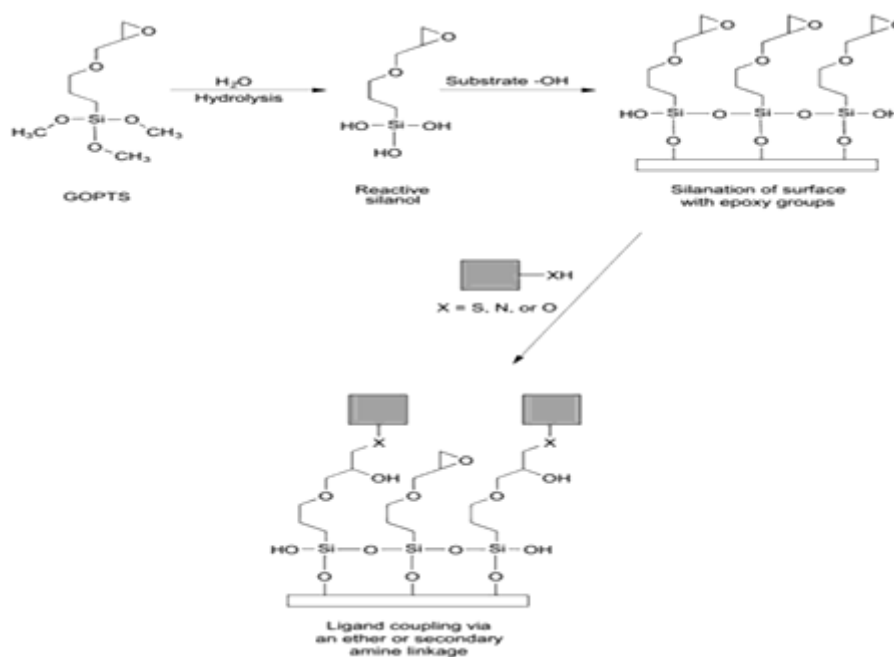
Εικόνα 4.1 Απεικόνιση ακινητοποίησης τροποποιημένων με θειόλη ολιγονουκλεοτιδίων σε επιφάνειες χρυσού και ενεργοποιημένου με GOPTS οξειδίου του πυριτίου [38].

Για την περίπτωση της ακινητοποίησης των ολιγονουκλεοτιδίων σε επιφάνειες χρυσού, οι διαδικασίες καθαρισμού περιλαμβάνουν τα εξής: 1) διαμόρφωση της επιφάνειας, β) ακινητοποίηση των νουκλεϊκών οξέων και γ) υβριδοποίηση συμπληρωματικών νουκλεϊκών οξέων. Το πάχος της διαμόρφωσης της επιφάνειας αφορά στην επίστρωση τιτανίου πάχους περίπου 2 nm πάνω στις

επιφάνειες LTO/Si και την επακόλουθη επίστρωση με χρυσό πάχους 200 nm. Εν συνεχεία, τα δείγματα υπόκεινται σε καθαρισμό μέσω πλύσεων με ddH₂O.

Αντίστοιχα, για την περίπτωση της ακινητοποίησης ολιγονουκλεοτιδίων σε επιφάνειες GOPTS/LTO, αρχικά το δείγμα υπόκειται σε πλύσεις σε αιθανόλη (95%) και στη συνέχεια αναδεύεται σε διάλυμα 2% 3-glycidoxypropyltrimethoxysilane (GOPTS) σε 95% αιθανόλη για 6 ώρες στους 37°C. Τέλος το δείγμα στεγνώνεται με αέρα και ψήνεται στους 135°C για μία ώρα.

Η ενεργοποίηση των επιφανειών των δειγμάτων αποτελεί ένα σημαντικό στάδιο της χημικής τροποποίησης και σκοπό έχει να ακινητοποιήσει τα βιομόρια σε επίπεδες επιφάνειες LTO/Si και σε πυκνή διάταξη. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση κατάλληλων χημικών διαλυμάτων, μεγάλης ιοντικής ισχύος, ώστε να αποφευχθεί η περίπτωση απώθησης λόγω ομώνυμων φορτίων [39]. Για την πρώτη μέθοδο ακινητοποίησης που περιγράφηκε, η εισαγωγή λειτουργικών ομάδων θειόλης (-SH-) συντελεί στο σχηματισμό ομοιοπολικού δεσμού μεταξύ της επιφάνειας του χρυσού και της θειόλης. Η επίτευξη του ομοιοπολικού δεσμού ευνοείται από τη στιγμή που ο χρυσός λειτουργεί ως δότης ενώ το πυρίτιο ως αποδέκτης των ηλεκτρονίων [40].



Εικόνα 4.2: Μέθοδος τροποποίησης επιφανειών LTO με GOPTS [38].

Όσον αφορά στη δεύτερη μέθοδο που περιγράφηκε, το σιλάνιο λειτουργεί ως γέφυρα πρόσδεσης καθώς προσδένεται στα ελεύθερα καρβοξύλια (-OH-) τα οποία κατανέμονται ομοιόμορφα πάνω στις επιφάνειες του πυριτίου (Εικόνα 4.2). Σημαντικός παράγοντας για την ακινητοποίηση των βιομορίων με ομάδες θειόλης είναι ότι το διάλυμα θα πρέπει να βρίσκεται σε ελαφρά βασική κατάσταση (pH 8) καθώς οι ομάδες θειόλης είναι πιο δραστικές χημικά συγκριτικά με τις άλλες 2 ομάδες για τις οποίες απαιτούνται πιο όξινα διαλύματα. Η επίτευξη της

ακινητοποίησης των βιομορίων, μέσω του σιλανίου, σε πυκνές διατάξεις οφείλεται στο μικρό μήκος άρα και μικρό μοριακό βάρος του GOPTS [41].

4.3 Εναπόθεση των Ολιγονουκλεοτιδίων με την τεχνική LIFT

Για τα πειράματα που ακολουθούν, χρησιμοποιήθηκαν πλήρως συμπληρωματικές (fully complementary – FC) ολιγονουκλεοτιδικές αλυσίδες, τόσο αυτές που θα ήταν ακινητοποιημένες (probe) πάνω στο υπόστρωμα του αποδέκτη, όσο και αυτές που θα αποτελούσαν το στόχο (target). Η αλληλουχία των βάσεων επιλέχθηκε από τη βιβλιοθήκη SELEX (systemic evolution of ligands by exponential enrichment) και έχουν ως ακολούθως:

probe: 5'-HS-(CH₂)₆-TAG CCG ATA TGC GCA-3'-**FAM**

target: 3'-ATC GGC TAT ACG CGT-5'-**Texas Red**

όπου FAM και Texas Red οι δείκτες φθορισμού με τους οποίους έχουν επισημανθεί τα άκρα των αλυσίδων.

Με την τεχνική LIFT εναποτέθηκαν επιτυχώς μία συστοιχία (array) FC probe αλυσίδων (10 μM σε διάλυμα 1 M Potassium Phosphate Buffer pH 8) με τις εξής συνθήκες:

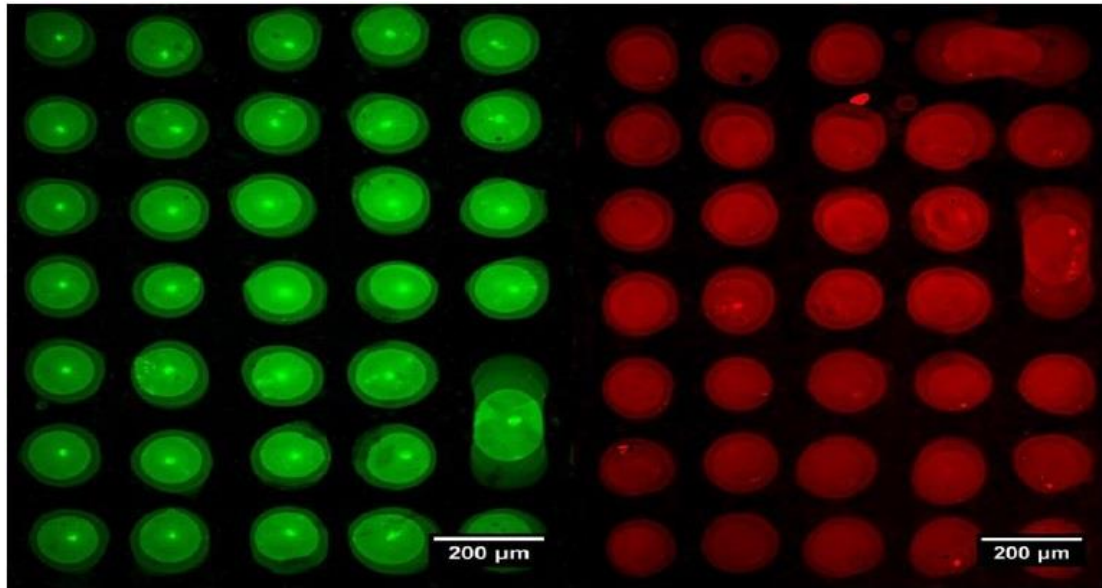
- 10 μL διαλύματος στο υπόστρωμα δότη quartz/Ti
- spot size: 60 μm
- πυκνότητα ενέργειας: 250 mJ/cm²
- απόσταση των υποστρωμάτων δότη – αποδέκτη: 300 μm

Τα υποστρώματα του αποδέκτη ήταν είτε πλακίδια GOPTS/LTO/Si είτε SPEs (Screen Printed Electrodes) με χρυσό ηλεκτρόδιο εργασίας, από τη DropSens. Τα δύο ειδών υποστρώματα συνεπάγονται με δύο τρόπους ανίχνευσης της υβριδοποίησης του DNA, με φθορισμό και ηλεκτροχημεία αντίστοιχα.

4.3.1 Ανίχνευση Υβριδοποίησης DNA με Φθορισμό

Έχει πραγματοποιηθεί σε μία προηγούμενη εργασία η εναπόθεση των FC probe αλυσίδων πάνω στην επιφάνεια ενός πλακιδίου GOPTS/LTO/Si (η διαδικασία της ακινητοποίησής τους περιγράφηκε στην Ενότητα 4.2) με την τεχνική LIFT και για τη μελέτη της μορφολογίας των σταγονιδίων του χρησιμοποιήθηκε ένα μικροσκόπιο φθορισμού [42].

Τα ολιγονουκλεοτίδια αυτά έχουν επισημανθεί με το δείκτη φθορισμού fluorescein, ο οποίος τους προσδίδει αυτό το πράσινο χρώμα. Αμέσως μετά την υβριδοποίηση με τις FC target αλυσίδες (η διαδικασία της υβριδοποίησης περιγράφηκε επίσης στην Ενότητα 4.2), ο δείκτης φθορισμού Texas Red δίνει το χαρακτηριστικό κόκκινο χρώμα (Εικόνα 4.3).



Εικόνα 4.3: Εικόνες μικροσκοπίου φθορισμού των FC probe αλυσίδων (αριστερά) και των υβριδοποιημένων με FC target αλυσίδων (δεξιά) [42].

Στις παραπάνω εικόνες είναι φανερή η μεγάλη επιλεκτικότητα στην υβριδοποίηση των νουκλεϊκών αλυσίδων μεταξύ τους, καθώς ο δείκτης φθορισμού Texas Red είναι ορατός μόνο στα σημεία που προϋπήρχαν οι probe αλυσίδες. Βρέθηκε ότι η φωτεινότητα των περιοχών με το δείκτη φθορισμού είναι 6 φορές πιο φωτεινή από ότι στις γύρω περιοχές. Τέλος, το σήμα φθορισμού είναι ομοιόμορφο σε όλα τα σταγονίδια, γεγονός το οποίο καταδεικνύει ότι η κατανομή των ολιγονουκλεοτιδίων πάνω στην επιφάνεια είναι επίσης ομοιόμορφη χωρίς την παρουσία συσσωματωμάτων.

4.3.2 Ανίχνευση Υβριδοποίησης DNA με Ηλεκτροχημεία

Για την ανάπτυξη των ηλεκτροχημικών αισθητήρων, αξιοποιήθηκαν τα SPEs της εταιρείας DropSens με κωδικό DRP-223BT (Εικόνα 4.4). Πρόκειται για αισθητήρες 3 ηλεκτροδίων, όπου στο συγκεκριμένο SPE, το ηλεκτρόδιο εργασίας (working electrode – WE) και το βοηθητικό (counter electrode – CE) είναι από χρυσό, ενώ το ηλεκτρόδιο αναφοράς (reference electrode – RE) και οι ηλεκτρικές επαφές μεταξύ τους είναι από άργυρο. Η δε διάμετρος του ηλεκτροδίου εργασίας είναι 1.6 mm.

Η εναπόθεση των FC probe αλυσίδων με την τεχνική LIFT πραγματοποιήθηκε σε όλο το WE και καλύφθηκε περιοχή $1600 \times 1600 \mu\text{m}^2$. Επειδή αυτό το ηλεκτρόδιο είναι χρυσό, δεν απαιτείται καμία χημική τροποποίηση της επιφάνειάς του, καθώς διαθέτει ήδη ενεργές ομάδες θειόλης και άρα τα νουκλεϊκά οξέα μπορούν να προσδεθούν στην επιφάνειά του. Η εφαρμογή ορισμένου δυναμικού μεταξύ του WE και του RE προκαλεί την οξείδωση ή την αναγωγή ηλεκτρενεργών ουσιών του βιολογικού δείγματος στο WE. Αποτέλεσμα είναι η διεύλωση ρεύματος, η ένταση

του οποίου μπορεί να συσχετιστεί με τη συγκέντρωση της ηλεκτρενεργού προσδιοριζόμενης ουσίας στο διάλυμα.



Εικόνα 4.4: Τα επιμέρους ηλεκτρόδια ενός DRP-223BT SPE της DropSens.

Η άντληση ηλεκτρονίων δεν μπορεί να συνεχιστεί χωρίς τη φόρτιση του αισθητήρα και άρα διακοπή της αντίδρασης. Για να διατηρηθεί αυτός ηλεκτρικά ουδέτερος, η περίσσεια ή το έλλειμμα των ηλεκτρονίων θα πρέπει να αναπληρωθεί με ένα ίσο και αντίθετο ρεύμα στο CE. Οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στο WE καθορίζονται από την τάση μεταξύ του μετάλλου αυτού και του διαλύματος του ηλεκτρολύτη. Για να μετρηθεί με ακρίβεια το δυναμικό του διαλύματος του ηλεκτρολύτη, χρειάζεται το RE, το οποίο δεν επιτρέπει τη διέλευση ρεύματος, και αυτό ακριβώς το δυναμικό είναι που ελέγχει το ρεύμα που προκαλεί το CE. Αν το ρεύμα του CE είναι ίσο με το ρεύμα του WE, το δυναμικό στο RE παραμένει σταθερό. Αν, ωστόσο, το δυναμικό μεταβληθεί, θα αλλάξει και το ρεύμα για να αντισταθμίσει την περίσσεια ή το έλλειμμα που άφησε η μεταβολή δυναμικού.

Για να μελετηθεί η συμπεριφορά του ρεύματος συναρτήσει ενός μεταβαλλόμενου δυναμικού του εκτυπωμένου με FC probe αλυσίδες χρυσού SPE, αξιοποιείται το όργανο 4140 B pA meter / DC Voltage Source της Hewlett – Packard στο εργαστήριο ηλεκτρικού χαρακτηρισμού του Τομέα Φυσικής της Σχολής Ε.Μ.Φ.Ε. του Ε.Μ.Π. το οποίο δίνει διαγράμματα κυκλικής βολταμετρίας.

Το όργανο αυτό χρησιμοποιείται για τη μέτρηση των στατικών χαρακτηριστικών I-V. Επιλέγοντας την λειτουργία “staircase mode”, αυξάνεται η εφαρμοζόμενη τάση στη πύλη με σταθερό βήμα το οποίο επιλέγεται από το χρήστη μετρώντας στη συνέχεια την ένταση του ρεύματος (I) έπειτα από χρονική καθυστέρηση (καθορίζεται και αυτή από τον χρήστη). Η χρονική αυτή καθυστέρηση εξασφαλίζει την εξασθένηση του μεταβατικού χαρακτήρα του ρεύματος που προκαλεί η μεταβολή της τάσης.

Για τη λήψη των μετρήσεων, το δείγμα τοποθετείται σε μία μεταλλική βάση. Περιφερειακά της βάσης υπάρχουν μετακινούμενες ακίδες βολφραμίου με τρεις βαθμούς ελευθερίας, στην άλλη άκρη των οποίων συνδέονται τα όργανα μέτρησης. Με αυτό τον τρόπο, κάθε μία ακίδα μπορεί να ακουμπήσει από μία ηλεκτρική επαφή του SPE, ώστε να λαμβάνεται η επαφή. Η μεταλλική βάση συνδέεται και αυτή στα όργανα μέτρησης ώστε να αποτελέσει την επαφή του υποστρώματος. Στη διάταξη είναι προσαρτημένο οπτικό μικροσκόπιο, το οποίο διευκολύνει την τοποθέτηση των ακίδων. Ολόκληρη η διάταξη (Εικόνα 4.5), η οποία βρίσκεται στον, εδράζεται μέσα σε μεταλλικό σκοτεινό θάλαμο, ο οποίος βοηθά στη θωράκιση από παρασιτικά ρεύματα ηλεκτροστατικής φύσεως και στην αποφυγή φωτισμού του δείγματος κατά τη διάρκεια μέτρησης.

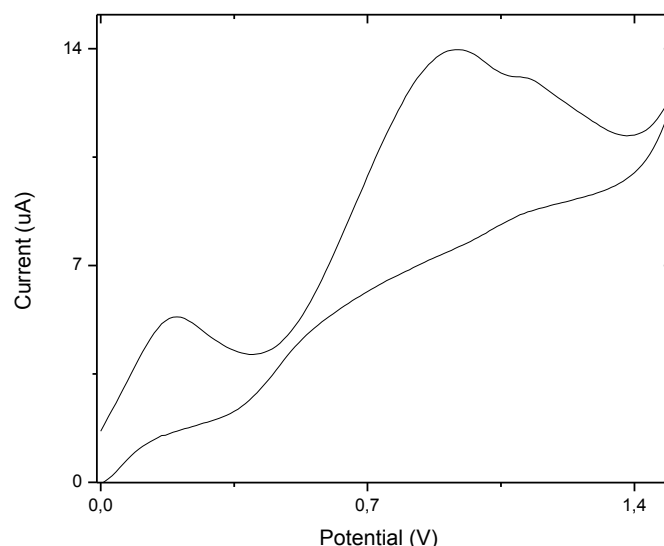


Εικόνα 4.5: Ο θάλαμος μέτρησης με το σύστημα των τεσσάρων ακίδων [43].

Η σύνδεση των ακίδων και της βάσης με τα όργανα μέτρησης γίνεται με ομοαξονικά καλώδια BNC (Bayonet Neill Concelman), με το κεντρικό σύρμα να συνδέεται με την ακίδα και το εξωτερικό να συνδέεται με το θάλαμο, ο οποίος γειώνεται. Το δείγμα συγκρατείται στη μεταλλική βάση με τη βοήθεια κενού, που αναπτύσσεται μέσω άντλησης από σπές που έχουν ανοιχθεί εκεί. Τα όργανα είναι συνδεδεμένα με ηλεκτρονικό υπολογιστή μέσα από θύρα GPIB (General Purpose Interface Bus) και ελέγχονται με ρουτίνες του προγράμματος LabVIEW.

Ακολουθεί ένα διάγραμμα ενός χρυσού SPE όπου έχει γίνει εναπόθεση των FC probe αλυσίδων, μαζί με ένα στοιχείο επισήμανσης: πρόκειται για ένα διάλυμα των $C_6FeK_4N_6$ και $K_3Fe(CN)_6$ συγκέντρωσης 25 mM σε αναλογία 1:1 διαλυμένα σε ένα φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (phosphate buffered solution – PBS) pH 7. Το παραπάνω διάλυμα για συντομία θα λέγεται redox pair (ζεύγος οξειδοαναγωγής), το όνομα του οποίου μαρτυρά το ρόλο που θα παίζει στις παραπάνω μετρήσεις και είναι απαραίτητο για την ανίχνευση της υβριδοποίησης του DNA. Γίνεται φανερό

πως η μέγιστη κορυφή του ρεύματος βρίσκεται στα 940 mV. Αυτή η πληροφορία θα αξιοποιηθεί στις μετρήσεις όπου το δυναμικό είναι σταθερό, ωστόσο το ρεύμα θα μεταβάλλεται με το χρόνο.



Εικόνα 4.6: Διάγραμμα κυκλικής βολταμετρίας ενός χρυσού SPE όπου έχουν εναποτεθεί οι FC probe αλυσίδες με το redox pair (25 mM, 1:1).

Οι μετρήσεις κυκλικής βολταμετρίας ωστόσο δεν τελείωσαν. Θα πρέπει να μελετηθεί η συμπεριφορά του ρεύματος όταν στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου υπάρχουν και FC probe αλυσίδες, αλλά επιπλέον και κατόπιν της υβριδοποίησής τους με τις FC target αλυσίδες. Πρέπει να εξαχθούν και συμπεράσματα όσον αφορά στην αγωγιμότητα τόσο της μονόκλωνης όσο και της δίκλωνης αλυσίδας DNA. Πρώτα όμως θα ακολουθήσουν μετρήσεις όπου το ρεύμα είναι χρονομεταβαλλόμενο, κάτω από το σταθερό δυναμικό που βρέθηκε στο προηγούμενο διάγραμμα.

Για τη διεξαγωγή των μετρήσεων όπου το δυναμικό είναι σταθερό και το ρεύμα μεταβάλλεται με το χρόνο, ο ποτενσιοστάτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο AMPBIO-SPE της εταιρείας Biosensor s.r.l. (Εικόνα 4.7) και ήταν δυνατή η παρακολούθηση και η λήψη των αποτελεσμάτων μέσω ενός κατάλληλου λογισμικού, σχεδιασμένο για το συγκεκριμένο ποτενσιοστάτη. Το μηχάνημα αυτό αποτελείται από δύο κελιά ροής με διαστάσεις εξωτερικής διαμέτρου 30 mm και ύψος 25 mm, όπου τοποθετούνται τα ηλεκτρόδια. Μέσα σε κάθε κελί υπάρχει και μία δίοδος LED (τόσο τα κελιά όσο και η δίοδος δεν αξιοποιούνται στην παρούσα εργασία). Καθώς διέρχεται των κελιών το διάλυμα μέτρησης με τη βοήθεια μίας περισταλτικής αντλίας, πραγματοποιούνται οι αντιδράσεις οξειδοαναγωγής που προκαλούν τη δημιουργία ρεύματος. Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου.

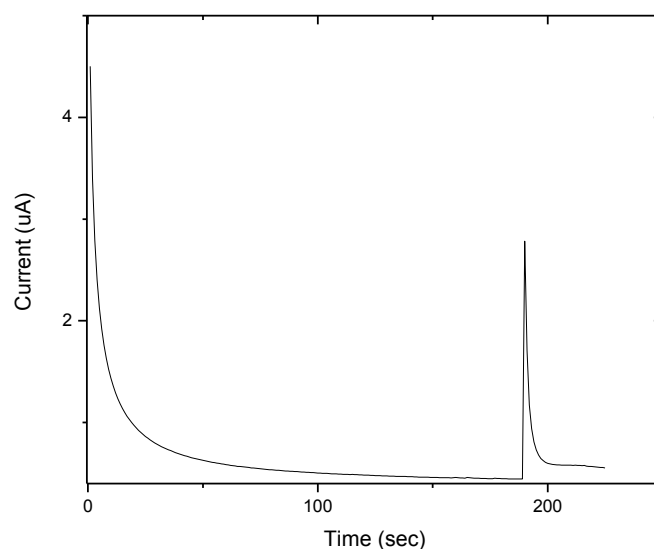


Εικόνα 4.7: Ο ποτενσιοστάτης AMPBIO-SPE της Biosensor s.r.l..

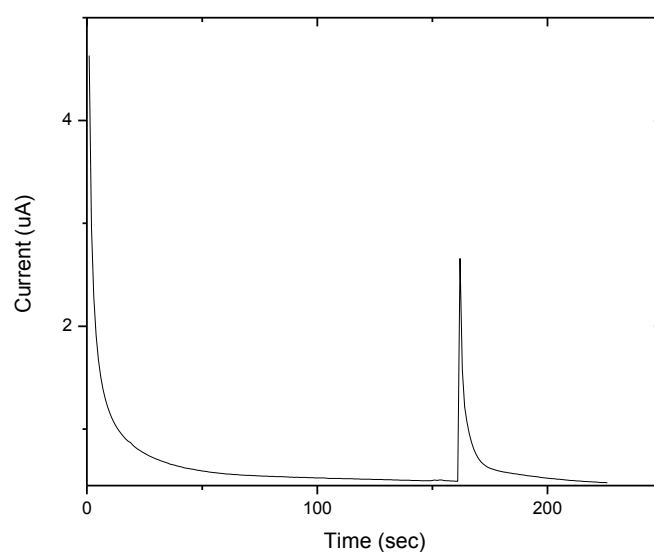
Στο πρόγραμμα του Η/Υ επιλέχθηκαν οι εξής παράμετροι:

- scale: 1 μ A
- pol: ++
- pot C1+C2: 940
- flow: 200
- clockwise
- Int C1+C2: 0
- relax: 0
- light: 0
- dark: 660
- cycle: 12

Με ένα ειδικό καλώδιο USB, το SPE – όπου έχει γίνει η εκτύπωση με FC probe αλυσίδες και έχει ξεπλυθεί σε 1 M Potassium Phosphate Buffer pH 8 – συνδέεται με τον ποτενσιοστάτη και η μέτρηση ξεκινά. Κατόπιν, προστίθεται το redox pair (25 mM, 1:1) και ύστερα τοποθετούνται οι FC target αλυσίδες με πιπέτα, των οποίων οι συγκεντρώσεις διαφέρουν. Ακολουθούν διαγράμματα που δείχνουν την απόκριση του σήματος για 2 διαφορετικές συγκεντρώσεις των FC target αλυσίδων.



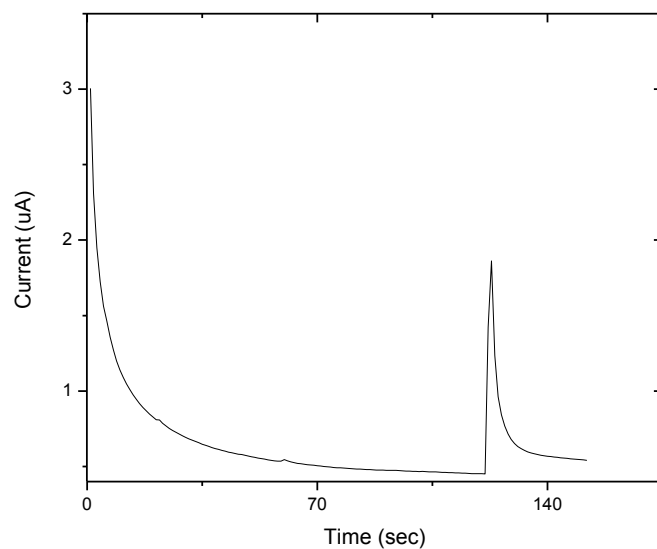
Εικόνα 4.8: Απόκριση του αισθητήρα, όπου οι FC probe αλυσίδες εναποτέθηκαν με την τεχνική LIFT, για ανίχνευση υβριδοποίησης DNA με συγκέντρωση των FC target αλυσίδων 100 nM. Το μετρούμενο ρεύμα ήταν 2.34 μ A.



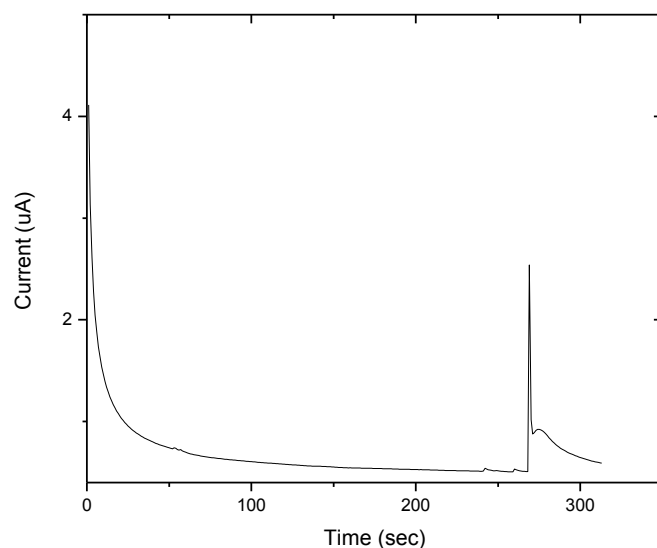
Εικόνα 4.9: Απόκριση του αισθητήρα, όπου οι FC probe αλυσίδες εναποτέθηκαν με την τεχνική LIFT, για ανίχνευση υβριδοποίησης DNA με συγκέντρωση των FC target αλυσίδων 200 nM. Το μετρούμενο ρεύμα ήταν 2.16 μ A.

Ακολουθούν άλλα δύο διαγράμματα όπου η εναπόθεση των FC probe αλυσίδων έγινε με πιπέτα. Μπορεί εύκολα να παρατηρηθεί ότι διαφέρουν ελάχιστα οι τιμές του ρεύματος μεταξύ τους για τις ίδιες συγκεντρώσεις. Αυτό ενισχύει τη δυναμική της τεχνικής του LIFT, καθώς ένα από τα πλεονεκτήματά του είναι ότι το υμένιο που δημιουργεί από τη συστοχία των σταγονιδίων με τις FC probe αλυσίδες

είναι πιο ομοιόμορφο από το αντίστοιχο υμένιο που δημιουργείται κατόπιν της εναπόθεσης με πιπέτα, πράγμα το οποίο εξασφαλίζει ότι η υβριδοποίηση με τις FC target αλυσίδες λαμβάνει χώρα εξίσου ομοιόμορφη καθ' όλη την έκταση του υμενίου.

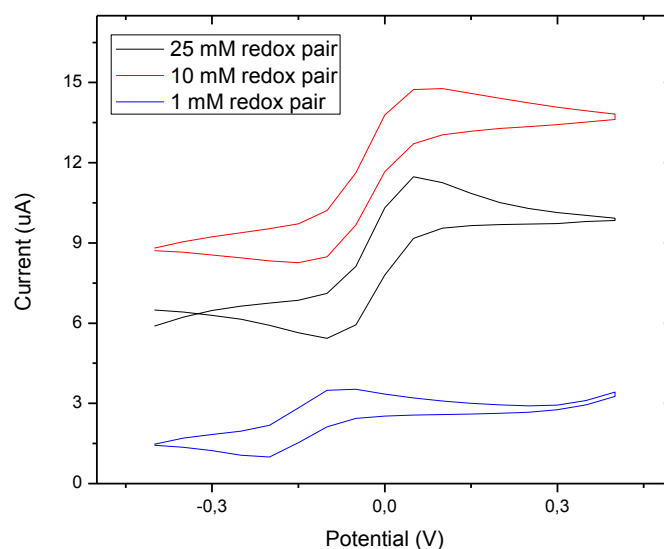


Εικόνα 4.10: Απόκριση του αισθητήρα, όπου οι FC probe αλυσίδες εναποτέθηκαν με πιπέτα, για ανίχνευση υβριδοποίησης DNA με συγκέντρωση των FC target αλυσίδων 100 nM. Το μετρούμενο ρεύμα ήταν 1.4 μ A.

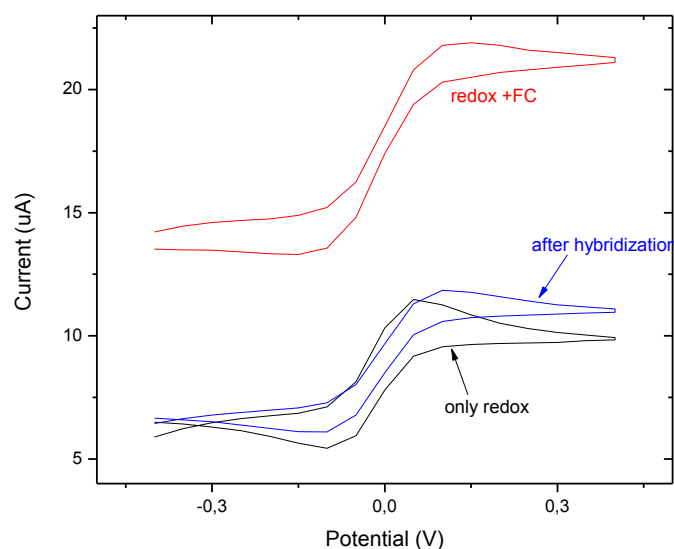


Εικόνα 4.11: Απόκριση του αισθητήρα, όπου οι FC probe αλυσίδες εναποτέθηκαν με πιπέτα, για ανίχνευση υβριδοποίησης DNA με συγκέντρωση των FC target αλυσίδων 200 nM. Το μετρούμενο ρεύμα ήταν 2 μ A.

Ακολουθούν κάποια ακόμα διαγράμματα κυκλικής βολταμετρίας. Αρχικά γίνονται κάποιες δοκιμές ως προς τη συγκέντρωση που πρέπει να έχει το redox pair (Εικόνα 4.12). Είναι φανερό ότι θα προτιμηθεί η “ενδιάμεση κατάσταση”, αφού μπορεί να βοηθήσει ακριβώς όσο πρέπει την ανταλλαγή φορέων που θα συμμετέχουν στην υβριδοποίηση. Στη συνέχεια, στο χρυσό SPE με redox pair συγκέντρωσης 25 mM τοποθετούνται με πιπέτα οι FC probe αλυσίδες, όπου και αυξάνεται η κορυφή του ρεύματος, και ύστερα προστίθενται και οι FC target αλυσίδες, ώστε να λάβει χώρα η υβριδοποίηση του DNA και το ρεύμα πέφτει δραματικά (Εικόνα 4.13).



Εικόνα 4.12: Γραφήματα κυκλικής βολταμετρίας ενός χρυσού SPE μόνο με redox pair διαφορετικών συγκεντρώσεων.



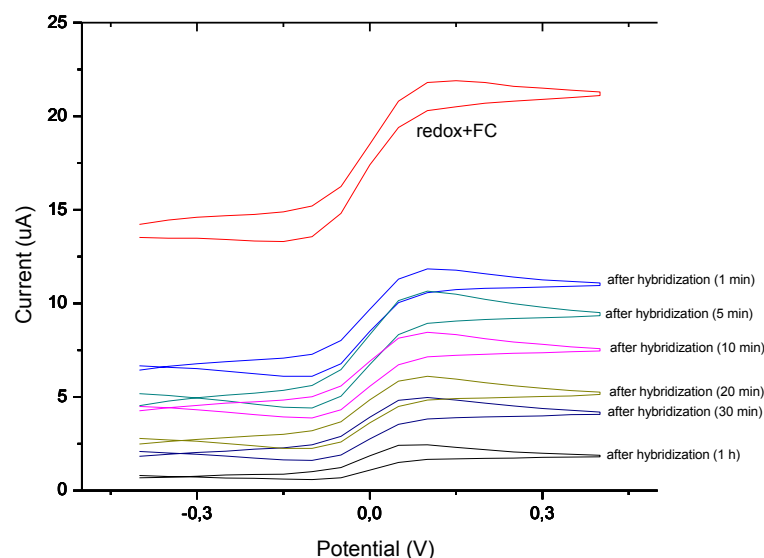
Εικόνα 4.13: Ανίχνευση της υβριδοποίησης μέσω της πτώσης του ρεύματος.

Η αγωγιμότητα σε πολικές ομοιοπολικές ενώσεις εμφανίζεται όταν αυτές διαλυθούν και αναμειχθούν με άλλες πολικές ομοιοπολικές ενώσεις, όπως το νερό. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα ορισμένα πολικά μόρια μίας από τις ενώσεις να έλκουν και να προσαρτούν τμήματα του άλλου μορίου, ώστε να παράγονται ιόντα και άρα εμφανίζεται αγωγιμότητα. Στην περίπτωση που μελετάται, οι αζωτούχες βάσεις των νουκλεϊκών οξέων είναι ηλεκτρενεργές ουσίες. Το κάθε άτομο του αζώτου που διαθέτουν έχει ένα ηλεκτρόνιο το οποίο με το υδρογόνο της απέναντι βάσης της συμπληρωματικής αλυσίδας θα δημιουργήσουν από κοινού ένα ζεύγος ηλεκτρονίων και άρα ένα δεσμό υδρογόνου, που καταλήγει στη δημιουργία μίας δίκλωνης αλυσίδας. Άρα σε αυτή τη δίκλωνη αλυσίδα δεν περισσεύουν επιπλέον ηλεκτρόνια και η αγωγιμότητά της είναι όσο και η αγωγιμότητα των μορίων του redox pair που υπάρχουν στο ρυθμιστικό διάλυμα.

Αυτό όμως δεν ισχύει στην περίπτωση της μονόκλωνης. Τα περισσευούμενα ηλεκτρόνια προσφέρονται στα μόρια του redox pair, με αποτέλεσμα αυτά να γίνουν ανιόντα, ενώ η μονόκλωνη αλυσίδα κατιόν. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, όπου υπάρχουν ιόντα εμφανίζεται αγωγιμότητα. Άρα, το διάλυμα το redox pair μαζί με τις FC probe αλυσίδες είναι αγωγίμο, δηλαδή έχει μικρότερη αντίσταση και, από το νόμο του Ohm, προκύπτει ότι θα χαρακτηρίζεται από μεγαλύτερο ρεύμα.

Όταν εισαχθεί και η συμπληρωματική της, για να υβριδοποιηθούν, η μονόκλωνη λαμβάνει πίσω τα ηλεκτρόνια που έδωσε στα μόρια του redox pair και σχηματίζει με τη συμπληρωματική της μία δίκλωνη αλυσίδα, λόγω της δημιουργίας των δεσμών υδρογόνου, η οποία είναι μη πολωμένη (έχει μηδενική ηλεκτρική διπολική ροπή καθώς οι δύο κλώνοι είναι προσανατολισμένοι σε κατεύθυνση που αναιρούν ο ένας τη διπολική ροπή του άλλου). Αυτό όμως έχει ως συνέπεια τη μείωση των ιόντων, οπότε πέφτει η αγωγιμότητα του διαλύματος και το σύστημα σχεδόν επανέρχεται στην αρχική του θέση ισορροπίας. Στο διάγραμμα το γεγονός αυτό φαίνεται από τη μείωση του ρεύματος, η οποία μεταφράζεται σε αύξηση της αντίστασης και άρα πτώση της αγωγιμότητας.

Τέλος, στην Εικόνα 4.14 γίνονται επαναλαμβανόμενες μετρήσεις κυκλικής βολταμετρίας μετά από ορισμένο διάστημα όπου η υβριδοποίηση είχε ήδη συμβεί. Το γεγονός ότι το ρεύμα συνεχίζει να πέφτει δεν είναι επιθυμητό. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε εσωτερικές ηλεκτροχημικές αντιδράσεις και έτσι η ανταλλαγή φορέων συνεχίζεται και ύστερα από αρκετούς κύκλους μετρήσεων. Αυτή η μέτρηση είναι πολύ σημαντική όσον αφορά τις μετρήσεις που περιγράφονται στο επόμενο κεφάλαιο για την ανίχνευση ιόντων Pb(II), καθώς χωρίς να είχε προηγηθεί αυτή, θα είχαν ληφθεί λανθασμένα συμπεράσματα.



Εικόνα 4.14: Μετρήσεις κυκλικής βολταμετρίας ύστερα από ορισμένο διάστημα που έγινε η υβριδοποίηση DNA.

4.4 Αναφορές Κεφαλαίου

1. S. R. Mikkelsen, "Electrochemical biosensors for DNA sequence detection", *Electroanalysis*, **8**, 15–19 (1996).
2. J. Wang, M. Ozsoz, X. Cai, G. Rivas, H. Shiraishi, D. H. Grant, M. Chicharro, J. Fernández, E. Palecek, "Interactions of antitumor drug daunomycin with DNA in solution and at the surface", *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, **45**, 33–40 (1998).
3. A. Erdem, K. Kerman, B. Meric, U. S. Akarca, M. Ozsoz, "Electrochemical biosensor for the detection of short DNA sequences related to the hepatitis B virus", *Electroanalysis*, **11**, 586–587 (1999).
4. A. Erdem, B. Meric, K. Kerman, T. Dalbasti, M. Ozsoz, "Detection of interaction between metal complex indicator and DNA by using electrochemical biosensor", *Electroanalysis*, **11**, 1372–1376 (1999).
5. K. M. Millan, S. R. Mikkelsen, "Sequence-selective biosensor for DNA based on electroactive hybridization indicators", *Analytical Chemistry*, **65**, 2317–2323 (1993).
6. K. M. Millan, S. Saraullo, S. R. Mikkelsen, "Voltammetric DNA biosensor for cystic fibrosis based on a modified carbon paste electrode", *Analytical Chemistry*, **66**, 2943–2948 (1994).
7. M. E. Napier, C. R. Loomis, M. F. Sistare, J. Kim, A. E. Eckhardt, H. H. Thorp, "Probing biomolecule recognition with electron transfer: electrochemical sensors for DNA hybridization", *Bioconjugate Chemistry*, **8**, 906–913 (1997).

8. I. V. Yang, P. A. Ropp, H. H. Thorp, "Toward electrochemical resolution of two genes on one electrode: using 7-deaza analogues of guanine and adenine to prepare PCR products with differential redox activity", *Analytical Chemistry*, **74**, 347–354 (2002).
9. S. Hason, J. Dvorak, F. Jelen, V. Vetterl, "Interaction of DNA with echinomycin at the mercury electrode surface as detected by impedance and chronopotentiometric measurements", *Talanta*, **56**, 905–913 (2002).
10. F. Jelen, A. Erdem, E. Palecek, "Cyclic voltammetry of echinomycin and its interaction with double-stranded and single-stranded DNA adsorbed at the electrode", *Bioelectrochemistry*, **55**, 165–167 (2002).
11. A. Erdem, M. Ozsoz, "Interaction of the anticancer drug epirubicin with DNA", *Analytica Chimica Acta*, **437**, 107–114 (2001).
12. A. Erdem, K. Kerman, B. Meric, U. S. Akarca, M. Ozsoz, "Novel hybridization indicator methylene blue for the electrochemical detection of short DNA sequences related to the hepatitis B virus", *Analytica Chimica Acta*, **422**, 139–149 (2000).
13. B. Meric, K. Kerman, D. Ozkan, P. Kara, S. Erensoy, U. S. Akarca, M. Mascini, M. Ozsoz, "Electrochemical DNA biosensor for the detection of TT and hepatitis B virus from PCR amplified real samples by using methylene blue", *Talanta*, **56**, 837–846 (2002).
14. K. Kerman, D. Ozkan, P. Kara, B. Meric, J. J. Gooding, M. Ozsoz, "Voltammetric determination of DNA hybridization using methylene blue and self-assembled alkanethiol monolayer on Au electrodes", *Analytica Chimica Acta*, **462**, 39–47 (2002).
15. D. Ozkan, P. Kara, K. Kerman, B. Meric, A. Erdem, F. Jelen, P. E. Nielsen, M. Ozsoz, "DNA and PNA sensing on mercury and carbon electrodes by using methylene blue as an electrochemical label", *Bioelectrochemistry*, **58**, 119–126 (2002).
16. D. Ozkan, A. Erdem, P. Kara, K. Kerman, J. J. Gooding, P. E. Nielsen, M. Ozsoz, "Electrochemical detection of hybridization using peptide nucleic acids and methylene blue on self-assembled alkanethiol monolayer modified Au electrodes", *Electrochemistry Communications*, **4**, 796–802 (2002).
17. P. Kara, K. Kerman, D. Ozkan, B. Meric, A. Erdem, Z. Ozkan, M. Ozsoz, "Electrochemical genosensor for the detection of interaction between methylene blue and DNA", *Electrochemistry Communications*, **4**, 705–709 (2002).
18. T. de Lumley–Woodyear, C. N. Campbell, E. Freeman, A. Freeman, G. Georgiou, A. Heller, "Rapid amperometric verification of PCR amplification of DNA", *Analytical Chemistry*, **71**, 535–538 (1999).

19. C. N. Campbell, D. Gal, N. Cristler, C. Banditrat, A. Heller, "Enzyme-amplified amperometric sandwich test for RNA and DNA", *Analytical Chemistry*, **74**, 158–162 (2002).
20. M. Dequaire, A. Heller, "Screen printing of nucleic acid detecting carbon electrodes", *Analytical Chemistry*, **74**, 4370–4377 (2002).
21. Y. Zhang, H.–H. Kim, N. Mano, M. Dequaire, A. Heller, "Simple enzyme-amplified amperometric detection of a 38-base oligonucleotide at 20 pmol l⁻¹ concentration in a 30 μ L droplet", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **374**, 1050–1055 (2002).
22. Y. Zhang, H.–H. Kim, A. Heller, "Enzyme-amplified amperometric detection of 3000 copies of DNA in a 10 μ L droplet at 0.5 fM concentration", *Analytical Chemistry*, **75**, 3267–3269 (2003).
23. M. I. Pividori, A. Merkoçi, S. Alegret, "Classical dot–blot format implemented as an amperometric hybridization genosensor", *Biosensors and Bioelectronics*, **16**, 1133–1142 (2001).
24. T. J. Huang, M. Liu, L. D. Knight, W. W. Grody, J. F. Miller, C.–M. Ho, "An electrochemical detection scheme for identification of single nucleotide polymorphisms using hairpin-forming probes", *Nucleic Acids Research*, **30**, e55 (2002).
25. F. Patolsky, Y. Weizmann, E. Katz, I. Willner, "Magnetically amplified DNA assays (MADA): sensing of viral DNA and single-base mismatches by using nucleic acid modified magnetic particles", *Angewandte Chemie International Edition in English*, **42**, 2372–2376 (2003).
26. J. Wang, D. Xu, A. Erdem, R. Polsky, M. A. Salazar, "Genomagnetic electrochemical assays of DNA hybridization", *Talanta*, **56**, 931–938 (2002).
27. E. Palecek, R. Kizek, L. Havran, S. Billova, M. Fojta, "Electrochemical enzyme-linked immunoassay in a DNA hybridization sensor", *Analytica Chimica Acta*, **469**, 73–83 (2002).
28. G. Evtugyn, A. Mingaleva, H. Budnikov, E. Stoikova, V. Vinter, S. Eremin, "Affinity biosensors based on disposable screen-printed electrodes modified with DNA", *Analytica Chimica Acta*, **479**, 125–134 (2003).
29. F. Patolsky, Y. Weizmann, I. Willner, "Redox-active nucleic-acid replica for the amplified bioelectrocatalytic detection of viral DNA", *Journal of the American Chemical Society*, **124**, 770–772 (2002).
30. F. Patolsky, A. Lichtenstein, I. Willner, "Detection of single-base DNA mutations by enzyme-amplified electronic transduction", *Nature Biotechnology*, **19**, 253–257 (2001).
31. K. M. Hansen, T. Thundat, "Microcantilever biosensors", *Methods*, **37**, 57–64 (2005).
32. R. McKendry, J. Zhang, Y. Arntz, T. Strunz, M. Hegner, H. P. Lang, M. K. Baller, U. Certa, E. Meyer, H. J. Güntherodt, C. Gerber, "Multiple label-free

- biodetection and quantitative DNA-binding assays on a nanomechanical cantilever array”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 9783–9788 (2002).
33. A. Zebda, M. Labeau, J. P. Diard, V. Lavalley, V. Stambouli, “Electrical resistivity dependence of semi-conductive oxide electrode on the label-free electrochemical detection of DNA”, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **144**, 176–182 (2010).
 34. V. Tsouti, C. Boutopoulos, P. Andreakou, M. Ioannou, I. Zergioti, D. Goustouridis, D. Kafetzopoulos, D. Tsoukalas, P. Normand, S. Chatzandroulis, “Detection of DNA mutations using a capacitive micro-membrane array”, *Biosensors and Bioelectronics*, **26**, 1588–1592 (2010).
 35. M. Colina, P. Serra, J. M. Fernández-Pradas, L. Sevilla, J. L. Morenza, “DNA Deposition through Laser Induced Forward Transfer”, *Biosensors and Bioelectronics*, **20**, 1638–1642 (2005).
 36. M. H. Manning, S. Harvey, P. Galvin, G. Redmond, “A versatile multi-platform biochip surface attachment chemistry”, *Material Science and Engineering: C*, **23**, 347–351 (2003).
 37. M. Elbs, R. Brock, “Determination of binding constants on microarrays with confocal fluorescence detection”, *Analytical Chemistry*, **75**, 4793–4800 (2003).
 38. Μ. Χατζηπέτρου, “Ενεργοποίηση βιοαισθητήρων και εκτύπωση βιολογικού υλικού με laser”, Μεταπτυχιακή Εργασία, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Σχολή Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών Επιστημών, Αθήνα (2010).
 39. J. Fritz, “Cantilever biosensors”, *Analyst*, **133**, 855–863 (2008).
 40. A. B. Steel, T. M. Herne, M. J. Tarlov, “Electrochemical quantitation of DNA immobilized on gold”, *Analytical Chemistry*, **70**, 4670–4677 (1998).
 41. D. Sethi, A. Kumar, K. C. Gupta, P. Kumar, “A facile method for the construction of oligonucleotide microarrays”, *Bioconjugate Chemistry*, **19**, 2136–2143 (2008).
 42. G. Tsekenis, M. Chatzipetrou, J. Tanner, S. Chatzandroulis, D. Thanos, D. Tsoukalas, I. Zergioti, “Surface functionalization studies and direct laser printing of oligonucleotides toward the fabrication of a micromembrane DNA capacitive biosensor”, *Sensors And Actuators B: Chemical*, **175**, 123–131 (2012).
 43. Ν. Ζυγούρης, “Ηλεκτρικός χαρακτηρισμός Οξειδίων του Πυριτίου ανεπτυγμένων είτε θερμικά είτε με τη μέθοδο Ιοντοβολής”, Διπλωματική Εργασία, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Σχολή Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών Επιστημών, Αθήνα (2010).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ ΑΠΤΙΝΩΝ ΓΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΙΟΝΤΩΝ Pb (II)

5.1 Περιβαλλοντική Μόλυνση

Η περιβαλλοντική μόλυνση είναι ένα από τα ζητήματα υψίστης σημασίας του σημερινού κόσμου. Ως εκ τούτου, υπάρχει μία αυξανόμενη ανάγκη για αποτελεσματικά εργαλεία ικανά να εκτιμήσουν τους κινδύνους που προέρχονται από το μεγάλο αριθμό των ρύπων που ελευθερώνονται στο περιβάλλον. Ο κλάδος της περιβαλλοντικής τοξικολογίας αναφέρεται στην ποιοτική και ποσοτική μελέτη των δυσμενών επιπτώσεων από ανθρωπογενείς και φυσικούς στρεσογόνους παράγοντες. Οι πρώτες υδρόβιες οικοτοξικολογικές μελέτες βασίστηκαν σε μετρήσεις οξείας τοξικότητας σπονδυλωτών. Ωστόσο, αυτές οι μέθοδοι υφίστανται κάποια προβλήματα τυποποίησης, είναι δαπανηρές, χρονοβόρες και επιπλέον, συνδέονται με ζητήματα ηθικής. Έτσι, αναπτύχθηκαν νέες τεχνολογίες για υδρόβιες οικοτοξικολογικές μελέτες.

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. Τα πιο επικίνδυνα είναι τα Cd^{2+} , Pb^{2+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} , Ag^+ , Cr^{6+} , Zn^{2+} και Cu^{2+} . Η δηλητηρίαση από βαρέα μέταλλα είναι μία επικίνδυνη περιβαλλοντική ασθένεια που μπορεί να έχει δια βίου δυσμενείς επιπτώσεις στην υγεία ακόμη και όταν βρίσκονται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Ευαίσθητα θύματα αυτής της έκθεσης είναι μικρά παιδιά ειδικά σε μη ανεπτυγμένες χώρες [1]. Ακολουθεί πίνακας όπου δίνονται τα όρια τοξικότητας των μετάλλων στη θάλασσα.

Μέταλλο	mg/l στη θάλασσα	Μέταλλο	mg/l στη θάλασσα
Mg	1.35×10^3	Cu	0.003
Ca	400	U	0.003
K	380	Mn	0.002
Sr	8.10	Co	2.7×10^{-4}
Li	0.18	Cd	1.1×10^{-4}
Al	0.01	Cr	5×10^{-5}
Fe	0.01	Hg	3×10^{-5}
Zn	0.01	Pb	3×10^{-5}
Ni	0.0054		

Πίνακας 5.1: Όρια τοξικότητας στη θάλασσα [2].

Οι πηγές έκθεσης στα βαρέα μέταλλα, και συγκεκριμένα στο μόλυβδο, διαφέρουν μεταξύ των χωρών αλλά και εντός αυτών σύμφωνα με τις προηγούμενες και τωρινές χρήσεις τους. Η κυριότερη πηγή μετάλλων στο περιβάλλον είναι το έδαφος της γης όπου βρίσκονται όλα σχεδόν τα μέταλλα και τα οποία με διάφορους γεωχημικούς κύκλους και ανθρωπογενείς επεμβάσεις ανακατανέμονται στα διάφορα περιβαλλοντικά διαμερίσματα. Η βιομηχανική, τεχνολογική και γεωργική

δραστηριότητα αποτελούν σημαντικούς παράγοντες ρύπανσης από μέταλλα, από την απόρριψη βιομηχανικών αποβλήτων, μεταλλευτικές εκμεταλλεύσεις, εμπλουτισμό και παραγωγή μεταλλικών αντικειμένων, χρήση λιπασμάτων, κλπ. Η καύση στερεών καυσίμων είναι μία άλλη πηγή εκπομπής μετάλλων στην ατμόσφαιρα που τελικά εναποτίθενται στο έδαφος και τα νερά [2]. Οι πηγές μόλυνσης από μόλυβδο ποικίλουν, όπως από ιστορικά κτίρια, από την ανακύκλωση προϊόντων μολύβδου ή/και από την κατασκευή νέων τέτοιων προϊόντων. Στις χώρες που έχουν απαγορεύσει τη μολυβδόχο βενζίνη, το επίπεδο συγκέντρωσης μολύβδου στο αίμα του μέσου πληθυσμού μειώθηκε ραγδαία. Ωστόσο, σε πολλές αναπτυσσόμενες χώρες, παρόλο που η μολυβδόχος βενζίνη δεν χρησιμοποιείται πλέον, πολλά παιδιά και εργαζόμενοι εκτίθενται σε διαφεύγουσες εκπομπές και απόβλητα εξόρυξης. Τελευταία, μάλιστα, προέκυψαν και απροσδόκητες απειλές από την ανεξέλεγκτη απόρριψη ηλεκτρονικών και παιδικών παιχνιδιών μολυσμένα με μόλυβδο [1].

Ο μόλυβδος δεν αφομοιώνεται, λόγω αδυναμίας των οργανισμών να τον “αναγνωρίσουν”, ούτε όμως αποβάλλεται από το σύστημα των οργανισμών, κατά συνέπεια συσσωρεύεται και μάλιστα εκλεκτικά σε ορισμένους ιστούς (συκώτι, νεφρά) εμφανίζοντας έτσι υψηλές συγκεντρώσεις. Οι κυριότερες δράσεις του είναι και καρκινογόνες. Η καρκινογόνος δράση του μολύβδου έχει μελετηθεί με μεγάλο αριθμό τοξικολογικών ερευνών και έχει βρεθεί ότι ο μηχανισμός της άμεσης προσθήκης σε κυτταρικό DNA (που προκαλεί μεταλλάξεις) είναι δευτερεύουσας σημασίας, σε σχέση με τη δράση μέσω οξειδωτικών βλαβών στο DNA που προκαλούνται από την παραγωγή ελευθέρων ριζών [3].

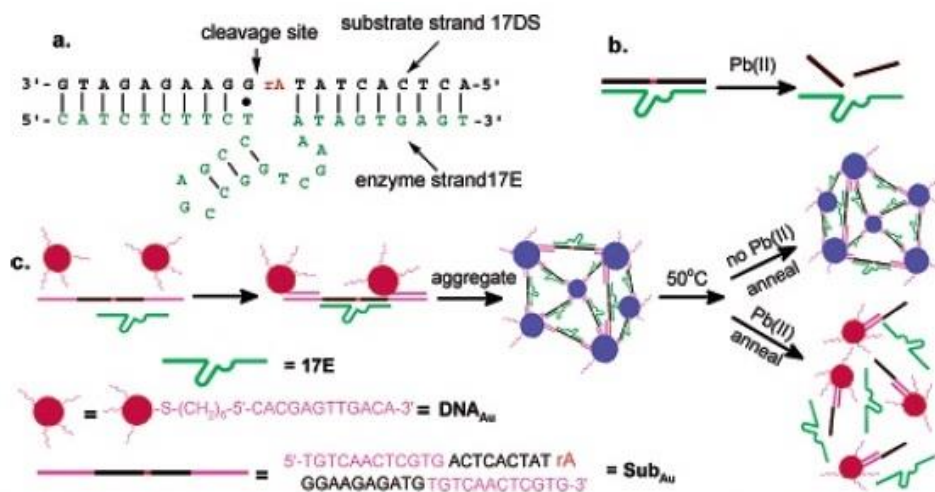
Ορισμένα βιολογικά εργαλεία, όπως οι βιοαισθητήρες, παρέχουν στους ερευνητές συστήματα ανίχνευσης για τη σηματοδότηση πιθανής ζημιάς στο περιβάλλον. Η έγκαιρη αναγνώριση θα αποτρέψει τυχόν βλάβες στα περιβαλλοντικά πλέγματα. Στην ιδανική περίπτωση, τα σήματα έγκαιρης προειδοποίησης στα οικοσυστήματα με τη χρήση συστημάτων ανίχνευσης δεν θα δώσουν μόνο πληροφορίες για τα αρχικά επίπεδα της ζημιάς αλλά και απαντήσεις όσον αφορά την ανάπτυξη στρατηγικών ελέγχου και προληπτικών μέτρων. Οι βιοαισθητήρες έχουν, ως επί των πλείστων, σχεδιαστεί για αναλύσεις ρουτίνας, όπως ο ποιοτικός έλεγχος. Η ανάπτυξη αυτών των βιοαισθητήρων αποτελεί μία διεπιστημονική προσπάθεια και πιθανότατα ο αντίκτυπός τους να είναι ευρείας κλίμακας. Οι βιοαισθητήρες βοηθούν στην ανίχνευση αναδυόμενων ρύπων, όπως τα βαρέα μέταλλα που προαναφέρθηκαν, διάφορα βιοκτόνα, ρυπογόνες ουσίες, βλαβεροί μικροοργανισμοί και διάφορες πολυαρωματικές ενώσεις [4].

5.2 Απτίνες και Περιβαλλοντικές Εφαρμογές

Οι απτίνες είναι τεχνητά κατασκευασμένα ολιγονουκλεοτίδια (DNA/RNA) ή πεπτίδια, τα οποία συνδέονται με ένα συγκεκριμένο βιομόριο. Οι απτίνες είναι

δηλαδή αλληλουχίες DNA ή RNA των οποίων η επιλογή προκύπτει από συνδυαστικές βιβλιοθήκες μέσω της “in vitro” μεθόδου SELEX. Αυτές προσδένονται στα μόρια/στόχους με μεγάλη συνάφεια και επιλεκτικότητα και οι στόχοι αυτοί είναι συνήθως μεταλλικά ιόντα, ναρκωτικές ουσίες, μικρές οργανικές ενώσεις, μεταβολίτες, πρωτεΐνες, ακόμα και κύτταρα. Οι απτίνες αποτελούν μία εξαιρετική εναλλακτική αντί για αντισώματα, λόγω της ευκολίας τους για “in vitro” παραγωγή, αποθήκευση και τροποποίηση, του μικρού τους μεγέθους, της χημικής τους απλότητας, της μακροπρόθεσμης σταθερότητάς τους, της ποικιλίας των στόχων τους και της ανθεκτικότητάς τους σε ενδεχόμενη αποδόμηση [5]. Έχουν χρησιμοποιηθεί σε αρκετούς τύπους βιοαισθητήρων, εκ των οποίων ξεχωρίζουν οι ηλεκτροχημικοί, οι αισθητήρες φθορισμού και σε αισθητήρες μικροδοκών.

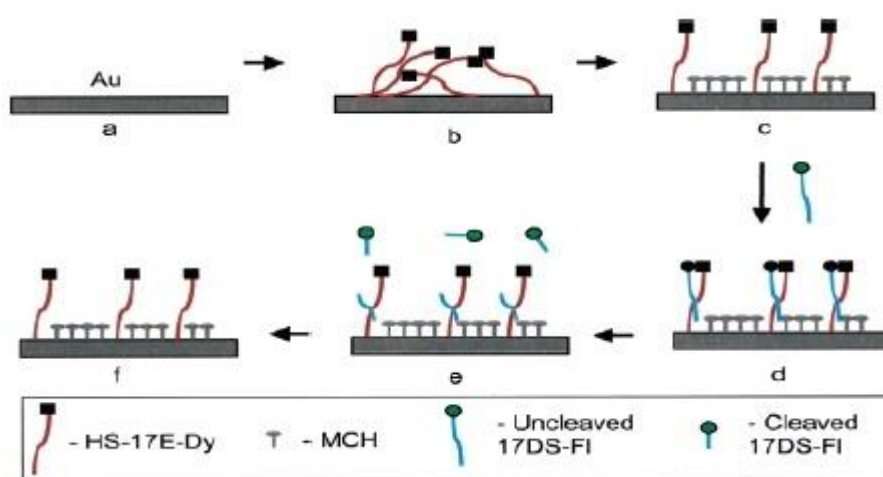
Τα περισσότερα από τα ερευνητικά άρθρα τα οποία έχουν δημοσιευθεί αναφέρονται στην πειραματική αναγνώριση απτινών, οι οποίες προσδένονται στις συγκεκριμένες ουσίες και δεν προχωρούν στην πρακτική εφαρμογή των ευρεθέντων αλληλουχιών. Παρόλα αυτά υπάρχουν και εργασίες οι οποίες παρουσιάζουν αποτελέσματα από την εφαρμογή στην πράξη διατάξεων αισθητήρων στις οποίες το μόριο ανιχνευτής είναι είτε μία DNA ή μία RNA απτίνη. Για παράδειγμα η ανίχνευση σε συγκεντρώσεις ως και 0.1 nM της εστραδιόλης, μιας φυλετικής ορμόνης, επιτεύχθηκε μέσω ενός 76-mer DNA ακινητοποιημένου στην επιφάνεια χρυσών ηλεκτροδίων με την χρήση αβιδίνης – βιοτίνης και κυκλικής βολταμετρίας [6].



Εικόνα 5.1: Ανίχνευση μολύβδου με την χρήση DNA ενζύμων. (a, b) Η αλληλουχία 17E λειτουργεί ως το ένζυμο το οποίο διασπά την αλληλουχία υπόστρωμα 17DS παρουσία του μετάλλου. (c) Για την μέτρηση χρησιμοποιήθηκαν νανοσωματίδια χρυσού τροποποιημένα με ένα 12μερές συμπληρωματικό των επιμηκύνσεων στο 3' και 5' άκρο της αλληλουχίας 17DS. Εν τη απουσία του μολύβδου τα νανοσωματίδια δημιουργούν συμπλέγματα μπλε χρώματος, εν αντιθέσει με το κόκκινο χρώμα που εμφανίζεται όταν ο μολύβδος είναι παρών [7].

Εξαιρετικό ενδιαφέρον επίσης παρουσιάζει και η χρήση DNA ή RNA ενζύμων (DNAzyme, RNAzyme) για την ανίχνευση μετάλλων, τα οποία παρουσιάζουν μια ρυθμιζόμενη από ιόντα μετάλλου δραστηριότητα [8]. Ένα πολύ χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η ανίχνευση μολύβδου με την χρήση DNA ενζύμων [7]. Το σύστημα το οποίο χρησιμοποιήθηκε αποτελούνταν από μια ενζυμική αλληλουχία και μια αλληλουχία η οποία είχε το ρόλο του υποστρώματος, παρουσία δε του ιόντος η ενεργοποιημένη αλληλουχία είχε την δυνατότητα να διασπάσει υδρολυτικά την αλληλουχία – υπόστρωμα (Εικόνα 5.1). Συγκεκριμένα για τα νουκλεϊκά οξέα που δρουν ως ένζυμα, τα ριβο – και δεοξυ – ένζυμα (ribo – and deoxy – zymes), δεν ανήκουν στις απτίνες καθώς οι τελευταίες δεν έχουν καταλυτικές ιδιότητες αλλά εξετάζονται σε αυτή την αναφορά καθώς πρόκειται για νουκλεϊκά οξέα τα οποία έχουν την δυνατότητα να αναγνωρίσουν με μεγάλη ακρίβεια ένα μόριο πλην των συμπληρωματικών τους νουκλεοτιδίων, όπως ακριβώς και οι απτίνες.

Πέραν των φυσικών ριβο – και δεοξυ – ενζύμων πολλές νέες εφαρμογές των τελευταίων έχουν προκύψει με την τροποποίηση των υφιστάμενων ενζύμων καθώς και με την επιλογή νέων μέσω in vitro διαδικασιών. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτών, αποτελεί η χρήση ενός δεοξυ – ενζύμου για την ανίχνευση και πάλι του μολύβδου [9]. Οι αλληλουχίες του ένζυμου και του υποστρώματος είναι παρόμοιες με εκείνες που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση του συγκεκριμένου μετάλλου με την χρήση συμπλεγμάτων νανοσωματιδίων, όπως περιγράφηκε προηγουμένως. Εν αντιθέσει, η ενζυμική αλληλουχία ήταν ακινητοποιημένη σε ένα υπόστρωμα χρυσού ενώ η αλληλουχία υπόστρωμα είχε τροποποιηθεί με ένα φθορίζων μόριο. Τυχόν ανίχνευση μολύβδου κατέληγε στην διάσπαση του υποστρώματος και στη μείωση του σήματος φθορισμού (Εικόνα 5.2).



Εικόνα 5.2: Αναπαράσταση (b) της ακινητοποίησης τροποποιημένων μεθειόλη ενζυμικών ακολουθιών, (c) της αφαίρεσης μη συγκεκριμένων προσδέσεων με την χρήση μερκαπτοαιθανόλης, (d) της υβριδοποίησης με την αλληλουχία/υπόστρωμα και (e) της κατάλυσης του τελευταίου παρουσία μολύβδου [9].

Είναι φανερό ότι τα ριβο – και δεοξυ – ένζυμα έχουν μελετηθεί εκτενώς όσον αφορά την ανίχνευση μολύβδου, όμως υπάρχουν και ερευνητικές εργασίες οι οποίες επικεντρώθηκαν στην ανίχνευση μετάλλων με την χρήση ανάλογων διατάξεων, όπως του κοβαλτίου που αναφέρθηκε προηγουμένως αλλά και του ψευδάργυρου [10] και του χαλκού [11]. Επιπλέον, οι διατάξεις αισθητήρων απτινών έχουν χρησιμοποιηθεί και για την ανίχνευση παραγόντων βιολογικού/τρομοκρατικού πολέμου, όπως βακτηρίων, τοξινών, ιών κ.ά.. Για παράδειγμα, έγινε χρήση μαγνητικών σφαιριδίων τόσο για την επιλογή όσο και για την αναγνώριση απτινών ενάντια σε σπόρους του βακίλου του άνθρακα [12], της τοξίνης της χολέρας και της εντεροτοξίνης β του σταφυλόκοκκου, οι δε προαναφερθέντες αναλύτες ανιχνεύθηκαν σε συγκεντρώσεις της κλίμακας των pM [13].

Στην κατηγορία των φυτικών τοξίνων, έχουν δημοσιευθεί δύο ερευνητικές εργασίες, οι οποίες αφορούν την ρικίνη [14] και την αβρίνη [15]. Μετά από την εισπνοή τους μπορεί να εμφανιστεί τοπικός ερεθισμός του αναπνευστικού μέσα σε μερικές ώρες, ακολουθούμενος από πιο σοβαρές πνευμονικές βλάβες με ανεπάρκεια, αιμόπτυση έως και θάνατο. Για την μεν πρώτη επιλέχθηκε μια RNA απτίνη ενώ για την αβρίνη χρησιμοποιήθηκε μια DNA απτίνη.

Τέλος, όσον αφορά την χρήση των διατάξεων απτινών για την ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών και τοξινών στα τρόφιμα κατασκευάστηκαν αισθητήρες για την ανίχνευση δύο βακτηρίων τα οποία μεταδίδονται μέσω της κατανάλωσης ωμού ή μη καλά μαγειρεμένου κρέατος, του *Campylobacter jejuni* [16] και του *Francisella tularensis* [17], όπως και για την πρωτεΐνη πρίον PrP [18]. Για την παρεμπόδιση της δράσης τους, επιλέχθηκε μια RNA απτίνη η οποία με την πρόσδεση σε μια πρωτεΐνη της σαλμονέλας (*Salmonella enterica* serovar Typhi) την εμποδίζει να εισέρθει στον ανθρώπινο οργανισμό.

5.3 Βιοαισθητήρες για Ανίχνευση Ιόντων Βαρέων Μετάλλων

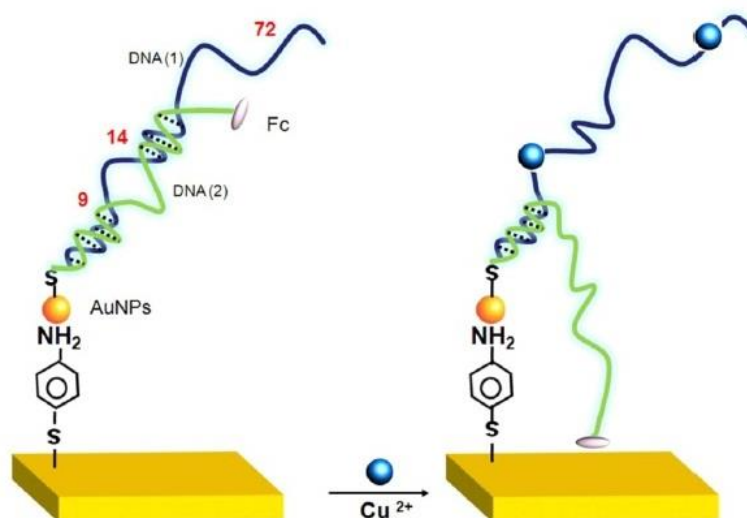
Πολλές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί τα τελευταία χρόνια για να βρεθούν τρόποι ανίχνευσης των ιόντων βαρέων μετάλλων με διάφορες τεχνικές. Πολλές από αυτές έχουν επικεντρωθεί στη δυνατότητα ανίχνευσης αυτών μέσω της διάσπασης της δίκλωνης αλυσίδας του DNA στους επιμέρους κλώνους της, αλλά και σε παραλλαγές αυτής.

5.3.1 Ηλεκτροχημικοί Αισθητήρες

Οι Yang et al. αναφέρουν μία στρατηγική ανάπτυξης ανίχνευσης Pb^{2+} με τη χρήση ενός ειδικού DNAzyme ενεργοποιημένου από νανοσωματίδια χρυσού (AuNPs) [19]. Αυτός ο αισθητήρας περιέχει πάνω στο ηλεκτρόδιό του μία

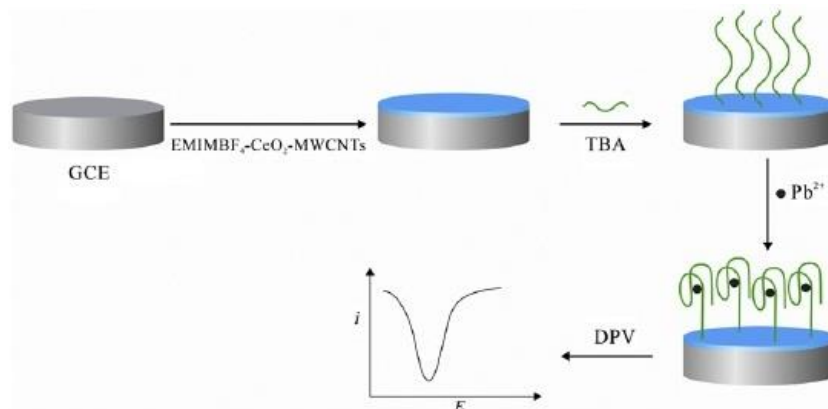
ακίνητοποιημένη μονόκλωνη αλυσίδα DNA 12 βάσεων καθώς και μία ελεύθερη δίκλωνη αλυσίδα (dsDNA) εκ της οποίας ο ένας κλώνος είναι το σύμπλοκο DNAzyme – AuNPs. Η ομάδα παρατήρησε ότι μόνο με την παρουσία του Pb^{2+} , το σύμπλοκο dsDNA – AuNPs μπορεί να διασπαστεί και εν συνεχεία ο κλώνος/σύμπλοκο DNAzyme – AuNPs να υβριδοποιηθεί με την ακίνητοποιημένη πάνω στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου μονόκλωνη αλυσίδα. Το DNAzyme ειδικό για ανίχνευση Pb^{2+} ως στοιχείο αναγνώρισης επιδεικνύει υψηλή επιλεκτικότητα, ενώ το όριο ανίχνευσης είναι 0.028 nM, χαμηλότερο από οποιονδήποτε άλλον ηλεκτροχημικό αισθητήρα στην αγορά.

Οι Chen et al. παρουσίασαν έναν υψηλής ευαισθησίας και επιλεκτικότητας ηλεκτροχημικό βιοαισθητήρα με απτίνες για την ανίχνευση Cu^{2+} ο οποίος επίσης αξιοποιούσε AuNPs [5]. Τα AuNPs ήταν προσδεμένα στο ηλεκτρόδιο του αισθητήρα και παρείχαν μία μεγάλη έκταση επιφάνειας για την ακινητοποίηση μεγάλου αριθμού απτίνων. Σε αυτήν ακριβώς την επιφάνεια, η ομάδα ακινητοποίησε το 3' άκρο της ενζυμικής ακολουθίας της απτίνης της οποίας το 5' άκρο επισημάνθηκε με έναν οξειδοαναγωγικό δείκτη, το φερροκένιο (Fc), ενώ η αλληλουχία του άλλου κλώνου ήταν μερικώς συμπληρωματική, με αποτέλεσμα να μην υπάρχουν δισουλφιδικοί δεσμοί μεταξύ των δύο ολιγονουκλεοτιδίων σε συγκεκριμένη περιοχή της απτίνης (Εικόνα 5.3). Απουσία του Cu^{2+} , το δίκλωνο σύμπλοκο DNA ήταν σχετικά άκαμπτο και κατά πάσα πιθανότητα εμπόδιζε το δείκτη Fc να πλησιάσει την επιφάνεια του ηλεκτροδίου και έτσι, χωρίς την ανταλλαγή ηλεκτρονίων μεταξύ δείκτη και ηλεκτροδίου, δεν παρατηρήθηκε ρεύμα. Όμως, με την πρόσδεση του αναλύτη, η απτίνη υπέστη αυτοδιάσπαση σε δύο διαφορετικές περιοχές και άρα προέκυψαν τρία τμήματα από το κομματιασμένο πλέον σύμπλοκο. Αυτό οδηγεί σε πλησίασμα του δείκτη προς το ηλεκτρόδιο και την εμφάνιση ρεύματος, το οποίο αυξήθηκε ανάλογα με τη συγκέντρωση του Cu^{2+} μέσα στο εύρος από 0.1 nM στα 10 μ M, με όριο ανίχνευσης στα 0.1 pM.



Εικόνα 5.3: Ο ηλεκτροχημικός αισθητήρας για ανίχνευση Cu^{2+} , όπου το ένα άκρο της ενζυμικής αλληλουχίας του aptazyme του έχει επισημανθεί με Fc [5].

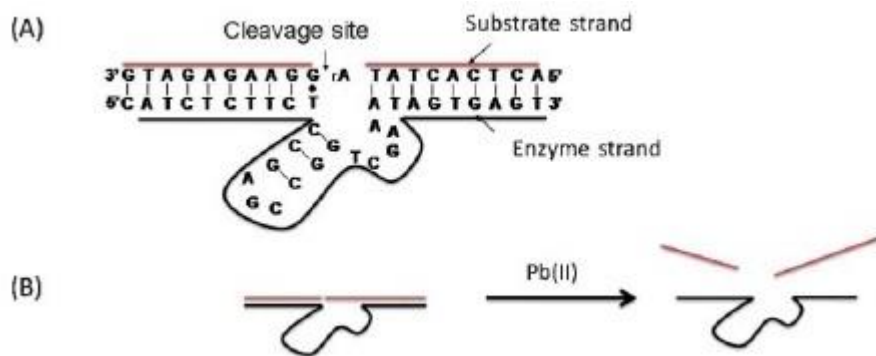
Τέλος, οι Li et al. σχεδίασαν έναν ηλεκτροχημικό αισθητήρα για τον προσδιορισμό Pb^{2+} με βάση μία απτήνη η οποία προσδένεται με τη θρομβίνη (TBA) ως μοριακό στοιχείο αναγνώρισης και ένα σύμπλοκο το οποίο αποτελείται από νανοσωματίδια CeO_2 , νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων (MWNTs) και ένα υδροφοβικό ιοντικό υγρό σε θερμοκρασία δωματίου (RTIL), το 1-αιθυλ-3-μεθυλιμιδαζολικό τετραφθοροβόριο ($EMIMBF_4$) [20]. Οι ηλεκτροχημικοί αισθητήρες κατασκευάστηκαν με τη βύθιση του τροποποιημένου από CeO_2 – MWNTs – $EMIMBF_4$ γυάλινου ηλεκτροδίου άνθρακα (GCE) μέσα στο διάλυμα της ακινητοποιημένης αλυσίδας TBA (Εικόνα 5.4). Παρουσία Pb^{2+} , η αλυσίδα TBA μπορούσε να σχηματίσει δομή G – quarter λόγω των ειδικών αλληλεπιδράσεων πρόσδεσης μεταξύ Pb^{2+} και TBA. Το ακινητοποιημένο στο ηλεκτρόδιο Pb^{2+} ανάγεται, μέσω της TBA, σε Pb^+ οδηγώντας σε μείωση του ρεύματος ύστερα από μετρήσεις κυκλικής βολταμετρίας. Η μείωση αυτή σχετίζεται γραμμικά με τη συγκέντρωση του Pb^{2+} για τιμές από 10^{-8} M έως 10^{-5} M και όριο ανίχνευσης 5×10^{-9} M.



Εικόνα 5.4: Σχηματική αναπαράσταση του ηλεκτροχημικού αισθητήρα με τη χρήση νουκλειικών οξέων και συμπλόκου για ανίχνευση Pb^{2+} [20].

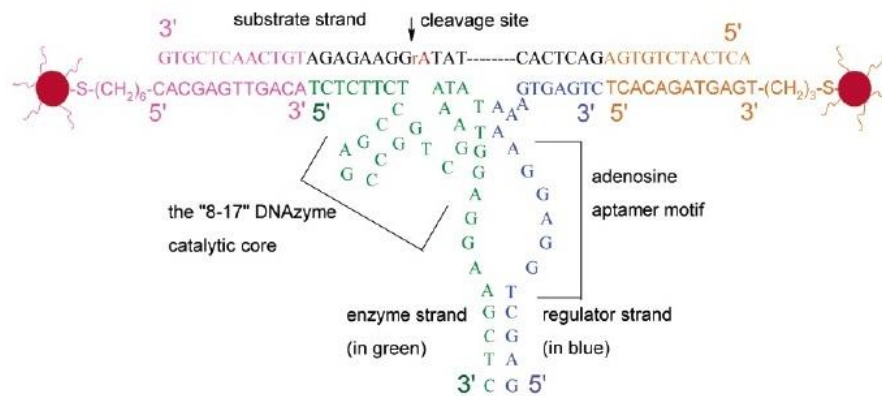
5.3.2 Αισθητήρες Φθορισμού

Οι Li et al. ήταν οι πρώτοι που χρησιμοποίησαν το “8 – 17” DNAzyme ευαίσθητο σε χημικές διεγέρσεις για την ανίχνευση Pb^{2+} [21]. Το σύστημα το οποίο χρησιμοποιήθηκε αποτελούνταν από μία ενζυμική αλληλουχία, τη 17E, και μία αλληλουχία που είχε το ρόλο του υποστρώματος, τη 17DS (Εικόνα 5.5). Παρουσία του αναλύτη, η ενεργοποιημένη αλληλουχία είχε τη δυνατότητα να διασπάσει υδρολυτικά την αλληλουχία – υπόστρωμα. Ο αισθητήρας φθορισμού κατασκευάστηκε επισημαίνοντας το 5' – άκρο του υποστρώματος με ένα φθορίζον μόριο και το 3' – άκρο της αλληλουχίας του ενζύμου με έναν αδρανοποιητή (quencher) φθορισμού. Απουσία ιόντων μολύβδου, το 17E επιδεικνύει μία πολύ ασθενή δράση προς το φερόμενο φθορισμού υπόστρωμα. Ωστόσο, παρουσία μολύβδου, το 17E διασπά ραγδαία το υπόστρωμα, κάτι το οποίο οδηγεί σε υψηλό σήμα φθορισμού.



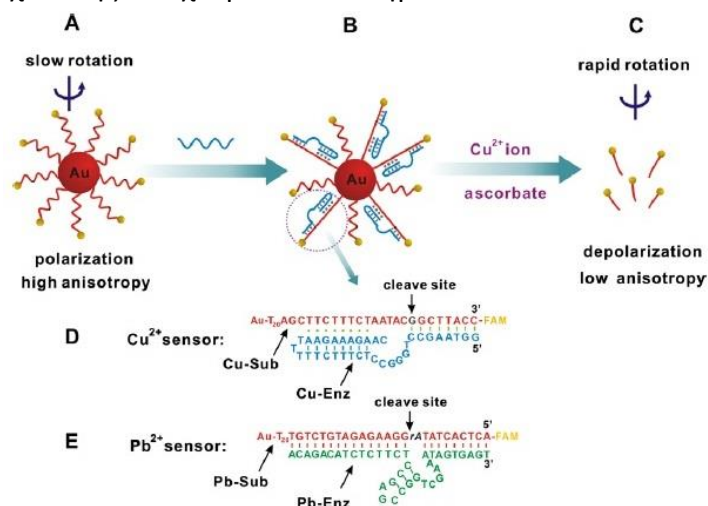
Εικόνα 5.5: (Α) Αναπαράσταση του DNAzyme το οποίο αποτελείται από μία ενζυμική αλληλουχία και μία αλληλουχία υποστρώματος. Με μαύρος βέλος υποδεικνύεται η περιοχή που γίνεται η διάσπαση. (Β) Παρουσία Pb^{2+} , το υπόστρωμα διασπάται [21].

Οι Liu et al. παρατήρησαν ότι οι χρωματομετρικοί βιοαισθητήρες με βάση τα aptazymes, που δημιουργούν σύμπλοκα με AuNPs, παρουσίαζαν περιορισμούς ως προς τους αναλύτες οι οποίοι είναι άμεσα συνδεδεμένοι με τη διάσπαση των φωσφοδιεστερικών δεσμών [22]. Για την αξιοποίηση μεγαλύτερης ποικιλίας αναλυτών, η ομάδα χρησιμοποίησε μία απτίνη αδενοσίνης η οποία ενεργοποιεί την ενζυμική δράση του DNA μέσω αλλοστερικών αντιδράσεων. Τα DNAzymes αποτελούνται και εδώ από δύο αλληλουχίες, την ενζυμική και το υπόστρωμα, με τη διαφορά ότι η αναγνώριση ενός μορίου επιτυγχάνεται με τη χρήση αυτής της απτίνης προσδεμένης στην ενζυμική αλληλουχία (Εικόνα 5.6). Η ενεργοποίηση της ενζυμικής δράσης υποκινείται μέσω της πρόσδεσης του αναλύτη σε ένα διαφορετικό σημείο της αλληλουχίας, όπου λαμβάνουν χώρα οι αλλοστερικές αντιδράσεις. Όταν η αδενοσίνη ενεργοποιήσει το ένζυμο, διασπάται το υπόστρωμα και εν συνεχεία διαταράσσονται τα συσσωματώματα μεταξύ των AuNPs' αυτό, όπως έχουμε δει σε προηγούμενη παράγραφο, οδηγεί στην αλλαγή από μπλε σε κόκκινο χρώμα. Οι συγκεντρώσεις της αδενοσίνης πάνω του 1 mM μπορούν να μετρηθούν ημιποσοτικά από το βαθμό των αλλαγών του μπλε χρώματος σε κόκκινο ή ποσοτικά από το λόγο σβέσης στα 520 και 700 nm. Κάτω από τις ίδιες συνθήκες, 5 mM γουανοσίνη, κυτιδίνη ή ουριδίνη οδήγησαν μόνο στο μπλε χρώμα, υποδηλώνοντας καλή επιλεκτικότητα του αισθητήρα. Ως εκ τούτου, οι χρωματομετρικοί βιοαισθητήρες περισσότερων αναλυτών κατασκευάζονται αξιοποιώντας την παραπάνω μέθοδο, ανεξάρτητα από το εάν οι αναλύτες συμμετέχουν άμεσα στην αντίδραση διάσπασης ή όχι.



Εικόνα 5.6: Δομή του *aptazyme* της αδενοσίνης με τη χρήση της φόρμας του "8 – 17" DNAzyme [22].

Οι Yin et al. αξιοποίησαν τα AuNPs με σκοπό να πετύχουν ανίχνευση Cu^{2+} και Pb^{2+} χρησιμοποιώντας ένα DNAzyme, μέσω ανάλυσης βασισμένης στην ανισοτροπία φθορισμού (FA) [23]. Συγκεκριμένα για την ανίχνευση Cu^{2+} , η ομάδα δημιούργησε μία αλληλουχία βάσεων που θα αποτελέσει το υπόστρωμα (Cu – Sub), την επισήμανε με φθορίζον μόριο και την ακινητοποίησε τροποποιώντας την με θειόλη πάνω στην επιφάνεια των AuNPs. Στη συνέχεια, υβριδοποίησαν τον κλώνο αυτό με την ενζυμική ακολουθία Cu – Enz ώστε να προκύψει το δίκλωνο φθοροφόρο (Εικόνα 5.7). Παρουσία Cu^{2+} , το υπόστρωμα υπέστη διάσπαση που σημαίνει ότι μειώθηκε το μοριακό βάρος του φθοροφόρου, αυξήθηκε ο ρυθμός περιστροφής και έτσι εκτέμφθηκε μη πολωμένο φως με συνέπεια τη μείωση του βαθμού ανισοτροπίας του φθοροφόρου. Προέκυψε λοιπόν ότι ο βαθμός ανισοτροπίας του φθοροφόρου μειώνεται όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του Cu^{2+} . Η ίδια αυτή μέθοδος χρησιμοποιήθηκε επιτυχώς και για την ανίχνευση Pb^{2+} , με την ευαισθησία ανίχνευσης να έχει βελτιωθεί σημαντικά στο 1 nM.

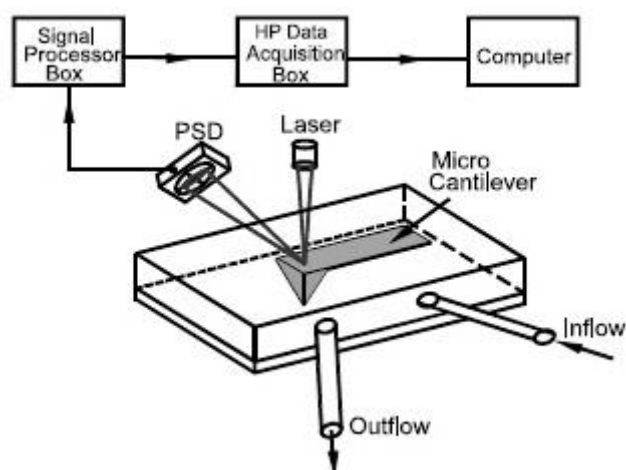


Εικόνα 5.7: Η μέθοδος ανισοτροπίας φθορισμού για την ανίχνευση Cu^{2+} και Pb^{2+} , A) το Cu – Sub με AuNPs, B) προσθήκη του Cu – Enz, C) παρουσία Cu^{2+} το σύμπλοκο σπάει, D) και E) οι αλληλουχίες των DNAzymes για ανίχνευση Cu^{2+} και Pb^{2+} αντίστοιχα [23].

Επίσης, στις μεθόδους ανίχνευσης ιόντων βαρέων μετάλλων με αισθητήρες φθορισμού υπάγονται και ορισμένες από τις στρατηγικές που περιγράφηκαν στην Ενότητα 5.2 [7–10].

5.3.3 Αισθητήρες Μικροδοκών

Οι Cherian et al. χρησιμοποίησαν νέες πρωτεΐνες πρόσδεσης σε μεταλλικά ιόντα ως βιοαισθητήρες ανίχνευσης βαρέων μετάλλων. Αυτές έχουν ως κύριο εκπρόσωπο μία μικρή πρωτεΐνη, πλούσια σε ιστιδίνη και γλυκίνη, την AgNt84–6, ήδη γνωστή για τις χρήσεις της ως προσδέτης διάφορων ατόμων των Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} και Cu^{2+} , ύστερα από ανάλυση φασματοσκοπίας μάζας [24]. Η ομάδα χρησιμοποίησε τις μικροδοκούς, οι οποίες κατασκευάστηκαν από νιτρίδιο του πυριτίου και στη μία τους πλευρά είχαν επικάλυψη χρυσού. Πάνω στην επιφάνεια του χρυσού ακινητοποιήθηκε η πρωτεΐνη AgNt84–6 αφού πρώτα τροποποιήθηκε με θειόλη (Εικόνα 5.8). Όταν στο περιβάλλον υπήρχαν ιόντα κάποιου από τα αναφερθέντα βαρέα μέταλλα, η πρωτεΐνη μπορούσε να τα δεσμεύσει με τη βοήθεια συνδετικών ομάδων, εκτρέποντας τη δοκό από τη θέση ισορροπίας της. Ωστόσο, παρατηρήθηκε ότι κάτι τέτοιο δε συνέβαινε όταν ο βιοαισθητήρας εκτίθετο στα Ca^{2+} , Mg^{2+} και Mn^{2+} , πράγμα το οποίο σημαίνει ότι η AgNt84–6 αδυνατεί να προσδέσει στην επιφάνειά της αυτά τα ιόντα. Οι μετρήσεις παρουσίαζαν την κανονικοποιημένη κάθετη εκτροπή της δοκού (σε μονάδες δυναμικού) ως συνάρτηση του χρόνου. Αυτό το σύστημα δίνει τη δυνατότητα σχεδιασμού βιοαισθητήρα βασισμένου στο φαινόμενο εκτροπής της δοκού για την ανίχνευση συγκεκριμένων μετάλλων.



Εικόνα 5.8: Σχηματική αναπαράσταση της διάταξης για μετρήσεις εκτροπής της δοκού. Το διάλυμα προς ανίχνευση εισέρχεται στην κυψελίδα μέσω της θύρας εισροής (inflow port) [24].

Οι Velanki et al. αξιοποίησαν ένα αντίσωμα, το 2A81G5, σε διάταξη βιοαισθητήρα μικροδοκού για την ανίχνευση ιόντων καδμίου [25]. Το αντίσωμα αυτό είναι μονόκλωνο, δηλαδή αποτελείται από μία μόνο ενζυμική αλληλουχία η οποία συζευγνύεται με το σύμπλοκο ιόντων καδμίου, αιθυλενοδιαμινοτετραοξικού οξέος και αλβουμίνης βόειου ορού (Cd^{2+} – EDTA – BSA). Η δοκός είναι κατασκευασμένη από πυρίτιο και η μία της πλευρά έχει επικαλυφθεί με χρυσό ώστε, με τη βοήθεια ενός πολυμερούς, της πολυαιθυλενιμίνης (PEI), να ακινητοποιήσει το 2A81G5 στην επιφάνειά της. Όλο το σύστημα του βιοαισθητήρα τοποθετείται εντός γυάλινης κυψελίδας συνεχούς ροής του διαλύματος του αναλύτη, όπου ο ρυθμός ροής διατηρείται σταθερός καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος μέσω μίας αντλίας σύριγγας. Όταν ο βιοαισθητήρας ερχόταν σε επαφή με το διάλυμα, το αντίσωμα δέσμευε το σύμπλοκο πάνω στην επιφάνεια της δοκού και αυτό προκαλούσε την εκτροπή από την αρχική θέση ισορροπίας της. Η ίδια μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί και σε διαλύματα διαφορετικών αναλυτών, εφόσον έχει προσδεθεί στη δοκό το κατάλληλο αντίσωμα. Η έρευνα έδωσε ένα όριο ανίχνευσης για το Cd^{2+} της τάξης του 10^{-9} M.

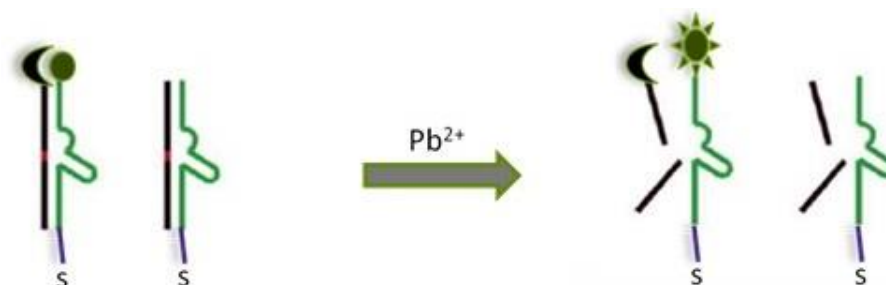
5.4 Εναπόθεση των Απτινών με την τεχνική LIFT

Στα πειράματα που ακολουθούν χρησιμοποιήθηκαν οι αλληλουχίες των απτινών oligo 1 και oligo 2. Η πρώτη θα είναι ακινητοποιημένη πάνω στο υπόστρωμα κατόπιν εκτύπωσής της με την τεχνική LIFT και η δεύτερη είναι η συμπληρωματική της, απαραίτητη για την υβριδοποίηση προς τη δημιουργία μίας δίκλωνης αλυσίδας. Η αλληλουχία των βάσεων τους έχει ως ακολούθως:

oligo 1: 5'-**FAM**-TTT TTC ATC TCT TCT CCG AGC CGG TCG AAA TAG TGA GT-**SH**-3'

oligo 2: 5'- ACT CAC TAT **rAGG** AAG AGA TG - **Dabcyl** - 3'

Η πρώτη αλληλουχία είναι τροποποιημένη στο 3'-άκρο με μια ομάδα θειόλης η οποία και επιτρέπει την πρόσδεση της στην επιφάνεια των τροποποιημένων επιφανειών. Για την επαλήθευση της πρόσδεσης των oligo 1 στις τροποποιημένες επιφάνειες όπως και για τον έλεγχο της υβριδοποίησης των προαναφερθέντων με τα oligo 2, χρησιμοποιήθηκε ένας δείκτης φθορισμού και ένα μόριο αδρανοποιητή του φθορισμού που όταν συμπλέκεται με το δείκτη, αποκρύπτει το φθορισμό του.



Εικόνα 5.9: Η ενζυμική δράση ενός από των δύο αλυσίδων παρουσία Pb^{2+} [26].

Συγκεκριμένα, το oligo 1 τροποποιήθηκε με FAM στο 5'-άκρο ενώ το oligo 2 με Dabcyl. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 5.9, μετά την υβριδοποίηση των δύο αλυσίδων το σήμα φθορισμού της FAM αποκρύπτεται. Παρουσία μολύβδου όμως το σήμα επανέρχεται καθώς η ενζυμική δράση του oligo 2 σπάει το δίκλωνο σύμπλεγμα oligo 1 – oligo 2 και κατά συνέπεια η Dabcyl απομακρύνεται.

Με την τεχνική LIFT εναποτέθηκαν επιτυχώς μία συστοιχία (array) oligo 1 (10 μM σε διάλυμα 1 M Potassium Phosphate Buffer pH 6.9) με τις εξής συνθήκες:

- 10 μL διαλύματος στο υπόστρωμα δότη quartz/Ti
- spot size: 60 μm
- πυκνότητα ενέργειας: 250 mJ/cm²
- απόσταση των υποστρωμάτων δότη – αποδέκτη: 300 μm

Τα υποστρώματα του αποδέκτη ήταν είτε πλακίδια GOPTS/LTO/Si είτε SPEs (Screen Printed Electrodes) με χρυσό ηλεκτρόδιο εργασίας, από τη DropSens. Τα δύο ειδών υποστρώματα συνεπάγονται με δύο τρόπους ανίχνευσης της υβριδοποίησης του DNA, με φθορισμό και ηλεκτροχημεία αντίστοιχα.

5.5 Πρωτόκολλο Υβριδοποίησης και Ανίχνευσης Ιόντων Pb(II)

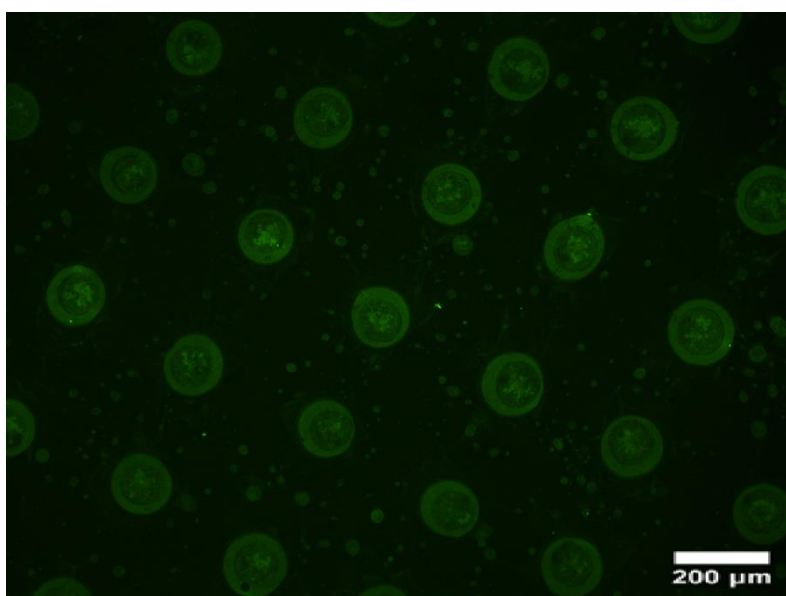
Η διαδικασία της υβριδοποίησης δεν είναι τόσο απλή για τις απτίνες που χρησιμοποιούνται στην ανίχνευση του Pb²⁺. Δεν αρκεί, δηλαδή, η εναπόθεση με πιπέτα της συμπληρωματικής αλυσίδας, όπως στην περίπτωση ανίχνευσης της υβριδοποίησης. Γι' αυτό το λόγο, πρέπει να ακολουθηθεί το παρακάτω πρωτόκολλο, το οποίο περιλαμβάνει και τα βήματα για τη διαδικασία ανίχνευσης ιόντων Pb(II) [9].

- a) Αφού έγινε η εκτύπωση του υποστρώματος με τα oligo 1, αφήνεται σε ηρεμία για μία μέρα.
- b) Ξέπλυμα του υποστρώματος με ddH₂O.
- c) Εφαρμόζεται 1 mM μερκαπτοεξανόλης (MCH) για μία ώρα.
- d) Ξέπλυμα σε 50 nM tris acetate buffer pH 7.2 και 1 M NaCl.
- e) Υβριδοποίηση με τα oligo 2 σε 50 nM tris acetate buffer pH 7.2 και 1 M NaCl στους 70°C για μία ώρα.
- f) Αφήνεται το υπόστρωμα σε θερμοκρασία δωματίου για μία ώρα.
- g) Ψύξη στους 4°C για 30 λεπτά.
- h) Αφήνεται το υπόστρωμα να επιστρέψει σε θερμοκρασία δωματίου.
- i) Πριν την ανίχνευση ιόντων Pb(II), ξέπλυμα σε 50 nM tris acetate buffer pH 7.2 και 50 M NaCl για 5 λεπτά.
- j) Μετρήσεις στο διάλυμα του μολύβδου: 10 μM Pb(NO₃)₂ + 50 nM tris acetate buffer pH 7.2 + 50 M NaCl.
- k) Ξέπλυμα σε 50 nM tris acetate buffer pH 7.2 και 50 M NaCl.
- l) Για επανενεργοποίηση του υποστρώματος, αφήνεται σε ddH₂O για μία μέρα.

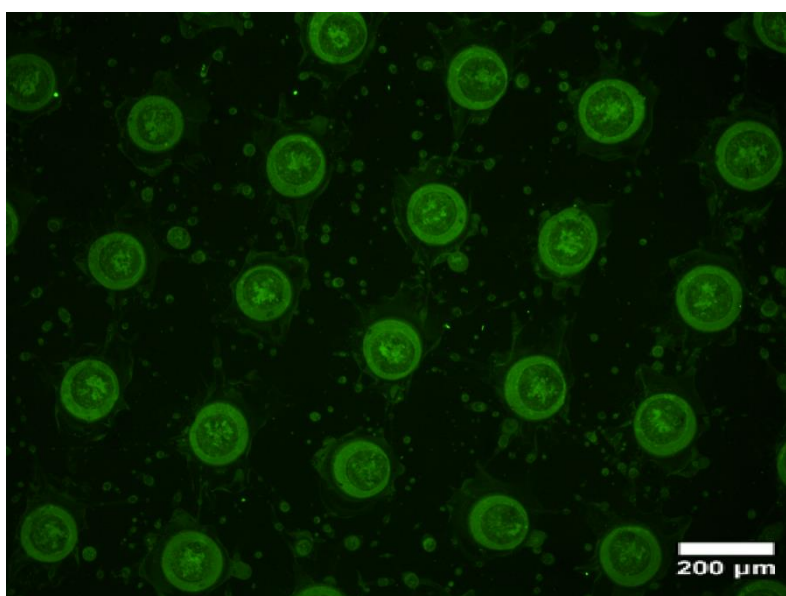
- m) Ξέπλυμα με ddH₂O.
- n) Επανάληψη των βημάτων 5 έως 11.

5.5.1 Ανίχνευση Ιόντων Pb(II) με Φθορισμό

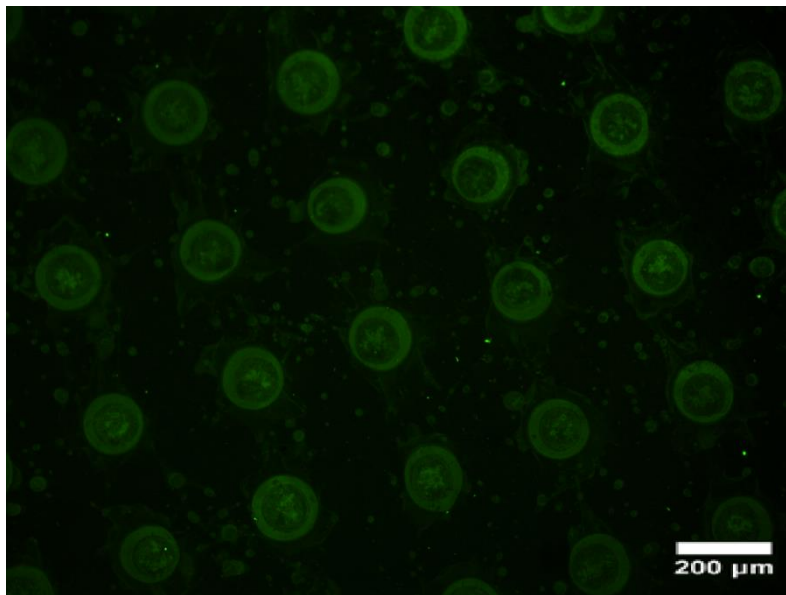
Ακολουθούν εικόνες από μικροσκόπιο φθορισμού ενός πλακιδίου GOPTS/LTO/Si, οι οποίες παρουσιάζουν διαδοχικά τα βήματα του πρωτοκόλλου ακινητοποίησης των βιομορίων, υβριδοποίησης με τα συμπληρωματικά τους και ανίχνευσης μολύβδου.



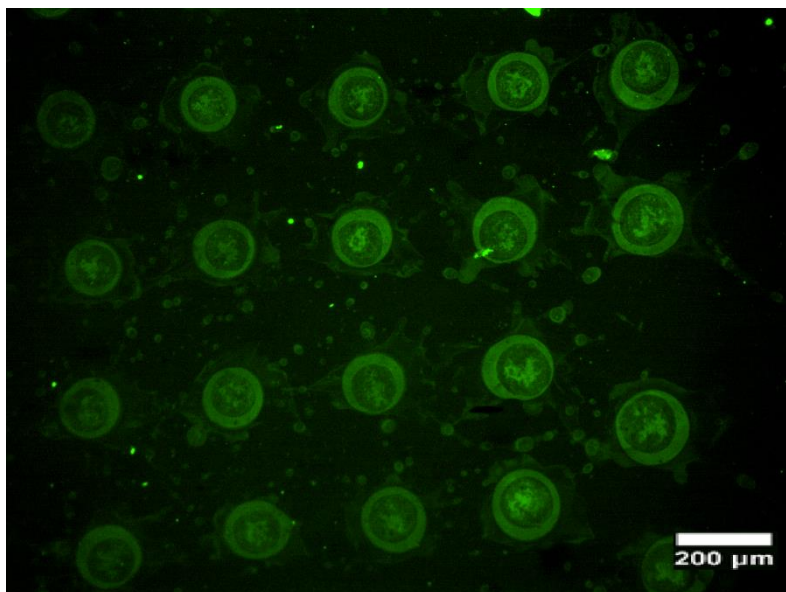
Εικόνα 5.10: Το πλακίδιο GOPTS/LTO/Si μετά την εκτύπωση συστοιχίας των oligo 1 με την τεχνική LIFT.



Εικόνα 5.11: Το πλακίδιο GOPTS/LTO/Si μετά την εφαρμογή 1 mM μερκαπτοεξανόλης.



Εικόνα 5.12: Το πλακίδιο GOPTS/LTO/Si μετά την υβριδοποίηση των *oligo 1* με τα *oligo 2*.

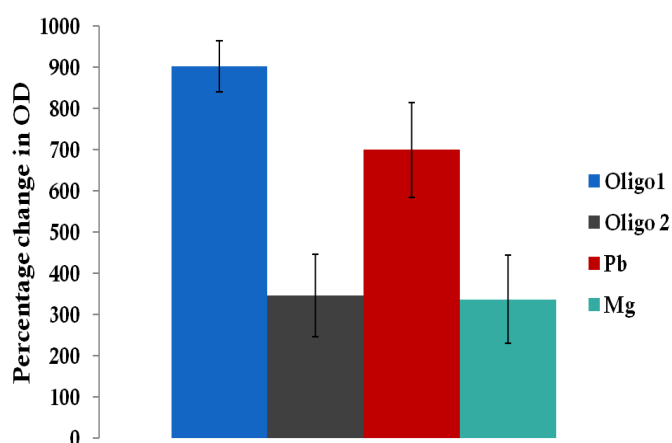


Εικόνα 5.13: Το πλακίδιο GOPTS/LTO/Si μετά την εισαγωγή του στο διάλυμα του Pb(II), ο οποίος διαχώρισε τις αλυσίδες των *oligo 1* και *oligo 2*.

Οι παραπάνω εικόνες συνοψίζουν τη διαδικασία της ανίχνευσης ιόντων Pb(II) με φθορισμό. Αρχικά, λαμβάνεται σήμα από τα *oligo 1* (Εικόνα 5.10), το οποίο είναι πιο έντονο με το που απομακρυνθούν οι μη ακινητοποιημένες αλυσίδες με τη χρήση 1 mM μερκαπτοεξανόλης (Εικόνα 5.11). Κατόπιν, προστίθενται τα *oligo 2*, γίνεται η υβριδοποίηση με το *oligo 1* και, επειδή είναι επισημασμένα με το μόριο αδρανολογίας του φθορισμού, πέφτει δραματικά το σήμα φθορισμού (Εικόνα 5.12). Τέλος, αν στο περιβάλλον βρεθούν ιόντα μολύβδου, αυτά προκαλούν

διάσπαση της δίκλωνης αλυσίδας και απομακρύνουν το μόριο αδρανοποίησης από το δείκτη φθορισμού, με αποτέλεσμα να αυξάνεται πάλι το σήμα (Εικόνα 5.13).

Οι αλληλουχίες των απτινών που αξιοποιήθηκαν χαρακτηρίζονται από μεγάλη επιλεκτικότητα ως προς την ανίχνευση του Pb^{2+} , καθώς μετά την υβριδοποίηση εισήχθησαν ιόντα ενός άλλου βαρέου μετάλλου, το Mg^{2+} , και είναι φανερό ότι το σήμα φθορισμού δεν άλλαξε, που σημαίνει ότι τα ιόντα μαγνησίου δεν προκάλεσαν τη διάσπαση της δίκλωνης αλυσίδας και κατά συνέπεια το μόριο του αδρανοποιητή φθορισμού συνεχίζει να καταστέλλει τη δράση του δείκτη φθορισμού με τον οποίο είναι επισημασμένα τα oligo 1 (Εικόνα 5.14).

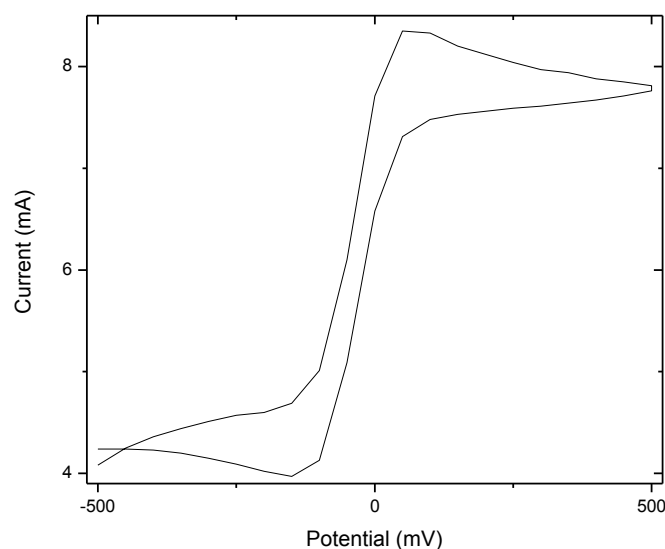


Εικόνα 5.14: Το σήμα φθορισμού μετά την προσθήκη μολύβδου και μαγνησίου [26].

5.5.2 Ανίχνευση Ιόντων $Pb(II)$ με Ηλεκτροχημεία

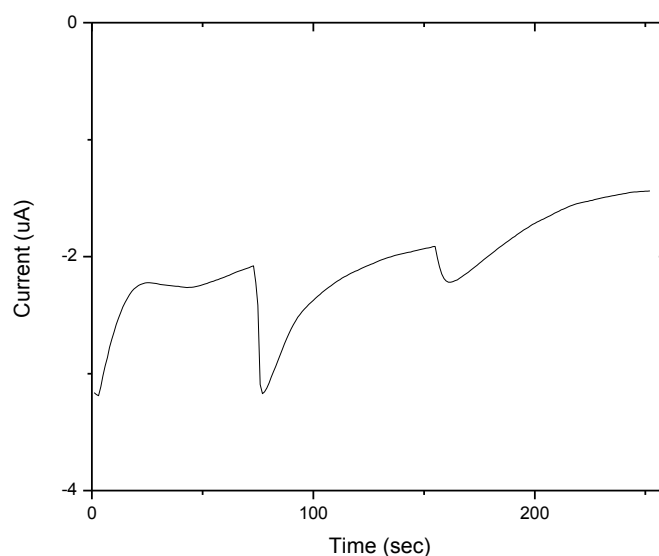
Για την ηλεκτροχημική προσέγγιση, χρησιμοποιήθηκαν τα χρυσά SPE που είχαν αξιοποιηθεί στην Ενότητα 4.3.2. Οι συνθήκες εναπόθεσης με τη τεχνική LIFT παραμένουν οι ίδιες, αλλάζει ωστόσο προφανώς το προς εναπόθεση βιολογικό υλικό, που είναι το oligo 1. Πραγματοποιούνται μετρήσεις αμπερομετρίας με τον ποτενσιοστάτη AMPBIO-SPE της Biosensor s.r.l. και μετρήσεις κυκλικής βολταμετρίας με το όργανο 4140 B μA meter / DC Voltage Source της Hewlett – Packard.

Για τις μετρήσεις αμπερομετρίας, έπρεπε αρχικά να βρεθεί το σωστό δυναμικό με μία διαδικασία παρόμοια με αυτή για ανίχνευση υβριδοποίησης του DNA, επίσης στην Ενότητα 4.3.2. Γι' αυτό το σκοπό, έπρεπε να γίνουν δοκιμαστές μετρήσεις κυκλικής βολταμετρίας όπου στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας του SPE θα βρίσκονταν δίκλωνες αλυσίδες οι οποίες προέρχονταν από την υβριδοποίηση των oligo 1 και oligo 2, σύμφωνα με το συγκεκριμένο πρωτόκολλο που περιγράφηκε προηγουμένως, μαζί με το redox pair (25 mM, 1:1). Το ρεύμα εμφάνιζε κορυφή στα 70 mV και αυτό θα είναι και το δυναμικό που θα επιλεγεί στον ποτενσιοστάτη (Εικόνα 5.15).



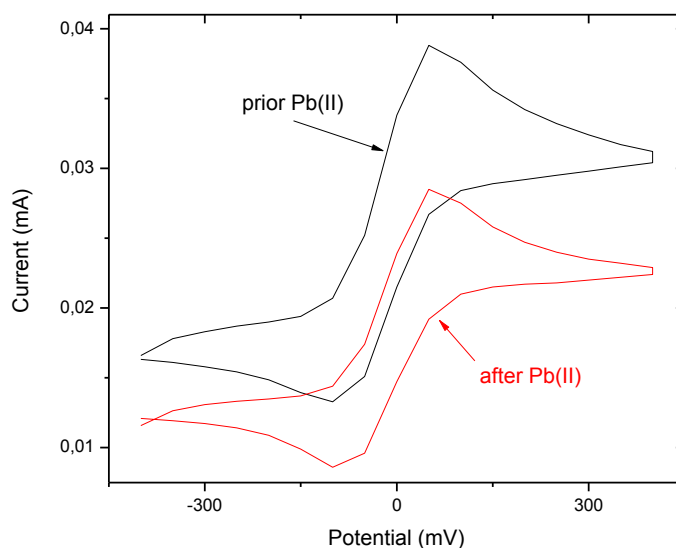
Εικόνα 5.15: Διάγραμμα κυκλικής βολταμετρίας ενός χρυσού SPE όπου έχουν εναποτεθεί τα oligo 1 με τα oligo 2, μαζί με το redox pair (25 mM, 1:1).

Για τις μετρήσεις αμπερομετρίας στον ποτενσιοστάτη, το SPE με τις ήδη υβριδοποιημένες αλυσίδες και το redox pair τοποθετείται στην ειδική θύρα και κατόπιν επιλέγεται δυναμικό 70 mV, διατηρώντας ίδιες τις υπόλοιπες παραμέτρους, όπως στις μετρήσεις ανίχνευσης υβριδοποίησης DNA. Παρόλο που στα 73 sec, με την εισαγωγή του διαλύματος του Pb(II), παρατηρείται σήμα περίπου 1 μ A, ωστόσο όταν στο ηλεκτρόδιο προστέθηκε μόνο το διάλυμα 50 nM tris acetate buffer pH 7.2 και 50 M NaCl (το διάλυμα στο οποίο είναι διαλυμένα τα ιόντα του μολύβδου) στα 155 sec, παρατηρήθηκε και πάλι σήμα (Εικόνα 5.16).

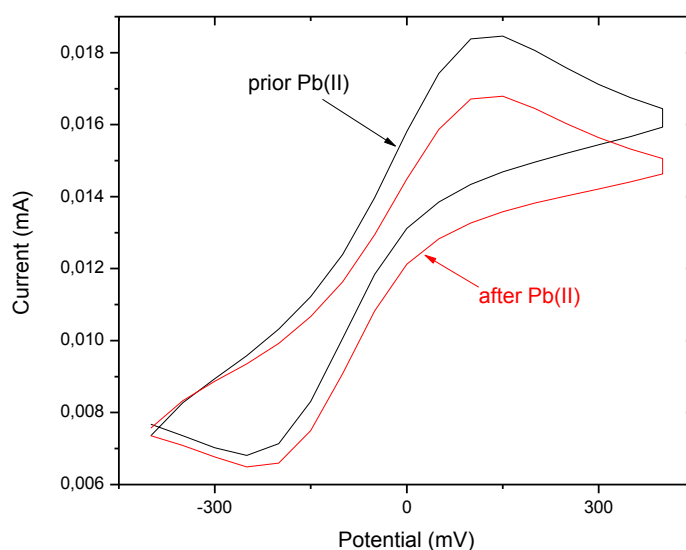


Εικόνα 5.16: Απόκριση του αισθητήρα στο διάλυμα των ιόντων του Pb(II).

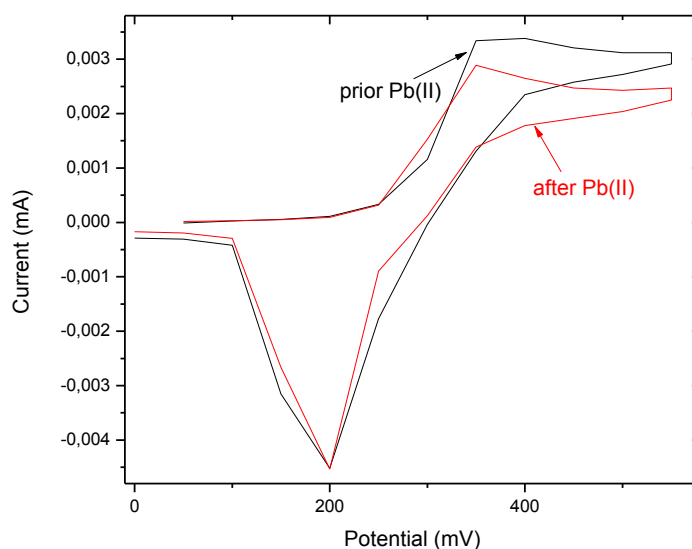
Αυτό δεν έπρεπε να συμβεί, που σημαίνει ότι πιο πιθανό ήταν το σήμα να προήρθε από τα ιόντα που βρίσκονται μέσα στο ίδιο το διάλυμα, παρά από τη διάσπαση των oligo 2 από τα oligo 1 λόγω ιόντων Pb(II). Οι μετρήσεις επαναλήφθηκαν ξανά, δοκιμάζοντας και με συγκέντρωση του redox pair στα 10 mM, παρόλα αυτά παρατηρούταν σήμα και κατά την πρόσθεση του διαλύματος χωρίς τα ιόντα του μολύβδου. Ακολουθούν γραφήματα από τις μετρήσεις κυκλικής βολταμετρίας που πραγματοποιήθηκαν στη συνέχεια.



Εικόνα 5.17: Γραφήματα κυκλικής βολταμετρίας με redox pair συγκέντρωσης 25 mM αναλογίας 1:1, πριν και μετά την εισαγωγή Pb^{2+} .



Εικόνα 5.18: Γραφήματα κυκλικής βολταμετρίας με redox pair συγκέντρωσης 10 mM αναλογίας 1:1, πριν και μετά την εισαγωγή Pb^{2+} .



Εικόνα 5.19: Γραφήματα κυκλικής βολταμετρίας με κυανούν του μεθυλενίου συγκέντρωσης 25 mM, πριν και μετά την εισαγωγή Pb^{2+} .

Στο πρώτο (Εικόνα 5.17) χρησιμοποιήθηκε redox pair συγκέντρωσης 25 mM σε αναλογία 1:1, στο δεύτερο (Εικόνα 5.18) χρησιμοποιήθηκε το ίδιο redox pair συγκέντρωσης 10 mM σε αναλογία 1:1, ενώ στο τελευταίο (Εικόνα 5.19) χρησιμοποιήθηκε το κυανούν του μεθυλενίου συγκέντρωσης 25 mM. Το κάθε γράφημα αποτελείται από δύο παραστάσεις: η μία είναι πριν και η άλλη μετά την εισαγωγή του διαλύματος του μολύβδου στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου.

Όπως είχε δειχθεί στην ανίχνευση υβριδοποίησης του DNA με ηλεκτροχημική προσέγγιση, όταν στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου υπάρχουν δίκλωνες αλυσίδες, το ρεύμα συνεχίζει να πέφτει λόγω εσωτερικών ηλεκτροχημικών αντιδράσεων. Αν τα ιόντα μολύβδου προκαλούσαν διάσπαση των δίκλωνων αλυσίδων, τότε το ρεύμα θα αυξανόταν αφού το oligo 1 θα είχε αποσχισθεί του oligo 2. Ωστόσο, το ρεύμα μειώθηκε οπότε ισχύει η περίπτωση που έχουμε δίκλωνη αλυσίδα ή ίσως κάποια άλλη περίπτωση, όπου μόνο οι ηλεκτρονιοδέκτες συμμετέχουν στη ροή ρεύματος χωρίς την παρουσία των απτινών.

Από τα παραπάνω γίνεται φανερό ότι ο ηλεκτροχημικός αισθητήρας συμπεριφέρεται σα να μην υπάρχουν oligo 1 στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου του. Αφού οι ηλεκτροχημικοί αισθητήρες παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού, λόγω του μηδενικού σήματος φθορισμού προκύπτει ότι δεν υπάρχουν oligo 1 στην επιφάνειά τους. Αυτό ίσως να οφείλεται στο γεγονός ότι οι αλυσίδες είναι μικρές σε μήκος και ο χρυσός στην επιφάνεια των SPEs δεν είναι ικανός να τις δεσμεύσει. Πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω αυτή η μέθοδος, μία πρόταση της οποίας θα μπορούσε να αποτελέσει η ανάπτυξη ενός συμπλόκου από επιπλέον ουσίες οι

οποίες θα μπορούσαν να ενισχύσουν την πρόσδεση του oligo 1 με τις ομάδες θειόλης του χρυσού ηλεκτροδίου εργασίας στο SPE.

5.6 Αναφορές Κεφαλαίου

1. P. A. Meyer, M. J. Brown, H. Falk, "Global approach to reducing lead exposure and poisoning", *Mutation Research*, **659**, 166–175 (2008).
2. Α. Βαλαβανίδης, "Οικοτοξικολογία και περιβαλλοντική τοξικολογία", Πανεπιστήμιο Αθηνών (2007).
3. Ε. Γρηγοροπούλου, ΔΠΜΣ: "Επιστήμη και Τεχνολογία Υδατικών Πόρων: Διαχείριση Βιομηχανικών Αποβλήτων" (2005).
4. P. Gautam, S. Suniti, Prachi, A. Kumari, M. Deepa, A. N. Brijesh Nair, "A review on recent advances in biosensors for detection of water contamination", *International Journal of Environmental Sciences*, **2**, 1565–1574 (2012).
5. Z. Chen, L. Li, X. Mu, H. Zhao, L. Guo, "Electrochemical aptasensor for detection of copper based on a reagentless signal-on architecture and amplification by gold nanoparticles", *Talanta*, **85**, 730–735, (2011).
6. Y. S. Kim, H. S. Jung, T. Matsuura, H. Y. Lee, T. Kawai, M. B. Gu, "Electrochemical detection of 17 β -estradiol using DNA aptamer immobilized gold electrode chip", *Biosensors and Bioelectronics*, **22**, 2525–2531 (2007).
7. J. Liu, Y. Lu, "A Colorimetric Lead Biosensor Using DNAzyme-Directed Assembly of Gold Nanoparticles", *Journal of the American Chemical Society*, **125**, 6642–6643 (2003).
8. S. Seetharaman, M. Zivartis, N. Sudarsan, R. R. Breaker, "Immobilized RNA switches for the analysis of complex chemical and biological mixtures", *Nature Biotechnology*, **19**, 336–341 (2001).
9. C. B. Swearingen, D. P. Wernette, D. M. Cropek, Y. Lu, J. V. Sweedler, P. W. Bohn, "Immobilization of a Catalytic DNA Molecular Beacon on Au for Pb(II) Detection", *Analytical Chemistry*, **77**, 442–448 (2005).
10. S. W. Santoro, G. F. Joyce, K. Sakthivel, S. Gramatikova, C. F. Barbas 3rd, "RNA cleavage by a DNA enzyme with extended chemical functionality", *Journal of the American Chemical Society*, **122**, 2433–2439 (2000).
11. B. Cuenoud, J. W. Szostak, "A DNA metalloenzyme with DNA ligase activity", *Nature*, **375**, 611–614 (1995).
12. J. G. Bruno, J. L. Kiel, "In vitro selection of DNA aptamers to anthrax spores with electrochemiluminescence detection", *Biosensors and Bioelectronics*, **14**, 457–464 (1999).
13. J. G. Bruno, J. L. Kiel, "Use of magnetic beads in selection and detection of biotoxin aptamers by electrochemiluminescence and enzymatic methods", *BioTechniques*, **32**, 178–183 (2002).

14. R. Kirby, E. J. Cho, B. Gehrke, T. Bayer, Y. S. Park, D. P. Neikirk, J. T. McDevitt, A. D. Ellington, "Aptamer-based sensor arrays for the detection and quantitation of proteins", *Analytical Chemistry*, **76**, 4066–4075 (2004).
15. J. Tang, T. Yu, L. Guo, J. Xie, N. Shao, Z. He, "In vitro selection of DNA aptamer against abrin toxin and aptamer-based abrin direct detection", *Biosensors and Bioelectronics*, **22**, 2456–2463 (2007).
16. S. McMasters, D. N. Stratis–Cullum, "Evaluation of aptamers as molecular recognition elements for pathogens using capillary electrophoretic analysis", *Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering*, **6380**, art. no. 63800B (2006).
17. J. Vivekananda, J. L. Kiel, "Anti-Francisella tularensis DNA aptamers detect tularemia antigen from different subspecies by Aptamer-Linked Immobilized Sorbent Assay", *Laboratory Investigation*, **86**, 610–618 (2006).
18. N. Sayer, M. Cubin, A. Rhie, M. Bullock, A. Tahiri–Alaoui, W. James, "Structural determinants of conformationally selective, prion-binding aptamers", *Journal of Biological Chemistry*, **279**, 13102–13109 (2004).
19. X. Yang, J. Xu, X. Tang, H. Liu, D. Tian, "A novel electrochemical DNAzyme sensor for the amplified detection of Pb²⁺ ions", *Chemical Communications*, **46**, 3107–3109 (2010).
20. Y. Li, X. R. Liu, X. H. Ning, C. C. Huang, J. B. Zheng, J. C. Zhanga, "An ionic liquid supported CeO₂ nanoparticles – carbon nanotubes composite – enhanced electrochemical DNA – based sensor for the detection of Pb²⁺", *Journal of Pharmaceutical Analysis*, **1**, 258–263 (2011).
21. J. Li, Y. Lu, "A Highly Sensitive and Selective Catalytic DNA Biosensor for Lead Ions", *Journal of the American Chemical Society*, **122**, 10466–10467 (2000).
22. J. Liu, Y. Lu, "Adenosine – Dependent Assembly of Aptazyme – Functionalized Gold Nanoparticles and Its Application as a Colorimetric Biosensor", *Analytical Chemistry*, **76**, 1627–1632 (2004).
23. B. C. Yin, P. Zuo, H. Huo, X. Zhong, B. C. Ye, "DNAzyme self – assembled gold nanoparticles for determination of metal ions using fluorescence anisotropy assay", *Analytical Biochemistry*, **401**, 47–52 (2010).
24. S. Cherian, R. K. Gupta, B. C. Mullin, T. Thundat, "Detection of heavy metal ions using protein – functionalized microcantilever sensors", *Biosensors and Bioelectronics*, **19**, 411–416 (2003).
25. S. Velanki, S. Kelly, T. Thundat, D. A. Blake, H. F. Ji, "Detection of Cd(II) using antibody – modified microcantilever sensors", *Ultramicroscopy*, **107**, 1123–1128 (2007).
26. Raymetrics / LoC, "Τεχνική έκθεση περιγραφής προσαρμογών των υποσυστημάτων για εφαρμογές σημειακών αναλύσεων περιβάλλοντος και οικοσυστημάτων", 1–96 (2013).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΕΝΖΥΜΙΚΟΙ ΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ ΓΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΤΕΧΟΛΗΣ

6.1 Φαινολικές Ενώσεις και Λακάση

Οι φαινολικές ενώσεις, ή οι πολυφαινόλες, είναι φυτικές ουσίες που βρίσκονται στα φυτά και συμβάλλουν στην άμυνά τους στις μολύνσεις από παθογόνους, ενώ παράλληλα τα προστατεύουν και από την υπεριώδη ακτινοβολία. Είναι οι έγχρωμες ουσίες που δίνουν το χαρακτηριστικό χρώμα σε διάφορα λαχανικά και φρούτα. Στα ζώα και τον άνθρωπο, οι πολυφαινόλες απορροφούνται με τη λήψη τροφών πλούσιων σε αυτές και μεταφέρονται στους ιστούς με την κυκλοφορία. Τροφές πλούσιες σε πολυφαινόλες είναι διάφορα φρούτα και λαχανικά, το (κόκκινο κυρίως) κρασί, το κακάο, το τσάι, τα εκχυλίσματα βοτάνων και το ελαιόλαδο. Αυτή η κατηγορία των μορίων περιλαμβάνει αρκετές χιλιάδες ενώσεις, μεταξύ των οποίων οι φλαβονόλες, οι κατεχίνες, οι ανθοκυανιδίνες και οι ισοφλαβόνες [1–2].

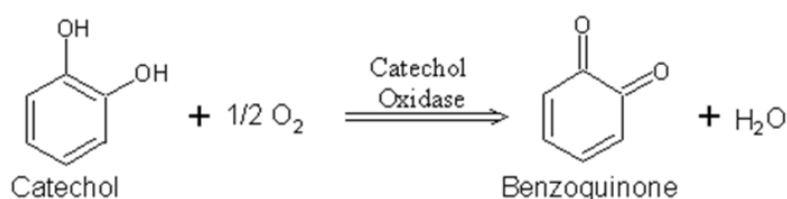
Μελέτες έδειξαν ότι οι ουσίες αυτές λειτουργούν προστατευτικά, προάγοντας την καλή κατάσταση της υγείας και παρατείνοντας τον μέσο όρο ζωής. Αναστέλλουν ή περιορίζουν την οξείδωση των λιπιδίων του αίματος, αυξάνουν τα επίπεδα της, προστατευτικής για την υγεία, HDL και μειώνουν τα επίπεδα της λιποπρωτεΐνης LDL, η οποία ευθύνεται για την δημιουργία αθηρωματικών πλακών. Ακόμη, μειώνουν την πιθανότητα δημιουργίας θρόμβων, εμφανίζουν γενικότερη αντιφλεγμονώδη δράση και περιορίζουν σε σημαντικό βαθμό τις οξειδωτικές βλάβες στους ιστούς, με απώτερο αποτέλεσμα την ελάττωση εμφάνισης καρκίνου. Πολλά από τα παραπάνω οφέλη των πολυφαινόλων αποδίδονται στην αντιοξειδωτική τους δράση [3–6].



Εικόνα 6.1: Παραδείγματα προϊόντων που περιέχουν πολυφαινόλες.

Οι μέθοδοι που έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση των πολυφαινόλων είναι οι τεχνικές GC-MS και HPLC [7], ωστόσο αυτές οι τεχνικές αφενός είναι πολυδάπανες, αφετέρου απαιτούν μία περίπλοκη διαδικασία προετοιμασίας του δείγματος. Αρκετοί βιοαισθητήρες έχουν αναπτυχθεί ως εναλλακτικές μέθοδοι αξιοποιώντας την καταλυτική δράση ενζύμων όπως η τυροσινάση και η λακάση για την ανίχνευση των φαινολικών ενώσεων [8–9].

Η λακάση είναι ένα μεταλλοένζυμο του χαλκού και ανήκει στην κατηγορία των οξυδορεδοκτασών, δηλαδή πρόκειται για ένα ένζυμο ικανό να οξειδώνει ορισμένες φαινολικές και μη ενώσεις, συμπεριλαμβανομένου των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων, των ζιζανιοκτόνων, ορισμένων οργανοφωσφορικών ενώσεων και πολλών άλλων. Το ένζυμο αυτό απαντάται σε ανώτερα φυτά, μύκητες και μικροοργανισμούς [10] και έχει ήδη χρησιμοποιηθεί ως βιοϋποδοχέας σε βιοαισθητήρες ανίχνευσης πολυφαινόλων [11–12], συγκεκριμένα για την ανίχνευση της κατεχόλης. Οι μετρήσεις αμπερομετρίας για την ανίχνευση αυτή έγιναν εφικτές με ηλεκτροχημικό τρόπο, μελετώντας τις διαφορές σήματος του ρεύματος παρουσία της λακάσης. Εφόσον το αποτέλεσμα της οξείδωσης της κατεχόλης είναι η βενζοκινόνη, η τελευταία μπορεί να αναχθεί ηλεκτροχημικά και να ανιχνευθεί με τρόπο που εξαρτάται από τη συγκέντρωση [13].

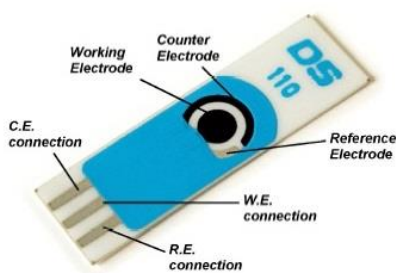


Εικόνα 6.2: Η οξείδωση της κατεχόλης σε βενζοκινόνη.

6.2 Ακίνητοποίηση του Ενζύμου

Έχουν αξιοποιηθεί αρκετές μέθοδοι για την ακίνητοποίηση διαφόρων ενζύμων για εφαρμογές βιοαισθητήρων. Κατά κύριο λόγο, η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου ακίνητοποίησης καθορίζεται από τις φυσικές και τις χημικές ιδιότητες τόσο της επιφάνειας εναπόθεσης όσο και του βιοϋποδοχέα. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες τεχνικές για ακίνητοποίηση στις τεχνολογίες βιοαισθητήρων αφορούν τόσο χημικές όσο και φυσικές διαδικασίες. Συγκεκριμένα, οι χημικές διαδικασίες ακίνητοποίησης βασίζονται στην ομοιοπολική σύνδεση, ενώ οι φυσικές τεχνικές αφορούν τους ακόλουθους μηχανισμούς: προσρόφηση, παγίδευση και εγκάρσια σύνδεση [14–15]. Αυτές οι μέθοδοι χαρακτηρίζονται από ορισμένα μειονεκτήματα, όπως μείωση της βιολογικής δραστηριότητας, απαραίτητη ενεργοποίηση της επιφάνειας, το ότι είναι αρκετά χρονοβόρες, χρησιμοποιούν επίπονες αντιδράσεις και συνήθως συμμετέχουν και τοξικές χημικές ουσίες.

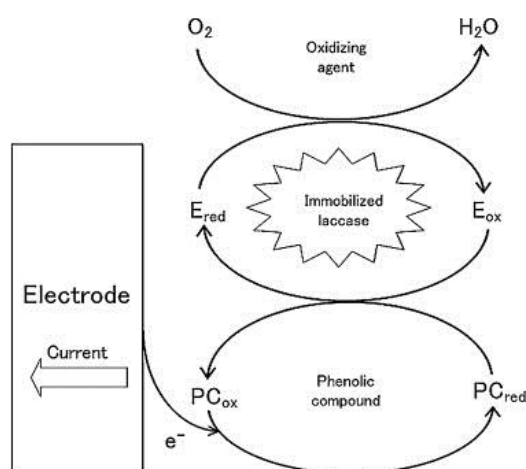
Με τη χρήση της τεχνικής LIFT, μπορεί να επιτευχθεί η ακινητοποίηση και η εκτύπωση του ενζύμου πάνω στο ηλεκτρόδιο εργασίας ενός εμπορικού αμπερομετρικού αισθητήρα. Χρησιμοποιήθηκαν τα SPEs της DropSens με κωδικό DRP-110, όπου επρόκειτο για ένα ηλεκτρόδιο εργασίας από γραφίτη διαμέτρου 4 mm, καθώς και το βοηθητικό και το ηλεκτρόδιο αναφοράς από γραφίτη και άργυρο αντίστοιχα. Οι ηλεκτρικές επαφές μεταξύ των ηλεκτροδίων είναι επίσης από άργυρο (Εικόνα 6.3).



Εικόνα 6.3: Το SPE με κωδικό DRP-110 της DropSens [16].

6.3 Αρχή Λειτουργίας του Ενζυμικού Αισθητήρα

Η αρχή λειτουργίας του συγκεκριμένου αμπερομετρικού αισθητήρα από λακάση έχει συνοπτικά ως ακολούθως: αρχικά, εφαρμόζοντας ένα σταθερό δυναμικό στην ηλεκτρική επαφή μεταξύ ηλεκτροδίου εργασίας και ηλεκτροδίου αναφοράς, το ηλεκτρόδιο εργασίας δίνει ηλεκτρόνια στην κατεχόλη, η οποία ανάγεται. Αυτή με τη σειρά της οξειδώνεται και μεταφέρει τα ηλεκτρόνια στη λακάση, με αποτέλεσμα να αναχθεί. Τέλος, η λακάση μεταφέρει το ηλεκτρόνιο στο οξυγόνο, το οποίο ανάγεται σε νερό (Εικόνα 6.4). Αυτή η διαδικασία που λαμβάνει χώρα στο ηλεκτρόδιο εργασίας του SPE χαρακτηρίζεται από συνεχείς αλλαγές της ροής των ηλεκτρονίων, που λόγω αυτών λαμβάνεται το αμπερομετρικό σήμα που μετράται στην ηλεκτρική επαφή μεταξύ βοηθητικού και ηλεκτροδίου εργασίας.



Εικόνα 6.4: Η αρχή λειτουργίας του ενζυμικού αισθητήρα και οι αντιδράσεις οξειδοαναγωγής που λαμβάνουν χώρα στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας.

6.4 Πειραματική Διαδικασία

Αρχικά γίνεται η εκτύπωση του ενζύμου της λακάσης σε μορφή συστοιχίας (array) στο ηλεκτρόδιο εργασίας του SPE με την τεχνική LIFT, η οποία καλύπτει μία περιοχή $4000 \times 4000 \mu\text{m}^2$, έχοντας τις εξής παραμέτρους:

- 5 μL διαλύματος στο υπόστρωμα δότη quartz/Ti
- spot size: 80 μm
- πυκνότητα ενέργειας: 450 mJ/cm^2
- απόσταση των υποστρωμάτων δότη – αποδέκτη: 200 μm

Το ένζυμο βρίσκεται σε υγρή φάση, καθώς έχει αραιωθεί στο ρυθμιστικό διάλυμα PBS pH 4.5 (40 U / 200 μL).

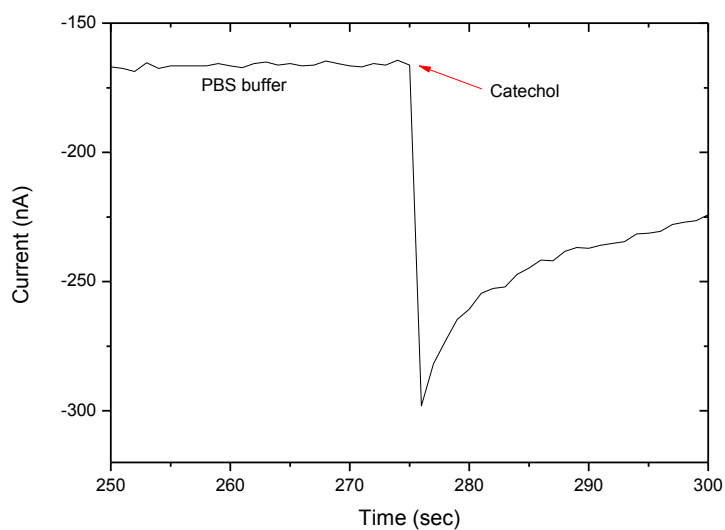
Στη συνέχεια, το ηλεκτρόδιο βυθίζεται 2 φορές στο διάλυμα PBS και τοποθετείται στην ειδική θύρα του ποτενσιοστάτη AMPBIO-SPE της Biosensors s.r.l., όπου με τη χρήση μίας πιπέτας καλύπτονται και τα 3 ηλεκτρόδια του SPE με 50 μL PBS. Ύστερα, επιλέχθηκε δυναμικό -30 mV και διατηρήθηκε η θερμοκρασία του δωματίου στους 20°C. Με το που προστέθηκε ποσότητα κατεχόλης στον όγκο του ήδη υπάρχοντος διαλύματος, πραγματοποιήθηκε η αντίδραση οξειδοαναγωγής και αυτή έδωσε αμπερομετρικό σήμα που καταγράφηκε από το λογισμικό του ποτενσιοστάτη.

Τέλος, το ίδιο SPE ξεπλύθηκε 2 φορές εμβαπτίζοντάς το εκ νέου στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα PBS, για να απομακρυνθεί η κατεχόλη (για την ακρίβεια, η βενζοκινόνη) και επαναχρησιμοποιήθηκε, παραμένοντας συνεπές όσον αφορά το ρόλο του στην ανίχνευση της κατεχόλης.

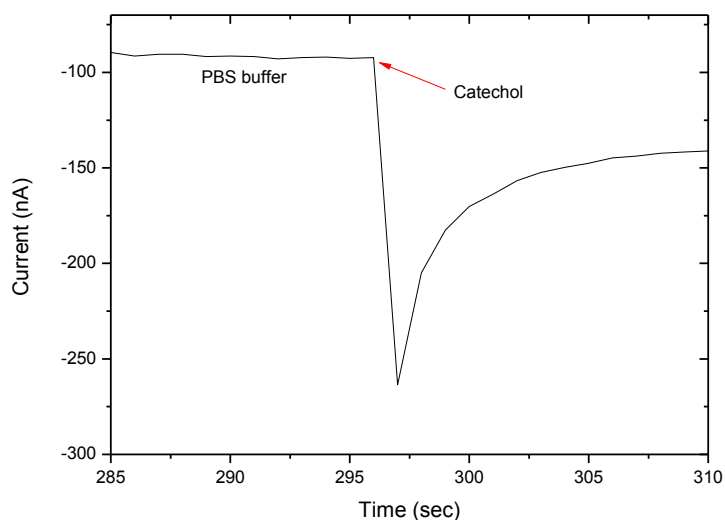
6.5 Ανίχνευση της Κατεχόλης

Κατ' αρχήν, πρέπει να γίνει κατανοητό γιατί η τεχνική απευθείας μικροεναπόθεσης με λέιζερ ή, για συντομία, LIFT είναι απαραίτητο εργαλείο για την εναπόθεση και ακινητοποίηση του ενζύμου. Παρατηρήθηκε ότι ύστερα από αρκετές πλύσεις του SPE και επαναλαμβάνοντας τη διαδικασία της ανίχνευσης, εκείνο συνέχιζε να δίνει σήμα κάθε φορά που εισαγόταν η κατεχόλη στον όγκο του PBS που κάλυπτε και τα 3 ηλεκτρόδια. Θα περίμενε κανείς ότι η λακάση από τις πολλές πλύσεις θα είχε αφαιρεθεί βαθμιαία από την επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας, ωστόσο οι μετρήσεις αμπερομετρίας δείχνουν το ακριβώς αντίθετο.

Ακολουθούν διαγράμματα τέτοιων μετρήσεων όπου ανιχνεύθηκαν επιτυχώς 300 nM κατεχόλης. Στο πρώτο διάγραμμα (Εικόνα 6.5) έχουν προηγηθεί 2 πλύσεις του SPE στο ρυθμιστικό διάλυμα PBS, ενώ στο δεύτερο (Εικόνα 6.6) ακολούθησαν επιπλέον 2 πλύσεις του ίδιου SPE, συνολικά 4 πλύσεις. Και στις δύο μετρήσεις, το μετρούμενο ρεύμα βρέθηκε περίπου στα 130 nA.

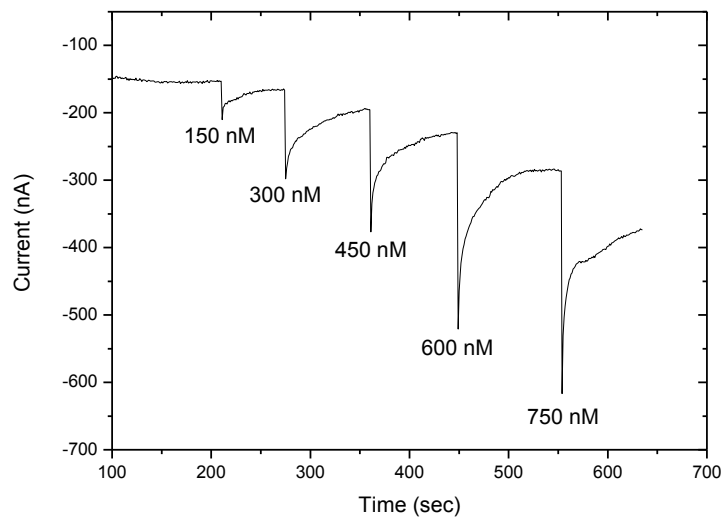


Εικόνα 6.5: Απόκριση του αισθητήρα ύστερα από 2 πλύσεις.

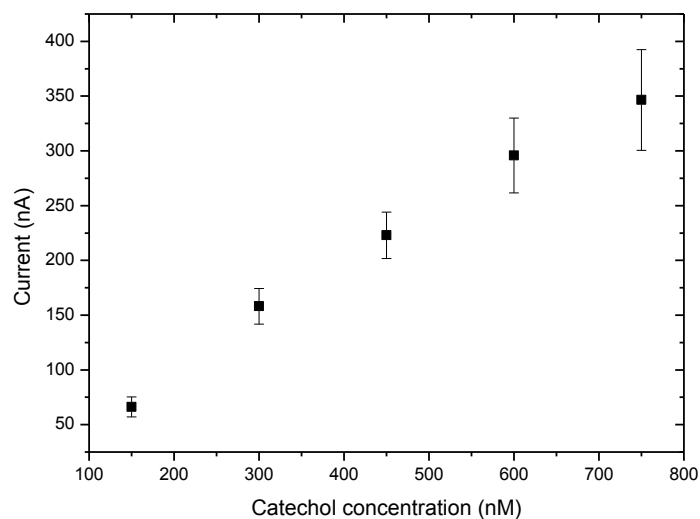


Εικόνα 6.6: Απόκριση του αισθητήρα ύστερα από 4 πλύσεις.

Ο συγκεκριμένος ενζυμικός αισθητήρας μπορεί να ανιχνεύσει κατεχόλη σε διάφορες συγκεντρώσεις της, με όριο ανίχνευσης τα 150 nM όπου λαμβάνεται σήμα περίπου 50 nA (Εικόνα 6.7). Αυτό είναι πολύ σημαντικό, καθώς δεν υπάρχει προς το παρόν άλλος αισθητήρας στο εμπόριο που να ανιχνεύει κατεχόλη σε τόσο μικρή συγκέντρωση. Επιπλέον, ο εν λόγω αισθητήρας όσο μεγαλύτερη συγκέντρωση κατεχόλης ανιχνεύει, τόσο υψηλότερο είναι και το σήμα που δίνει. Με άλλα λόγια, το ρεύμα είναι ανάλογο της ποσότητας της κατεχόλης και η σχέση μεταξύ τους είναι κατά προσέγγιση γραμμική (Εικόνα 6.8).

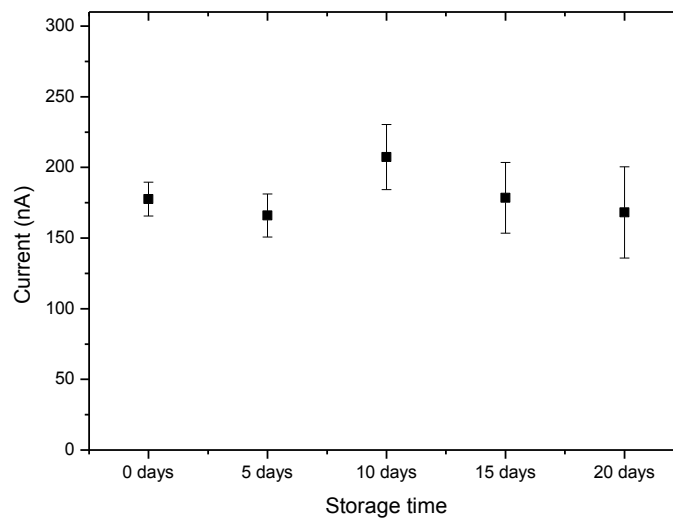


Εικόνα 6.7: Απόκριση του ενζυμικού αισθητήρα κάτω από διάφορες συγκεντρώσεις της κατεχόλης.



Εικόνα 6.8: Απόκριση διαφορετικών ενζυμικών αισθητήρων κάτω από κοινές συγκεντρώσεις της κατεχόλης.

Μία πολλή σημαντική ιδιότητα ενός βιοαισθητήρα είναι η αντοχή και η σταθερότητά του. Το γεγονός ότι μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί είναι από μόνο του μεγάλο πλεονέκτημα, καθώς οι περισσότεροι αισθητήρες της αγοράς είναι μίας χρήσης. Ο συγκεκριμένος αισθητήρας επιπλέον, μπορεί να συνεχίζει να ανιχνεύει κατεχόλη μέρες αφότου πραγματοποιηθεί η εκτύπωση του ενζύμου στο ηλεκτρόδιο εργασίας του SPE, αρκεί να διατηρηθεί στην ψύξη στους 4°C. Η αξιοπιστία του φαίνεται στην Εικόνα 6.9, όπου, με ελάχιστη διαφοροποίηση του σήματος, μπορεί να ανιχνεύει με συνέπεια την ίδια ποσότητα κατεχόλης, ακόμα και 20 μέρες μετά την εκτύπωση της λακάσης.

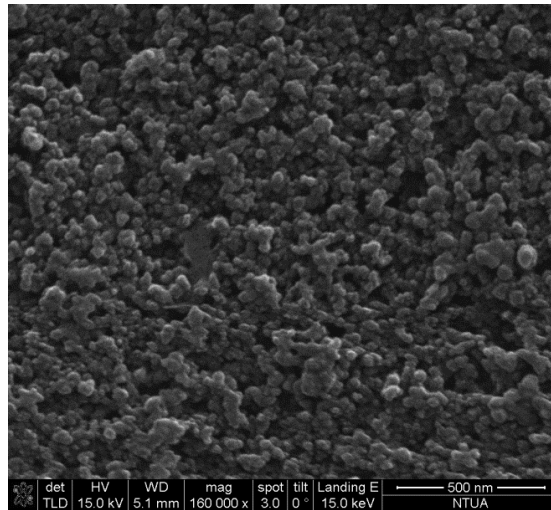


Εικόνα 6.9: Απόκριση του αισθητήρα, όπου ανίχνευσε 300 nM, κατεχόλης ύστερα από συγκεκριμένο διάστημα που ακολούθησε την εκτύπωση του ενζύμου στην επιφάνειά του.

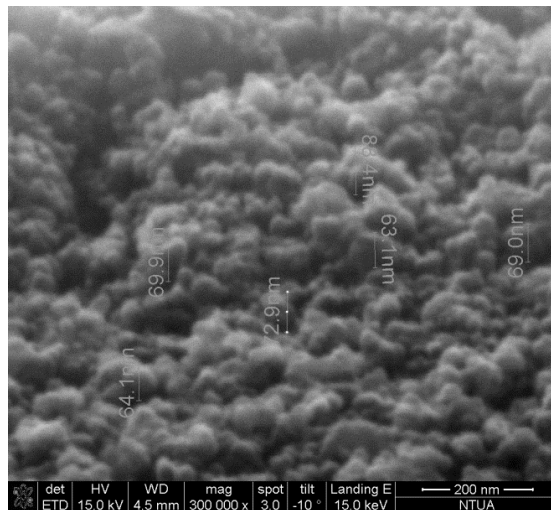
6.6 Αποτέλεσμα Εκτύπωσης στο Ηλεκτρόδιο Εργασίας

Παρακάτω ακολουθούν φωτογραφίες μικροσκοπίου ηλεκτρονικής σάρωσης (Scanning Electron Microscope) ενός ηλεκτροδίου εργασίας από γραφίτη όπου φαίνεται η μορφολογία του, πρώτα η κάτοψη (Εικόνα 6.10), στη συνέχεια το ίδιο ηλεκτρόδιο υπό γωνία (Εικόνα 6.11) και τέλος ξανά η κάτοψη όπου έχει γίνει η εκτύπωση του ενζύμου της λακάσης (Εικόνα 6.12). Η τραχύτητα του ηλεκτροδίου υπολογίστηκε από το προφιλόμετρο 67.5 nm με σφάλμα 8 nm και είναι ομολογουμένως μεγάλη.

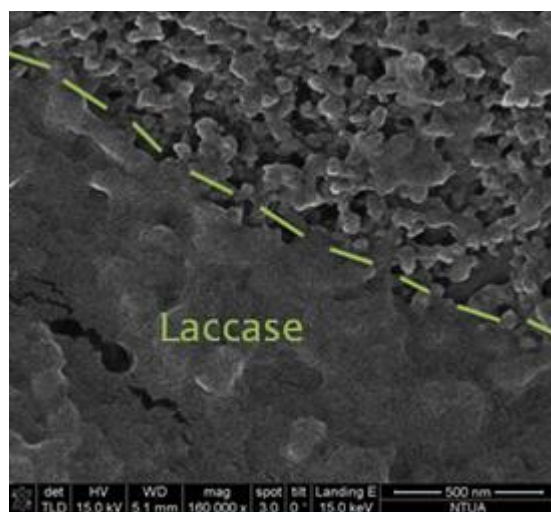
Ωστόσο είναι γνωστό από τις διεργασίες κατασκευής μικροσυστημάτων ότι όσο επεμβαίνει κανείς στην τραχύτητα μίας επιφάνειας, τόσο πιο υδρόφοβη γίνεται. Άρα είναι απορίας άξιο με ποιο τρόπο η λακάση όχι μόνο στέκεται στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου, αλλά είναι αδύνατο να αφαιρεθεί ακόμα και από αρκετές πλύσεις αυτού.



Εικόνα 6.10: Κάτοψη ενός ηλεκτροδίου γραφίτη.



Εικόνα 6.11: Ένα ηλεκτρόδιο γραφίτη υπό γωνία 80°.

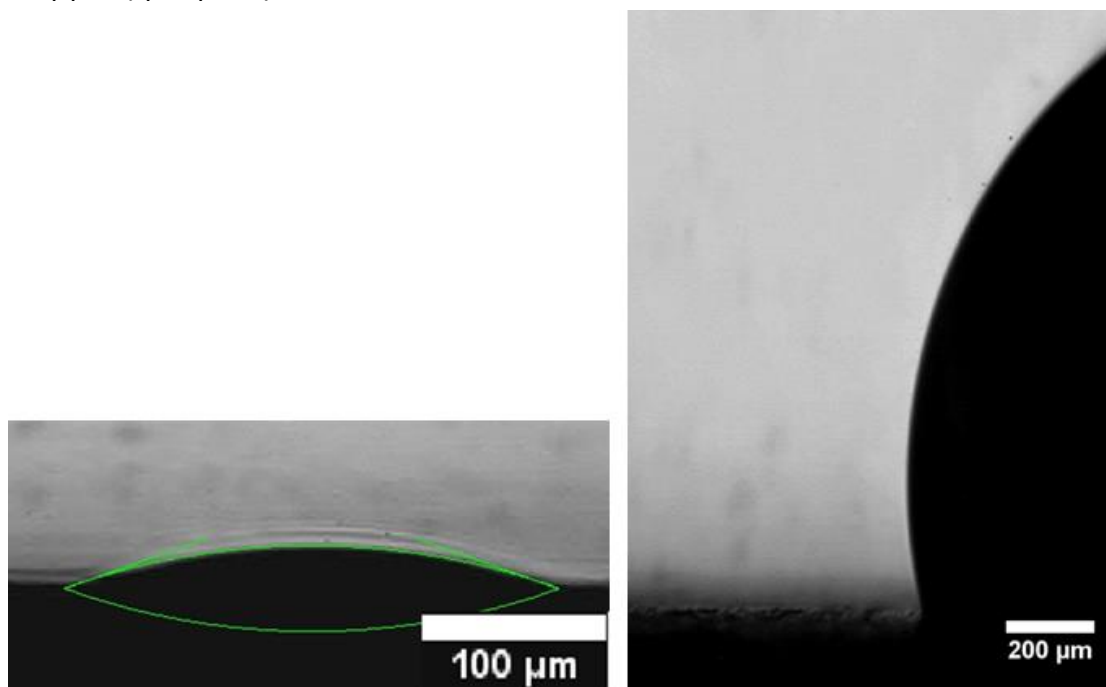


Εικόνα 6.12: Κάτοψη ενός ηλεκτροδίου γραφίτη όπου έχει γίνει η εκτύπωσή του με το ένζυμο της λακάσης.

Υπάρχουν δύο καταστάσεις διαβρεξιμότητας των επιφανειών. Η μία είναι η Cassie wetting state όπου το σταγονίδιο του υγρού προς εναπόθεση δεν μπορεί να εισέλθει ανάμεσα στα κενά που διακρίνουν μία τραχιά επιφάνεια λόγω του παγιδευμένου αέρα σε αυτά, με αποτέλεσμα το σταγονίδιο να είναι ανίκανο να απλωθεί και τελικά δημιουργεί μία σφαιρική μορφή, καθιστώντας την επιφάνεια υδρόφοβη. Στη Wenzel wetting state απεναντίας, το υγρό εισχωρεί μέσα στα κενά της επιφάνειας, με αποτέλεσμα η τελευταία να θεωρείται υδρόφιλη.

Εάν η εναπόθεση του ενζύμου της λακάσης γινόταν με τη χρήση πιπέτας, τότε θα ήταν σε Cassie wetting state. Με την τεχνική LIFT, η οποία αναγκάζει τα σταγονίδια του υγρού να ταξιδεύουν με ταχύτητες περίπου 70 m/s και κατά συνέπεια αυτά να ασκούν στο υπόστρωμα του αποδέκτη πιέσεις κοντά στα 3 MPa, το ένζυμο της λακάσης αναγκάζεται να εισχωρήσει στα κενά που αφήνει η τραχιά επιφάνεια του ηλεκτροδίου από γραφίτη με αποτέλεσμα να ακινητοποιείται πάνω της. Στην Εικόνα 6.12 που προηγήθηκε, μπορεί να παρατηρηθεί ότι η λακάση ακολουθεί τη μορφολογία της επιφάνειας του γραφίτη, κάτι το οποίο έρχεται σε πλήρη συμφωνία με τα προηγούμενα.

Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις γωνίας διαβρεξιμότητας τόσο από την εναπόθεση με πιπέτα όσο και από την τεχνική LIFT, της οποίας η πυκνότητα ενέργειας ρυθμίστηκε στα 450 mJ/cm².



Εικόνα 6.13: Αποτελέσματα μετρήσεων για τη γωνία διαβροχής από εκτύπωση του υλικού με την τεχνική LIFT και από εναπόθεση με πιπέτα αντίστοιχα.

Η γωνία διαβροχής από την τεχνική LIFT βρέθηκε 24.4°, ενώ η αντίστοιχη γωνία με την εναπόθεση του υλικού από πιπέτα βρέθηκε 95.2°, αρκετά μεγάλη σε σχέση με τη γωνία της άλλης μεθόδου.

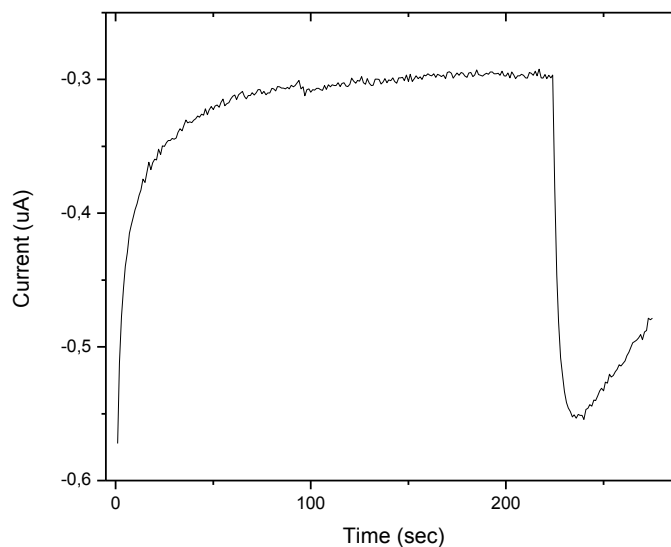
6.7 Ενζυμικοί Αισθητήρες για Περιβαλλοντικό Έλεγχο

Πέρα από τα οφέλη που μπορεί να προσφέρει ο βιοαισθητήρας που έχει ήδη αναπτυχθεί στην ανίχνευση πολυφαινόλων που θα μπορούσαν να ενταχθούν στο διαιτολόγιο εκατομμυρίων ανθρώπων, υπάρχει και μία τάση αξιοποίησης αυτού του είδους βιοαισθητήρων στον περιβαλλοντικό έλεγχο για έμμεση ανίχνευση φυτοφαρμάκων, ζιζανιοκτόνων, ορμονών οιστρογόνων, βαρέων μετάλλων, φαρμακευτικών προϊόντων κ.ά. [17]. Έχουν ήδη αναπτυχθεί ενζυμικοί αισθητήρες για ανίχνευση φυτοφαρμάκων [18–21], ζιζανιοκτόνων [22–25] και βαρέων μετάλλων [26–29].

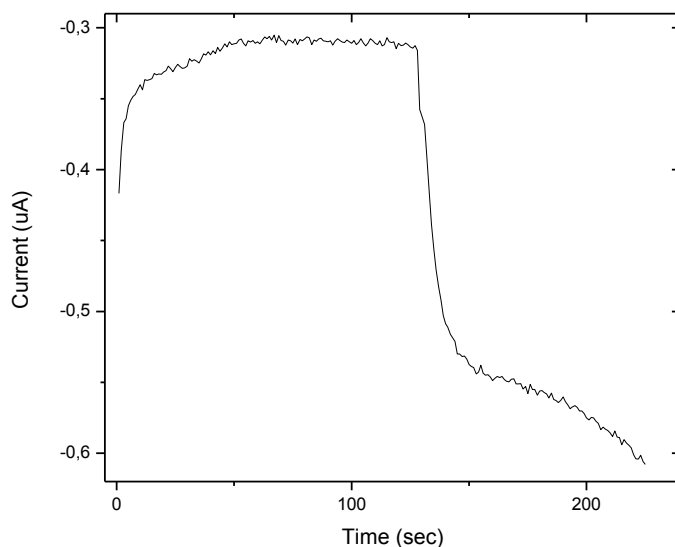
Στο συγκεκριμένο αισθητήρα, όπως έχει ήδη αναφερθεί, μόνο με την παρουσία της λακάσης μπορεί η κατεχόλη να οξειδωθεί και αυτή η αντίδραση να δώσει σήμα. Θα μπορούσαν οι παραπάνω προς ανίχνευση επικίνδυνες ουσίες να αποτελέσουν το εμπόδιο της αντίδρασης οξειδοαναγωγής αφού μπορούν να καταστείλουν τη δράση του ενζύμου. Με άλλα λόγια, εάν η λακάση δεν είναι ικανή να βοηθήσει στην οξείδωση της κατεχόλης, τότε σημαίνει ότι στο περιβάλλον υπάρχει μία ουσία που εμποδίζει τη δράση της. Ακολουθούν μετρήσεις αμπερομετρίας για ανίχνευση του φυτοφαρμάκου Diuron και των ιόντων μολύβδου.

6.7.1 Ανίχνευση Diuron με τον Ενζυμικό Αισθητήρα

Ακολουθούν μετρήσεις αμπερομετρίας για ανίχνευση του φυτοφαρμάκου Diuron στο βιοαισθητήρα της λακάσης.



Εικόνα 6.14: Η ανίχνευση 750 nM κατεχόλης παρουσία 10 pM Diuron.

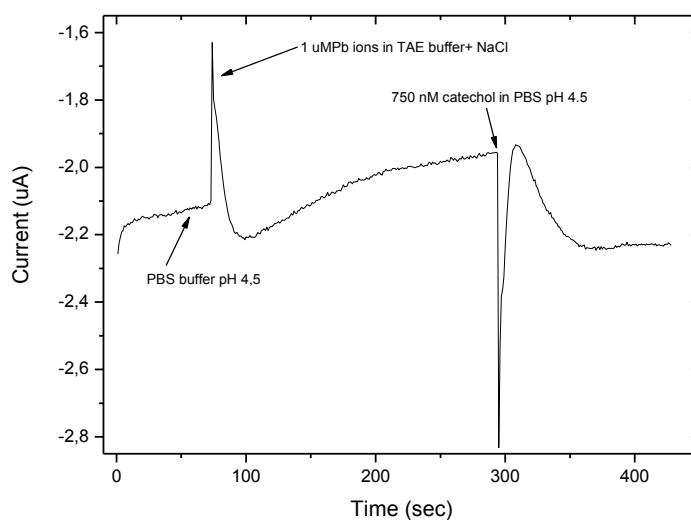


Εικόνα 6.15: Η ανίχνευση 750 nM κατεχόλης παρουσία 10 μM Diuron.

Δοκιμάστηκαν αρκετές συγκεντρώσεις, ωστόσο ο αισθητήρας φαινόταν ότι μπορούσε να ανιχνεύσει την κατεχόλη και παρουσία αυτής της ουσίας. Παραθέτονται γραφήματα δύο διαφορετικών συγκεντρώσεων του φυτοφαρμάκου.

6.7.2 Ανίχνευση Ιόντων Pb(II) με τον Ενζυμικό Αισθητήρα

Ο ίδιος αισθητήρας δοκιμάστηκε και για έμμεση ανίχνευση ιόντων μολύβδου. Τα αποτελέσματα δεν διαφέρουν με τα προηγούμενα και άρα ο συγκεκριμένος αισθητήρας δεν ενδείκνυται για αυτού του είδους τις ανιχνεύσεις προς το παρόν.



Εικόνα 6.16: Η ανίχνευση 750 nM κατεχόλης παρουσία 1 μM Pb^{2+} σε διάλυμα TAE + NaCl.

6.8 Αναφορές Κεφαλαίου

1. L. Loffredo, F. Violi, “Polyphenolic Antioxidants and Health”, *Chocolate and Health*, 77–85 (2012).
2. A. C. Cordova, B. E. Sumpio, “Polyphenols are medicine: Is it time to prescribe red wine for our patients”, *International Journal of Angiology*, **18**, 111–117 (2009).
3. I. C. W. Arts, P. C. H. Hollman, “Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies”, *American Journal of Clinical Nutrition*, **81**, 317–325 (2005).
4. K. B. Pandey, S. I. Rizvi, “Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease”, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2**, 270–278 (2009).
5. R. W. Owen, A. Giacosa, W. E. Hull, R. Haubner, B. Spiegelhalder, H. Bartsch, “The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil”, *European Journal of Cancer*, **36**, 1235–1247 (2000).
6. K. B. Pandey, S. I. Rizvi, “Protective effect of resveratrol on markers of oxidative stress in human erythrocytes subjected to in vitro oxidative insult”, *Phytotherapy Research*, **24**, S11–S14 (2010).
7. R. Maul, N. H. Schyebb, S. E. Kulling, “Application of LC and GC hyphenated with mass spectrometry as tool for characterization of unknown derivatives of isoflavonoids”, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **391**, 239–250 (2008).
8. N. Durán, M. A. Rosa, A. D’Annibale, L. Gianfreda, “Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review”, *Enzyme and Microbial Technology*, **31**, 907–931 (2002).
9. V. Carralero Sanz, M. L. Mena, A. González–Cortés, P. Yáñez–Sedeño, J. M. Pingarrón, Development of a tyrosinase biosensor based on gold nanoparticles-modified glassy carbon electrodes: Application to the measurement of a bioelectrochemical polyphenols index in wines”, *Analytica Chimica Acta*, **528**, 1–8 (2005).
10. M. Alcalde, “Laccases: Biological Functions, Molecular Structure and Industrial Applications”, J. Polaina, A. P. MacCabe (Eds.), *Industrial Enzymes: structure, function and applications*, Springer, New York, 459–474 (2007).
11. Y. Tan, W. Deng, B. Ge, Q. Xie, J. Huang, S. Yao, “Biofuel cell and phenolic biosensor based on acid-resistant laccase-glutaraldehyde functionalized chitosan-multiwalled carbon nanotubes nanocomposite film”, *Biosensors and Bioelectronics*, **24**, 2225–2231 (2009).
12. Y. Li, L. Zhang, M. Li, Z. Pan D. Li, “A disposable biosensor based on immobilization of laccase with silica spheres on the MWCNTs-doped screen-printed electrode”, *Chemistry Central Journal*, **6**, 103-1–103-8 (2012).

13. R. C. Minussi, G. M. Pastore, N. Duran, "Potential applications of laccase in the food industry", *Trends in Food Science & Technology*, **13**, 205–216 (2002).
14. Z. Xu, X. Chen, S. Dong, "Electrochemical biosensors based on advanced bioimmobilization matrices", *Trends in Analytical Chemistry*, **25**, 899–908 (2006).
15. R. A. Sheldon, "Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance", *Advanced Synthesis & Catalysis*, **349**, 1289–1307 (2007).
16. http://www.dropsens.com/en/screen_printed_electrodes_pag.html
17. V. Scognamiglio, I. Pezzotti, G. Pezzotti, J. Cano, I. Manfredonia, K. Buonasera, F. Arduini, D. Moscone, G. Palleschi, M. T. Giardi, "Towards an integrated biosensor array for simultaneous and rapid multi-analysis of endocrine disrupting chemicals", *Analytica Chimica Acta*, **751**, 161–170 (2012).
18. L. K. Shyuan, L. Y. Heng, M. Ahmad, S. A. Aziz, Z. Ishak, "Screen-printed biosensor with alkaline phosphatase immobilized in sol-gel/chitosan film for the detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid", *Sensor Letters*, **4**, 17–21 (2006).
19. A. Ishii, S. Takeda, S. Hattori, K. Sueoka, K. Mukasa, "Ultrasensitive detection of organophosphate insecticides by carbon nanotube field-effect transistor", *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **313–314**, 456–460 (2008).
20. M. K. Sezginurk, D. Odaci, N. Pazarlioglu, R. Pilloton, E. Dinckaya, A. Telefoncu, S. Timur, "Construction and Comparison of *Trametes versicolor* Laccase Biosensors Capable of Detecting Xenobiotics", *Artificial Cells, Blood Substitutes and Biotechnology*, **38**, 192–199 (2010).
21. E. F. Franca, F. L. Leite, R. A. Cunha, O. N. Oliveira Jr., L. C. G. Freitas, "Designing an enzyme-based nanobiosensor using molecular modeling techniques", *Physical Chemistry Chemical Physics*, **13**, 8894–8899 (2011).
22. J. Yan, H. Guan, J. Yu, D. Chi, "Acetylcholinesterase biosensor based on assembly of multiwall carbon nanotubes onto liposome bioreactors for detection of organophosphates pesticides", *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **105**, 197–202 (2013).
23. G. Csiffáry, P. Nagy, A. Kiss, N. Adányi, "New type biosensor for the detection of pesticides, based on the inhibition of acetylcholinesterase", *Acta Alimentaria*, **42**, 79–90 (2013).
24. C. Zhai, X. Sun, W. Zhao, Z. Gong, X. Wang, "Acetylcholinesterase biosensor based on chitosan/prussian blue/multiwall carbon nanotubes/hollow gold nanospheres nanocomposite film by one-step electrodeposition", *Biosensors and Bioelectronics*, **42**, 124–130 (2013).
25. L. F. Sgobbi, V. D. Pinho, M. F. Cabral, A. C. B. Burtoloso, S. A. S. Machado, "Hydrazone molecules as mimics for acetylcholinesterase. A new route

- towards disposable biosensors for pesticides”, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **182**, 211–216 (2013).
26. C. Durrieu, C. Tran–Minh, J. M. Chovelon, L. Barthet, C. Chouteau, C. Vedrine, “Algal biosensors for aquatic ecosystems monitoring”, *EPJ Applied Physics*, **36**, 205–209 (2006).
27. D. Bagal–Kestwal, M. S. Karve, B. Kakade, V. K. Pillai, “Invertase inhibition based electrochemical sensor for the detection of heavy metal ions in aqueous system: Application of ultra-microelectrode to enhance sucrose biosensor's sensitivity”, *Biosensors and Bioelectronics*, **24**, 657–664 (2008).
28. M. R. Guascito, C. Malitesta, E. Mazzotta, A. Turco, “Screen-printed glucose oxidase-based biosensor for inhibitive detection of heavy metal ions in a flow injection system”, *Sensor Letters*, **7**, 153–159 (2009).
29. N. Verma, H. Kaur, S. Kumar, “Whole cell based electrochemical biosensor for monitoring lead ions in milk”, *Biotechnology*, **10**, 259–266 (2011).

Συμπεράσματα

Στην παρούσα εργασία αναπτύχθηκαν ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες από τους εμπορικούς αμπερομετρικούς αισθητήρες της DropSens με τη τεχνική απευθείας μικροεναπόθεσης με λέιζερ (LIFT). Οι βιοαισθητήρες ήταν ικανοί να ανιχνεύσουν το ηλεκτροχημικό σήμα που προκύπτει από την υβριδοποίηση των ακινητοποιημένων (probe) αλυσίδων με τις πλήρως συμπληρωματικές τους αλυσίδες στόχους (target), χάρη στην αντίδραση οξειδοαναγωγής που προκαλεί ένα ζεύγος οξειδοαναγωγής (redox pair).

Ωστόσο, όταν οι ακινητοποιημένες αλυσίδες και οι συμπληρωματικές τους αντιπροσώπευαν τις αλληλουχίες που διαθέτουν την πληροφορία να προκαλέσουν καταλυτική αντίδραση και άρα τη διάσπαση της ήδη υβριδοποιημένης δίκλωνης αλυσίδας (οι αλληλουχίες με αυτή την ιδιότητα λέγονται απτίνες) παρουσία ιόντων μολύβδου, ο αισθητήρας δεν έδωσε κανένα ηλεκτροχημικό σήμα, ούτε κατόπιν μετρήσεων αμπερομετρίας ούτε κυκλικής βολταμετρίας. Όταν παρατηρήθηκε σε μικροσκόπιο φθορισμού μόνο με την ακινητοποιημένη αλυσίδα (oligo 1), διαπιστώθηκε ότι το ηλεκτρόδιο εργασίας από χρυσό που αποτελεί τον αμπερομετρικό αισθητήρα δεν ήταν ικανό να προσδέσει την αλληλουχία στην επιφάνειά του και άρα πρακτικά ο αισθητήρας δεν είχε βιοϋποδοχέα. Θα πρέπει να γίνει στο μέλλον εκτενέστερη μελέτη για κάποιο ενδεχόμενο πολύπλοκο σύμπλοκο το οποίο θα είναι ικανό να προσδέσει τα oligo 1 στην επιφάνεια του χρυσού ηλεκτροδίου εργασίας, και για αυτό το σκοπό υπάρχουν αναφορικά κάποιες εργασίες που κινήθηκαν προς αυτή την κατεύθυνση.

Τέλος, αναπτύχθηκε ένας ηλεκτροχημικός αισθητήρας για την ανίχνευση μίας φαινολικής ένωσης, της κατεχόλης, όπου εδώ ο βιοϋποδοχέας ήταν το ένζυμο της λακάσης. Ο εν λόγω βιοαισθητήρας έδωσε συνεπή αποτελέσματα στην απόκριση σήματος για τις ίδιες ή/και διαφορετικές συγκεντρώσεις της κατεχόλης και παρατηρήθηκε ότι είναι ικανός να μετρήσει και αρκετές μέρες μετά την εκτύπωση του ενζύμου στο ηλεκτρόδιο εργασίας από γραφίτη. Στη συγκεκριμένη επιφάνεια, αν και τραχιά, λόγω της τεχνικής LIFT, το ένζυμο μπορούσε να ακινητοποιηθεί επιτυχώς και ήταν αδύνατο να αφαιρεθεί και μετά από πλύσεις, καθιστώντας τον αισθητήρα επαναχρησιμοποιήσιμο. Πραγματοποιήθηκαν επιπλέον κάποιες μετρήσεις για να παρατηρηθεί έμμεση ανίχνευση ενός φυτοφαρμάκου, του Diuron, και των ιόντων Pb(II), αφού τα παραπάνω θα μπορούσαν να καταστείλουν τη δράση του ενζύμου και εν τέλει να μην ανιχνεύσει ο αισθητήρας την κατεχόλη. Παρόλα αυτά, και με την παρουσία αυτών, ο αισθητήρας ήταν σε θέση να ανιχνεύσει την κατεχόλη. Δύο πιθανές εξηγήσεις θα μπορούσαν να είναι ότι είτε το ένζυμο ήταν πολύ ανθεκτικό είτε οι συγκεντρώσεις των έμμεσων αναλυτών ήταν πολύ μικρές για να επέμβουν στη δράση του ενζύμου. Ωστόσο, αύξηση του ορίου ανίχνευσης δεν συνεπάγεται αξιοποίηση του αισθητήρα.

Δημοσιεύσεις Αποτελεσμάτων

- M. Chatzipetrou, G. Tsekenis, **A. Gkouzou**, S. Chatzandroulis, V. Tsouti, I. Zergioti, “LIFT as an advanced tool for the fabrication of an aptasensor for environmental monitoring”, Poster presentation, E-MRS 2013 Spring Meeting May 27th – 31st 2013, Strasbourg, France
- M. Chatzipetrou, E. Touloupakis, **A. Gkouzou**, I. Zergioti, “A high sensitivity polyphenol amperometric biosensor realized by Laser Induced Forward Transfer”, Oral Presentation, COST Annual MC&WG Meeting TD1102 April 10th – 12th 2013, Antwerp, Belgium
- M. Chatzipetrou, E. Touloupakis, **A. Gkouzou**, I. Zergioti, “An Enzyme biosensor for food quality monitoring”, Oral presentation, 12th International Conference on Laser Ablation (COLA 2013) October 6th – 11st 2013, Ischia, Italy (submitted)
- M. Chatzipetrou, G. Tsekenis, **A. Gkouzou**, I. Zergioti, “Heavy metal ions biosensor via Laser printing”, Oral presentation, 12th International Conference on Laser Ablation (COLA 2013) October 6th – 11st 2013, Ischia, Italy (submitted)
- E. Touloupakis, M. Chatzipetrou, C. Boutopoulos, **A. Gkouzou**, I. Zergioti, “A polyphenol biosensor realized by laser printing technology”, Journal Paper, Sensors and Actuators B: Chemical (submitted)

