

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ DNA ΜΟΡΙΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΧΡΗΣΗ
ΑΚΟΥΣΤΙΚΟΥ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑ QCM-D**

ΕΛΕΥΘΕΡΙΟΣ ΔΕΙΚΤΑΚΗΣ

ΥΠΕΥΘ. ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΓΚΙΖΕΛΗ ΗΛΕΚΤΡΑ, Ph.D

ΗΡΑΚΛΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2012

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. <u>ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ</u>	3
2. <u>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</u>	4
2.1 Ακουστικός Βιοαισθητήρας (QCM-D)	4
2.2 DNA	6
2.3 Gold Nanoparticles (Au-NPs)	7
3. <u>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</u>	10
3.1 Υλικά	10
3.2 Μέθοδοι	11
3.2.1 Προετοιμασία	11
3.2.2 Πειραματικές διαδικασίες	11
3.2.3 Δημιουργία ssDNA-AuNPs	13
3.3 Απεικονίσεις	14
4. <u>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ</u>	19
4.1 Νιουτραβιδίνη	19
4.2 Πρώτος κλώνος DNA (mir159b)	19
4.3 Δεύτερος κλώνος DNA (mir159 FC, Y, Long)	21
4.4 Δίκλινα μόρια FC-, Y-, L- DNA	21
4.5 Σταθερές Ισορροπίας Y- και L-DNA	24
4.6 Αντικατάσταση Y- με L- DNA	27
4.7 SH-Y-DNA και Ανεστραμμένο Y-DNA	28
4.8 Φωτομέτρηση ssDNA-AuNPs	31
5. <u>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</u>	32
6. <u>ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ</u>	33
7. <u>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</u>	34

1. ΣΚΟΠΟΣ

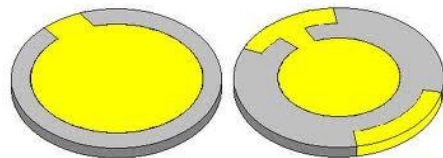
Ο σκοπός αυτής της πτυχιακής εργασίας ήταν μια προσπάθεια αύξησης της ευαισθησίας ανίχνευσης μιας συγκεκριμένης κατηγορίας βιομορίων, των δεοξυριβονουκλεϊκών οξέων (DNA), επάνω στην επιφάνεια του ακουστικού βιοαισθητήρα QCM-D. Το σημαντικό σημείο της πειραματικής διαδικασίας ήταν να προσπαθήσουμε να αναπτύξουμε μια μεθοδολογία, και ενδεχομένως, μια διαγνωστική τεχνική, όπου με την χρήση του QCM-D, χωρίς να αυξήσουμε την ποσότητα του δείγματος με τους κλασσικούς τρόπους (PCR), να ενισχύσουμε το σήμα που λαμβάνουμε από τον αισθητήρα. Απώτερος σκοπός άλλωστε ήταν να περάσουμε από την ανίχνευση μικροποσοτήτων DNA στην ανίχνευση μικροποσοτήτων microRNA και για αυτό τον λόγο και η επιλογή των DNA μορίων για τα πειράματα ήταν ανάλογη. Ο τρόπος, με τον οποίον θα το επιτυγχάναμε αυτό, ήταν με την χρήση νανοσφαιριδίων χρυσού (Gold Nanoparticles, Au-NPs) και θα τον αναλύσουμε στην συνέχεια. Στο παρελθόν είχαν γίνει προσπάθειες από το εργαστήριο της Δρ. Γκιζελή, επάνω στο συγκεκριμένο έργο, ωστόσο ο σχεδιασμός των πειραμάτων δεν έφερε κανένα αποτέλεσμα. Η παρούσα εργασία επίσης απέτυχε στην χρήση των Au-NPs για την ενίσχυση του σήματος από τον βιοαισθητήρα, ωστόσο έγιναν κατανοητά σημαντικά πράγματα πάνω βιοφυσική συμπεριφορά των DNA μορίων, στην υβριδοποίηση τους και στην διάταξη επάνω στην επιφάνεια (conformation) καθώς και μια εικονική ενίσχυση του σήματος χρησιμοποιώντας παραλλαγές των βιομορίων αυτών.

2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

2.1 Ακουστικός βιοαισθητήρας QCM-D

Οι βιοαισθητήρες είναι μικρές συσκευές που χρησιμοποιούν βιολογικές αντιδράσεις για την ανίχνευση μορίων- στόχων (αναλύτες). Τέτοιου είδους μηχανήματα συνδέουν το στοιχείο της βιολογικής αναγνώρισης με έναν φυσικό μεταγωγέα ο οποίος μεταφράζει την βιοαναγνώριση σε ένα ηλεκτρικό μετρήσιμο σήμα. Οι βιοαισθητήρες ανίχνευσης συγγένειας (Bioaffinity devices) βασίζονται στην επιλεκτική πρόσδεση του αναλύτη στο μόριο προσδέτη που βρίσκεται στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα. Αντίθετα οι βιοκαταλυτικοί βιοαισθητήρες χρησιμοποιούν κάποιο ακινητοποιημένο ένζυμο για αναγνώριση και κατάλυση του υποστρώματος-στόχου και την μετατροπή του σε προϊόν. Οι βιοαισθητήρες υβριδοποίησης βασίζονται στην ακινητοποίηση μονόκλωνων αλυσίδων DNA (ssDNA) πάνω στην επιφάνεια του μεταγωγέα και η μοριακή αναγνώριση γίνεται μέσω της υβριδοποίησης του γνωστού ανιχνευτή με την άγνωστη αλληλουχία-στόχο δημιουργώντας το αντίστοιχο σήμα, σε πραγματικό χρόνο.^{1,2} Σε αυτόν τον τομέα οι ακουστικοί βιοαισθητήρες έχουν βρει ευρεία εφαρμογή όπως για την εξερεύνηση άλλων αλληλεπιδράσεων του DNA, συμπεριλαμβανομένου της πρόσδεσης πρωτεΐνης πάνω σε αυτό, της παρακολούθησης ενζυματικών διεργασιών και αντιδράσεων ή ακόμα για την παρακολούθηση της πρόσδεσης αντικαρκινικών φαρμάκων πάνω στο DNA στα πλαίσια της διαγνωστικής ιατρικής έρευνας.⁷ Ο βιοαισθητήρας που χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα της εργασίας αυτής, ήταν το μοντέλο Q-sense® D-300 της Q-sense® Corporation (Sweden). Αυτός ο ακουστικός βιοαισθητήρας είναι ένα “Quartz Crystal Microbalance with Dissipation monitoring” (QCM-D) σύστημα, το οποίο μπορεί να ανιχνεύσει με εξαιρετική ακρίβεια την αύξηση ή μείωση μάζας, καθώς επίσης και τις αλλαγές στην ιξωδοελαστικότητα επάνω στην επιφάνεια του κρυστάλλου.³

Από την κάτω πλευρά της κυκλικής επιφάνεια του κρυστάλλου, εφαρμόζεται συνεχής τάση ηλεκτρικού ρεύματος μέσω 2 ηλεκτροδίων σε αντιδιαμετρικά σημεία. Αυτό δημιουργεί ένα ακουστικό κύμα επάνω στην επιφάνεια καθώς τα μόρια της ξεκινούν να ταλαντώνονται. Το βάθος εισχώρησης (δ) είναι η απόσταση στην οποία φτάνει το ακουστικό κύμα πάνω από τον κρύσταλλο και μέσα στο δείγμα, μέχρι η ενέργεια του να μειωθεί στο $1/e$ της αρχικής του ενέργειας. Η εξίσωση για τον υπολογισμό του δ είναι η $\delta = (2\eta/\rho\omega)^{1/2}$, όπου η και ρ είναι η ιξωδοελαστικότητα και πυκνότητα του δείγματος, αντίστοιχα. Σύμφωνα με τις ρυθμίσεις για τα πειράματα μας το εγκάρσιο ακουστικό κύμα που εισέρχεται μέσα στο υγρό, αποσβάνει με μήκος $\sim 200\text{nm}$.⁴ Ο QCM-D λειτουργεί σε πραγματικό χρόνο και παρέχει 200 data points/



Εικόνα 1. Κρύσταλλοι συστοιχίας (Chip)

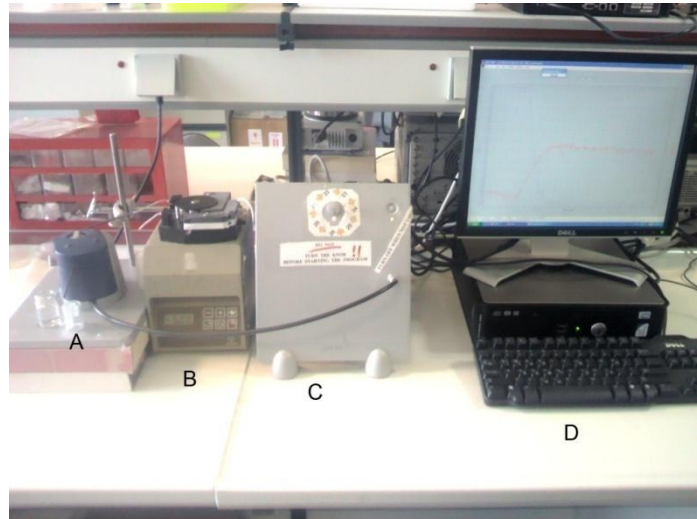
δευτερόλεπτο.³ Η θεμελιώδης συχνότητα του ακουστικού κύματος είναι 5MHz ενώ στα πειράματα χρησιμοποιήθηκε η 7^η αρμονική (35MHz) για να παρακολουθήσουμε με μεγαλύτερη ακρίβεια τις αλλαγές στο ακουστικό κύμα.

Το σήμα λοιπόν που λαμβάνουμε από τον βιοαισθητήρα, οφείλεται στις αλλαγές που συμβαίνουν επάνω από την επιφάνεια του κρυστάλλου. Η μεταβολή στην συχνότητα ταλάντωσης (ΔF) οφείλεται στην μάζα που μπορεί να προσδένεται επάνω από στην επιφάνεια ή να απελευθερώνεται από αυτή. Σε ιδανικές συνθήκες υπάρχει μια γραμμική σχέση μεταξύ της αλλαγής στην συχνότητα και στην προστιθέμενη μάζα: $\Delta m = (C_f / n) \times \Delta F$ όπου $C_f = 17.7 \text{ ng} / (\text{cm}^2 \text{ Hz})$ είναι η σταθερά ευαισθησίας μάζας για $f = 5 \text{ MHz}$ και $n (=1,3,..)$ είναι ο αριθμός της αρμονικής στην οποία γίνεται η μετρηση.^{4,5} Η μεταβολή στην απόσβεση της ενέργειας του κύματος (Energy Dissipation), ΔD , είναι το αποτέλεσμα των αλλαγών στην ιξωδοελαστικότητα της επιφάνειας.

Όπως έχει παρατηρηθεί από προηγούμενες μελέτες^{6,7,8} και όπως θα δούμε και στα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών, στον ακουστικό βιοαισθητήρα QCM-D, ο λόγος $\Delta D / \Delta F$, δηλαδή η απώλεια ενέργειας ταλάντωσης του ακουστικού κύματος ανά μονάδα- συζευγμένης με την επιφάνεια- μάζας, είναι ιδιαίτερα σημαντικός καθώς μπορεί να περιγράψει τον τρόπο (conformation) με τον οποίον κάθεται ένα μόριο πάνω στην επιφάνεια. Επιπλέον για τα μόρια DNA, τα οποία μπορούν να χαρακτηριστούν ως πολυμερή⁹, μπορούμε να τονίσουμε την σημασία της διάκρισης τους ανάλογα με το μέγεθος και σχήμα τους μέσω του λόγου αυτού πχ μονόκλωνο/ δίκλωνο DNA, κυκλικό/ γραμμικό DNA, μεγάλο/ μικρό DNA κ.α. Στην συνέχεια, θα προσπαθήσουμε να αναλύσουμε λεπτομερώς το μόριο του DNA και την σχέση του με τον QCM-D.

Ο βιοαισθητήρας Q-sense® D-300 είναι χωρισμένος σε 2 διακριτά μέρη: τη μηχανική Θαλάμη (Chamber) και την Ηλεκτρονική Μονάδα. Εντός της Θαλάμης τοποθετείται ο κρύσταλλος, πάνω από τον οποίον περνά το δείγμα με σταθερή ροή, με την βοήθεια μιας περισταλτικής αντλίας Gilson®. Μέσα στην Θαλάμη, πριν το δείγμα φτάσει στην επιφάνεια του κρυστάλλου, περνά μέσα από θερμαινόμενες σπείρες, ώστε να ρυθμιστεί η θερμοκρασία του δείγματος, στην θερμοκρασία του κρυστάλλου (~25°C). Αυτό μειώνει τον κίνδυνο για πειραματικά σφάλματα στην μέτρηση των τιμών ΔF και ΔD . Το σήμα του ακουστικού κύματος μεταφέρεται από την θαλάμη στην Ηλεκτρονική Μονάδα μέσω καλωδίου, οπού και επεξεργάζεται και καταγράφεται. Η Ηλεκτρονική Μονάδα συνδέεται με Η/Υ, στον οποίον με το κατάλληλο πρόγραμμα (Q-soft® 301), οι τιμές Συχνότητας και Απόσβεσης Ενέργειας του ακουστικού κύματος προβάλλονται. Μετά το τέλος κάθε πειραματικής διαδικασίας τα δεδομένα αποθηκεύονται και τροποποιούνται καταλλήλως.

- A. Θαλάμη (Chamber)
- B. Περισταλτική Αντλία
- C. Ηλεκτρονική Μονάδα
- D. Η/Υ



Εικόνα 2. QCM-D

2.2 DNA

Χρησιμοποιώντας τον QCM-D για την ανίχνευση της DNA υβριδοποίησης απαιτείται η ιδιαίτερη τοποθέτηση του ανιχνευτή (probe) ssDNA πάνω στην επιφάνεια του μεταγωγέα, χωρίς φυσικά αυτό να χάσει την βιολογική του ενεργότητα ή τον κατάλληλο προσανατολισμό για την υβριδοποίηση με το μόριο-στόχο.¹⁰ Πάνω στην επιφάνεια χρυσού του κρυστάλλου υπάρχουν διάφοροι τρόποι τοποθέτησης του ιχνηθετη.¹¹ Στα πειράματά μας χρησιμοποιήσαμε δυο από αυτούς τους τρόπους. Ο πρώτος τρόπος περιελάμβανε τη χρήση DNA, το οποίο στο 5' άκρο του έχει μια ομάδαθειόλης (-SH group) και η οποία προήγαγε άμεσα την αυτόσυγκρότηση των μορίων πάνω στην επιφάνεια του κρυστάλλου συστοιχίας. Ο δεύτερος τρόπος περιελάμβανε την χρήση DNA, το οποίο στο 5' άκρο του είχε ένα μόριο βιοτινής (biotin) και η οποία προσδενόταν στις διαθέσιμες θέσεις που παρείχε ένα στρώμα από Νιουτραβιδίνες (Neutravidins) το οποίο κάλυπτε την επιφάνεια. Η νιουτραβιδίνη, είναι μια σφαιρική πρωτεΐνη με pI 6.3, συνεπώς είναι αρνητικά φορτισμένη σε pH 7.5 όπου γίνονται τα πειράματά μας, κάτι ιδιαίτερα σημαντικό καθώς ωθεί το αρνητικά φορτισμένο DNA να προσδεθεί με το 5' βιοτινιλιωμένο άκρο του στην θέση της Νιουτραβιδίνης. Έτσι αποφεύγονται οι μη ειδικές αλληλεπιδράσεις με την πρωτεΐνη καθώς επίσης διατηρείται μια αναλογία 1:1 μορίων Νιουτραβιδίνης και μορίων DNA.^{7,12c} Ακόμα με τον τρόπο αυτό, εξασφαλίζουμε την απομακρυσμένη παράταξη των μορίων και όχι τον σχηματισμό ομογενούς στρώματος⁶, όπως προκύπτει με τον πρώτο τρόπο. Οι φυσικοχημικές αλλαγές που συμβαίνουν στο μικροπεριβάλλον του μεταγωγέα κατά την υβριδοποίηση των ολιγονουκλεοτιδίων, μεταφράζονται σε ένα κατανοητό προς εμάς σήμα, σε πραγματικό χρόνο, κάτι ιδιαίτερα σημαντικό καθώς μπορεί να βοηθήσει στην μέτρηση της κινητικής της αντίδρασης.¹⁰

Υπάρχουν διάφοροι μέθοδοι υπολογισμού της καμπυλότητας ενός μορίου DNA όπως το τεστ κινητικότητας μέσω ηλεκτροφόρησης ή η διεργασία κυκλοποίησης του DNA (Cyclisation Assay), η κρυσταλλογραφία, η NMR ανάλυση και η τεχνική της AFM. Κάποιες από αυτές τις τεχνικές είναι χρονοβόρες, με δυσνόητα αποτελέσματα, με μικρό βάθος ανάλυσης και όχι εφαρμόσιμες για όλα τα μόρια DNA.^{12a} Πειραματικά, η εγγενής ιξοδοελαστικότητα $[\eta]$ (intrinsic viscosity) σχετίζεται άμεσα με τον ακουστικό λόγο $\Delta D/\Delta F^6$ και είναι χαρακτηριστική για κάθε μόριο, ανεξάρτητη από την επιφάνεια καλυψής^{12d} και εξαρτώμενη από τον υδροδυναμικό όγκο, σχήμα και γεωμετρικά χαρακτηριστικά του μορίου.⁸ Έτσι μπορούμε να κατανοήσουμε την σημασία του ακουστικού βιοαισθητήρα QCM-D, ο οποίος με το σήμα που μας δίνει, μας καθιστά ικανούς να μελετήσουμε την διάταξη του DNA στον χώρο, υπό όποιες συνθήκες ορίσουμε εμείς. Η εξίσωση Mark-Houwink ,για την $[\eta]$ προκύπτει μαθηματικά από τον τύπο $[\eta]=K \times M^\alpha$ όπου M το μοριακό βάρος και K,α είναι κάποιες παράμετροι οι οποίες προκύπτουν από τα γραμμικά log-log διαγράμματα της εξίσωσης.⁹

Τα ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήσαμε δεν είχαν τυχαία αλληλουχία. Όπως αναφέρθηκε ήδη, απώτερος σκοπός των πειραμάτων μας ήταν να περάσουμε από την ανίχνευση DNA στην ανίχνευση RNA, και πιο συγκεκριμένα θέλαμε να αυξήσουμε την ευαισθησία του βιοαισθητήρα ώστε να αντλαμβάνεται συγκεντρώσεις μικρότερες του 1nM. Έτσι λοιπόν χρησιμοποιήσαμε DNA ολιγονουκλεοτίδια, τα οποία έμοιαζαν με micro RNAs.

Τα micro RNAs (miRNAs) είναι μικρά, μη- κωδικά RNA μόρια¹³, 20-22 νουκλεοτιδίων και έχουν βρεθεί σε διάφορους οργανισμούς από φυτά μέχρι ανώτερα θηλαστικά. Λειτουργούν δομικά για την οργάνωση της χρωματινης¹⁴, ρυθμίζουν την μεταγραφή και/ή την μετάφραση¹⁵ ή ακόμα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φορείς γονιδιακής θεραπείας.¹⁶ Ο πιο συνήθης τρόπος δράσης των miRNAs είναι μέσω άμεσης καταστολής της μετάφρασης ή εμμέσως προάγοντας την αποικοδόμηση του αγγελιοφόρου RNA (mRNA).¹³ Μια οικογένεια miRNAs, ιδιαίτερα σημαντική για την ανάπτυξη του φυτού¹⁷ είναι η miR159. Υπάρχουν 3 γενετικοί τόποι που κωδικοποιούν τα 3 διαφορετικά μόρια miR159. Ο τρόπος με τον οποίον δρουν τα μόρια αυτά στο *A. thaliana* είναι στοχεύοντας την καταστολή έκφρασης 2 μεταγραφικών παραγόντων στην διαδικασία έκφρασης του αμψισικού οξέος (ABA) στα πλαίσια της ομοιόστασης του φυτού.¹⁷

2.3. Au-NPs

Η πολυπλοκότητα, η ευαισθησία, η επιλεκτικότητα, η αντοχή, το κόστος και η ευελιξία για τροποποίηση στην μεθοδολογία αποτελούν τους παράγοντες που καθιστούν την ανίχνευση του DNA μια αρκετά δύσκολη διαδικασία με τα συμβατά μέσα.^{18,19} Η χρήση ιχνηθετών με κάποιο χρωμοφόρο για την ανίχνευση DNA, όπως γίνεται στις μικροσυστοιχίες (microarrays), απαιτεί την επεξεργασία των μορίων

αυτών και των πολλαπλασιασμό των μορίων-στόχων πριν το πείραμα.^{18,20} Τέτοιες τεχνικές χρησιμοποιούνται για την αύξηση της ευαισθησίας και επιλεκτικότητας του συστήματος ανίχνευσης και βασίζονται στον πολλαπλασιασμό του δείγματος-στόχου μέσω PCR. Αντίθετα, η στρατηγική που σκοπεύαμε να ακολουθήσουμε στα δικά μας πειράματα ήταν αυτή της ενίσχυσης του σήματος του βιοαισθητήρα. Στην δική μας μεθοδολογία μια καταλυτική οντότητα (ssDNA- Au-NPs) χρησιμοποιείται για να πολλαπλασιάσει το σήμα (ΔF , ΔD) που προκύπτει από ένα μονάχα γεγονός μοριακής αναγνώρισης (υβριδοποίηση) μέσα στον βιοαισθητήρα (QCM-D).

Τα Au-NPs έχουν αποτελέσει, τον τελευταίο μισό αιώνα, πεδίο μελέτης για τα φυσικοχημικά, ηλεκτροχημικά και οπτικά χαρακτηριστικά τους. Έχει παρατηρηθεί ότι έχουν υψηλές και ακριβείς θερμοκρασίες τήξης, έχουν ιδιαίτερα δραστική επιφάνεια λόγω του χρυσού ενώ εμφανίζουν μεγάλη σταθερότητα όταν έχουν τροποποιηθεί.²¹ Δεν άργησε να γίνει αντιληπτό πως αυτά τα σφαιρίδια μπορούν να αποτελέσουν δομικούς λίθους στον σχεδιασμό πειραμάτων βιολογικού περιεχομένου. Η πληθώρα διαφορετικών τρόπων πρόσδεσης μορίων πάνω στην επιφάνεια τους, τα κατέστησε σημαντικό εργαλείο για την ανίχνευση βιομορίων.²² Τα τροποποιημένα- με πρωτεΐνες-στην επιφάνεια νανοσφαιρίδια, έχουν βρει εφαρμογή στην ανοσοκυτταροχημεία,²³ αντικαθιστώντας επαρκώς τεχνικές όπως η ELISA, ενώ νανοσφαιρίδια τροποποιημένα με DNA έχουν βρει εφαρμογή στην ανίχνευση μορίων DNA^{19,20,24,25}, ιόντων²⁶ και πρωτεϊνών²⁷. Ακόμα τέτοια τροποποιημένα νανοσφαιρίδια φαίνεται πως να αποτελέσουν πηγές για την κατασκευή νέων υλικών και πολυμερών υποστρωμάτων.^{28,29}

Τα τροποποιημένα με DNA Au-NPs- προβάλλουν πλεονεκτήματα σε σχέδια ανίχνευσης με τις συνεργατικές ιδιότητες πρόσδεση και κατάλυσης ενώ έχουν αντοχή και ευελιξία στις μεθόδους ενεργοποίησης της επιφάνειάς τους²⁰. Βλέποντας πως άλλες μέθοδοι που χρησιμοποιούν την σήμανση του DNA με ραδιοϊσότοπα ή με χρωμοφόρα, εμφάνιζαν σημαντικά προβλήματα, η χρήση των νανοσφαιριδίων χρυσού, σε ηλεκτροχημικό βιοαισθητήρα, αύξησε δραματικά το όριο ευαισθησίας του, ανιχνεύοντας DNA pico- και femto- Molar συγκέντρωσης.²⁵ Ακόμα, το όριο ανίχνευσης συγκέντρωσης DNA με τον οπτικό βιοαισθητήρα SPR1 είναι 1nM, το οποίο είναι ~100 φορές υψηλότερο από το όριο ανίχνευσης με την τεχνική του fluorescence imaging.³⁰ Χρησιμοποιώντας όμως τα νανοσφαιρίδια χρυσού, το όριο ανίχνευσης έφτασε στα 10 fM.²⁴ Ο ακουστικός βιοαισθητήρας QCM-D φαίνεται να προσφέρεται για μια σειρά από διεργασίες όπως παρακολούθηση αυτό-συγκροτούμενων διαδικασιών σε πραγματικό χρόνο, ανάλυση νάνο-υλικών καθώς και παρατήρηση των αλληλεπιδράσεων των νανοσφαιριδίων σε ποίκιλτες συνθήκες μικροπεριβάλλον³¹ κ.α, ωστόσο, από όσο γνωρίζω, μέχρι στιγμής δεν έχουν γίνει μελέτες ενίσχυσης του σήματος ανίχνευσης DNA με την βοήθεια Au-NPs.

Όταν χρησιμοποιήθηκαν τα DNA-Au-NPs για γονιδιακή ρύθμιση, αποκαλύφθηκαν και άλλες εξίσου σημαντικές ιδιότητες των τροποποιημένων σφαιριδίων περά από την σταθερότητα τους. Τα τροποποιημένα αυτά σφαιρίδια φαίνεται να προστάτευαν τα μόρια DNA της επιφάνειάς τους από την δράση των νουκλεασών.^{22,32} Επιπλέον από παλιότερα τα πειράματα³³ φαίνεται ότι μόνο τα ssDNAs και όχι τα dsDNAs μόρια προσροφούνται πάνω στα ενεργά νανοσφαιρίδια χρυσού. Η αντίδραση προσρόφησης των μορίων οφείλεται στην υδροφοβικότητα της επιφάνειας των νανοσφαιριδίων και όχι λόγω ηλεκτροστατικών δυνάμεων όπως πιστεύεται.

Το DNA μπορεί να τυλιχθεί γύρω από το νανοσφαιρίδια μέσω μη ειδικών αλληλεπιδράσεων, να αποκτήσει μια τυχαία τυλιχτή διαμόρφωση στον χώρο, ή να εκτίνεται προς τα έξω καθώς η πρόσδεση γίνεται μόνο, μέσω του ενός άκρου του (stretched).³⁴ Όπως αναφέρθηκε στην τοποθέτηση του ανιχνευτή πάνω στην επιφάνεια χρυσού ενός κρυστάλλου του QCM-D, έτσι και εδώ, η διαμόρφωση και το πακετάρισμα του DNA επηρεάζει άμεσα την υβριδοποίηση. Η ενέργεια που κερδίζεται από τον σχηματισμό του δεσμού, ανάμεσα στην θειόλη και στον χρυσό, προσφέρει σταθερότητα και αρκετό χώρο ώστε να προσδεθούν όσο γίνεται περισσότερα DNA μόρια. Η κινητικότητα των σφαιριδίων είναι πάντα αντιστρόφως ανάλογη της ποσότητας DNA που έχει προσδεθεί πάνω σε αυτά καθώς επίσης επηρεάζεται και από το μήκος των ολιγονουκλεοτιδίων που προστίθενται.³⁴

Τα DNA-AuNPs συστήματα ανίχνευσης έχουν πολλές μεταβλητές που μπορούν να ρυθμιστούν ώστε να επηρεάσουν την τελική δομή του πειράματος. Ξεκινώντας από την αλληλουχία του DNA, η οποία καλό είναι να έχει μικρή περιεκτικότητα σε Γουανίνες και Κυτοσίνες (G,C) ώστε να αποφεύγεται η περιέλιξη του μορίου πάνω στο νανοσφαιρίδιο³⁵ και το μήκος του, το οποίο μπορεί να ρυθμιστεί καταλλήλως ώστε το μόριο να έχει ένα ενδιάμεσο τμήμα (spacer) το οποίο να επεκτείνει το DNA μόριο προς τα έξω και να απομακρυνθεί η αλληλουχία αναγνώρισης του στόχου μακριά από την θετικά φορτισμένη επιφάνεια χρυσού^{35,36} φτάνουμε στην πολλαπλές ομάδες θειόλης³⁷ και στο μέγεθος των νανοσφαιριδίων, το οποίο μπορεί να τροποποιηθεί καταλλήλως ανάλογα με το πειραματικό σκοπό. Το αποτέλεσμα όλων αυτών επηρεάζει τις βασικές ιδιότητες του συστήματος ανίχνευσης αυξάνοντας την ποσότητα DNA πάνω στα σφαιρίδια καθώς και την ικανότητα πρόσβασης του συμπληρωματικού κλώνου για υβριδοποίηση.³⁴ Τα μικρά ολιγονουκλεοτίδια (<30nt) με μια ομάδα θειόλης στο άκρο τους, τα οποία μας ενδιαφέρουν άμεσα για τους πειραματικούς μας σκοπούς, παίρνουν την ξεδιπλωμένη μορφή και τα μόρια τείνουν να συμπυκνώνονται πάνω στο σφαιρίδιο.³⁸

Μετά από αρκετό καιρό συντήρησης, τα μη-τροποποιημένα Au-NPs, τείνουν να χάνουν την ενεργότατά τους, ενώ τα τροποποιημένα μπορεί να σχηματίσουν συσσωματώματα.³⁶ Οι κατάλληλες συνθήκες συντήρησης των DNA-AuNPs είναι σε χαμηλή θερμοκρασία, μικρή ιοντική ισχύ και όξινο προς ουδέτερο pH.³⁹

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Υλικά

Χρησιμοποιήθηκε ένας ακουστικός βιοαισθητήρας QCM-D (μοντέλο D-300) της Q-sense Corporation (Sweden). Στα πειράματα μας χρησιμοποιήθηκαν κρύσταλλοι με κάλυμμα χρυσού (AT-cut)⁴ με διάμετρο 1.4cm και 2nm πάχος. Η ενεργή επιφάνεια του κρυστάλλου ήταν περίπου 12,5mm². Οι κρύσταλλοι αγοράστηκαν από την Q-sense® Corp.

Το νερό που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των διαλυμάτων και για τον καθαρισμό του κρυστάλλου ήταν φιλτραρισμένο (Milli-Q) απιονισμένο νερό (17.9 MΩ cm).

Οι ταμπλέτες PBS (code number: P4417-100TAB) αγοράστηκαν από την Sigma-Aldrich® (Germany).

Η Νιουτραβιδίνη (Neutravidin, 60kDa, pI:6,3) αγοράστηκε από την Pierce® Biotechnology (USA) σε μορφή σκόνης και διαλύθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris (Trizma® hydrochloride buffer solution 1M, p.H 7.5), το οποίο αγοράστηκε από την Sigma-Aldrich®. Η αρχική συγκέντρωση της Νιουτραβιδίνης ήταν 5mg/ml.

Τα DNA μόρια αγοράστηκαν από την Friz Biochem® (Germany) σε μορφή σκόνης και διαλύθηκαν σε απιονισμένο νερό. Η αρχική συγκέντρωση (stock) των DNA μορίων ήταν 100μM (100pmoles/λ).

Τα νανοσφαιρίδια (Au-NPs) αγοράστηκαν από την Nanocs® (code no.:GP01-40-20) με αρχική συγκέντρωση $9 \cdot 10^{10}$ σφαιρίδια /mL.

Το στερεό χλωριούχο νάτριο, NaCl (58.44 g/mol) αγοράστηκε από την Merck® και διαλύθηκε σε απιονισμένο νερό. Η αρχική συγκέντρωση του ήταν 2M. Τα KH₂PO₄ και K₂HPO₄ αγοράστηκαν από την Sigma-Aldrich® (Germany) σε μορφή σκόνης και διαλύθηκαν σε απιονισμένο νερό. Το TCEP αγοράστηκε από την Biotium (USA) σε μορφή σκόνης και διαλύθηκε σε απιονισμένο νερό. Η αρχική συγκέντρωση του TCEP ήταν 100mM.

Στα πειράματα, το τελικό ρυθμιστικό διάλυμα για όλα τα μόρια (Neutravidin, DNAs, ssDNA-Au-NPs) ήταν το PBS (0.01 M phosphate buffer, 0.0027 M potassium chloride and 0.137 M sodium chloride, pH 7.4). Για την παρασκευή του, διαλύαμε μια ταμπλέτα μέσα σε 200 mL απιονισμένου νερού.

3.2 Μέθοδοι

3.2.1. Προετοιμασία

Πριν από κάθε πείραμα ήταν απαραίτητος ο καθαρισμός της θαλάμης και του κρυστάλλου. Την θαλάμη την στεγνώνουμε με Αέριο Άζωτο (N_2), ενώ το O-ring λάστιχο, καθαριζόταν με απιονισμένο νερό. Ο κρύσταλλος καθαριζόταν με αιθανόλη και ακετόνη και αφού το στεγνώνουμε με αέριο N_2 το τοποθετούσαμε στο μέσα στο Plasma Cleaner/Sterilizer[®] της εταιρίας Harrick. Το μηχάνημα αυτό βοηθά να καθαριστεί σε βάθος η επιφάνεια του χρυσού και να είναι ενεργή για τα πειράματα (etching). Το Plasma Cleaner ήταν συνδεδεμένο με μια αντλία αέρα (Harrick Varian 801 PlasmaFlo[®]) η οποία έλεγχε την πίεση εντός του μηχανήματος καθαρισμού. Όταν η πίεση έφτανε ~ 100 mTorr τότε χρησιμοποιώντας τις βαλβίδες την ανεβάζαμε και την σταθεροποιούσαμε στα ~ 600 mTorr ανοίγοντας την UV ακτινοβολία στην μέγιστη ισχύ για 5' για να κάνει το etching. Μετά το πέρας του καθαρισμού, τοποθετούσαμε τον κρύσταλλο επάνω στο O-ring λάστιχο μέσα στη θαλάμη με κατάλληλο προσανατολισμό για τα ηλεκτρόδια. Ο σωστός χειρισμός για το κράτημα του κρυστάλλου απαιτεί την χρήση τσιμπίδας έτσι ώστε να αποφευχθεί η καταστροφή της επιφάνειας του κρυστάλλου. Μετά την ασφάλιση του μέσα στην θαλάμη, και την τοποθέτηση αυτής πάνω στην βάση της, ο βιοαισθητήρας ήταν έτοιμος για χρήση.

3.2.2. Πειραματικές Διαδικασίες

Κατά την έναρξη του πειράματος ρυθμίζαμε την θερμοκρασία εντός της θαλάμης στους $\sim 25^\circ C$ και περνούσαμε το ρυθμιστικό διάλυμα PBS το οποίο θα έφτιαχνε ένα λεπτό στρώμα πάνω από την επιφάνεια. Η διαδικασία των πειραμάτων μας βασίζεται σε προηγούμενες μεθοδολογίες^{12b} για την χρήση του ακουστικού βιοαισθητήρα QCM-D. Στα περισσότερα πειράματα μας το πρώτο δείγμα που περνούσαμε ήταν η νιουτραβιδίνη 200μg/ml (3,3nM), η οποία με απλή προσρόφηση καθόταν πάνω στην επιφάνεια χρυσού καλύπτοντας όλη την ενεργή περιοχή του βιοαισθητήρα. Στην συνέχεια περνούσαμε το δεύτερο δείγμα το οποίο ήταν το 5'-βιοτινιλιωμένο- DNA (miR159b), το οποίο προσδενόταν μέσω της βιοτίνης στο στρώμα των νιουτραβιδίνης. Κάθε μόριο νιουτραβιδίνης έχει 4 θέσεις πρόσδεσης της βιοτίνης ωστόσο πειραματικά σε SPR⁷ έχει δειχτεί ότι μόνο μια θέση κατά μέσο όρο είναι διαθέσιμη. Το ιδιαίτερο σημείο εδώ ήταν πως φτιάχνοντας την ισόθερμη καμπύλη για το miR159b, ως πρώτο κλώνο, είδαμε ότι με 2pmol/μL (2μM) είχαμε πιάσει πλατό δηλαδή είχαν καταλειφθεί όλες οι διαθέσιμες θέσεις πρόσδεσης. Αυτό αποτελούσε πρόβλημα για τα πειράματα μας καθώς το φαινόμενο της στερεοχημικής παρεμπόδισης οδηγούσε στον μη-σηματισμό δίκλωνου DNA στο επόμενο βήμα. Επομένως, αυτό που έγινε ήταν να χρησιμοποιούμε την μισή ποσότητα πρώτου κλώνου και έτσι να έχουμε 50-60% κάλυψη θέσεων.

Στην συνέχεια περνούσαμε τον δεύτερο κλώνο προς υβριδοποίηση με το πρώτο. Ο δεύτερος κλώνος μπορούσε να είναι πλήρως συμπληρωματικός (miR159 FC) ή ημι-συμπληρωματικός (miR159 Y), όπου 7 νουκλεοτίδια στο 5' άκρο δεν ήταν συμπληρωματικά, με τον πρώτο κλώνο. Ακόμα στα πειράματα αντικατάστασης ως δεύτερο κλώνο χρησιμοποιήθηκε ένα μόριο DNA (miR159 Long), 80 βάσεων, του οποίου οι 21 βάσεις στο 3' άκρο ήταν πλήρως συμπληρωματικές με τον πρώτο κλώνο ενώ οι υπόλοιπες σχημάτιζαν μια κλειστή κυκλική δομή. Στα πειράματα αντικατάστασης θέλαμε να δούμε αν το Long DNA μπορούσε να αντικαταστήσει το Y-DNA, δηλαδή αν στις δεδομένες συνθήκες θερμοκρασίας και ιοντικής ισχύος, η πλήρης συμπληρωματικότητα ευνοείται της ημισυμπληρωματικής. Η επιλογή της κατασκευής του Long- DNA για τα πειράματα αυτά έγινε ώστε ο βιοαισθητήρας να αντιληφθεί την μάζα που προστίθεται η οποία είναι 3 φορές πάνω από την μάζα που ταυτόχρονα απομακρύνεται, λόγω αναδιάταξης του ds Y-DNA.

DNA	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ- ΕΙΔΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ	nt
mir159 b	5'-biotin- TAG AGC TCC CTT CAA TCC AAA -3'	21
mir159 FC	3'----- ATC TCG AGG GAA GTT AGG TTT -5'	21
mir159 Y	3'----- ATC TCG AGG GAA GTA TCC AAA -5'	21
mir159 Long	3'----- ATC TCG AGG GAA GTT AGG TTT (59nt)- 5'	80
mir159 S-Y	3'----- ATC TCG AGG GAA GTA TCC AAA - SH- 5'	21

Πίνακας 1. Τα DNA μόρια που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα.

Αυτή η διαδικασία ήταν ουσιαστικά ένας πρόδρομος της ενίσχυσης του σήματος και της τεχνικής με τα ssDNA-Au-NPs. Επάνω στα νανοσφαιρίδια θα τοποθετούσαμε τα μονόκλινα 5'-SH-Y-DNA, τα οποία θα προσδένονταν επάνω στον ανιχνευτή μας και περνώντας μετά το δείγμα με το πλήρως συμπληρωματικό DNA (miR159 FC) θα γινόταν η αντικατάσταση και θα απομακρύνονταν τα ssDNA-AuNPs. Γνωρίζοντας την μάζα των νανοσφαιριδίων, που απομακρύνθηκε, και με απλούς αναγωγικούς τύπους θα μπορούσαμε να υπολογίσουμε τα μόρια miR159 FC που προσδέθηκαν.

Μια τελευταία σειρά πειραμάτων ήταν η υβριδοποίηση του 5'-SH-Y-DNA με το miR159b, όταν το πρώτο βρίσκεται κολλημένο στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα μέσω της αλληλεπίδρασης της θειόλης (SH-group) και του χρυσού. Το αποτέλεσμα θα ήταν ένα ανεστραμμένο Y-DNA. Ο σκοπός αυτόν των πειραμάτων ήταν πρωτίστως να ελέγξουμε αν το αντιδραστήριο TCEP στις δεδομένες συνθήκες ενεργοποιεί την προστατευμένη ομάδα -SH του μορίου, για να αντιδράσει με τον χρυσό του κρυστάλλου (και κατ' επέκταση τον χρυσό των NPs), και κατά δεύτερον να παρατηρήσουμε τυχόν διαφορές στην διάταξη του Y- και του ανεστραμμένου Y-DNA.

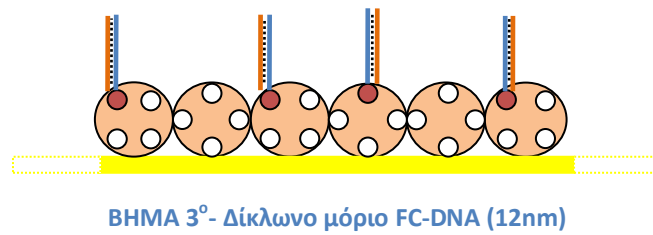
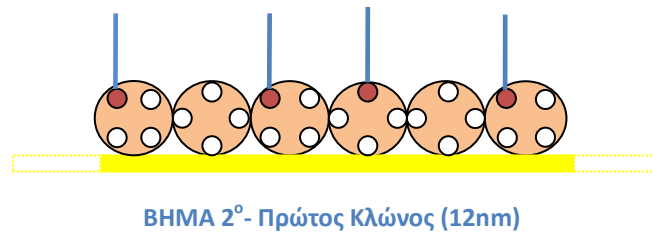
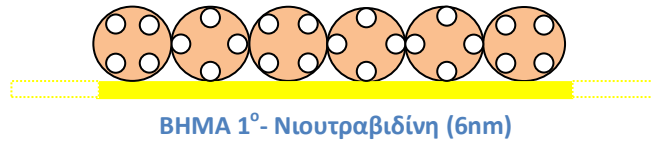
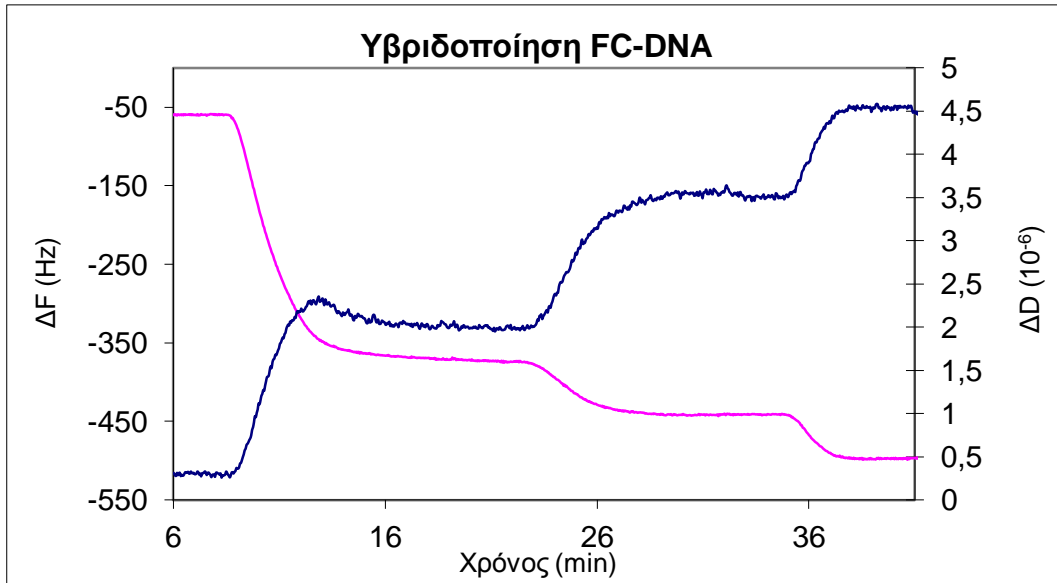
3.2.2. Δημιουργία ssDNA-Au-NPs

Όσον αφορά την δημιουργία των νανοσφαιριδίων, τα οποία έχουν στην επιφάνεια τους μονόκλινα DNA μόρια (ssDNA-AuNPs), στηριχτήκαμε στο πρωτόκολλο των A.W. Wark και H.J. Lee²⁴ με κάποιες βασικές τροποποιήσεις. Κατά αρχάς, χρησιμοποιήθηκε ζυγός ακριβείας για την μέτρηση 2,922g NaCl, τα οποία διαλύθηκαν σε 25mL απιονισμένο νερό για την παρασκευή διαλύματος NaCl (2M). Ακόμα μετρήθηκαν 0,1558g K₂HPO₄ και 1,0373g K₂HPO₄ για την παρασκευή 100mL ρυθμιστικού διαλύματος PB (0,5M, pH 7,4) και 0,14332g TCEP, τα οποία διαλύθηκαν σε 5mL απιονισμένου νερού, ενώ με διαδοχικές αραιώσεις το διάλυμα έφτασε σε τελική συγκέντρωση 100μM. Μετά από 3 αποτυχημένες προσπάθειες, λόγω των σφαιριδίων, το πρωτόκολλο το οποίο ενδέχεται να δώσει μελλοντικά αποτελέσματα είναι το ακόλουθο:

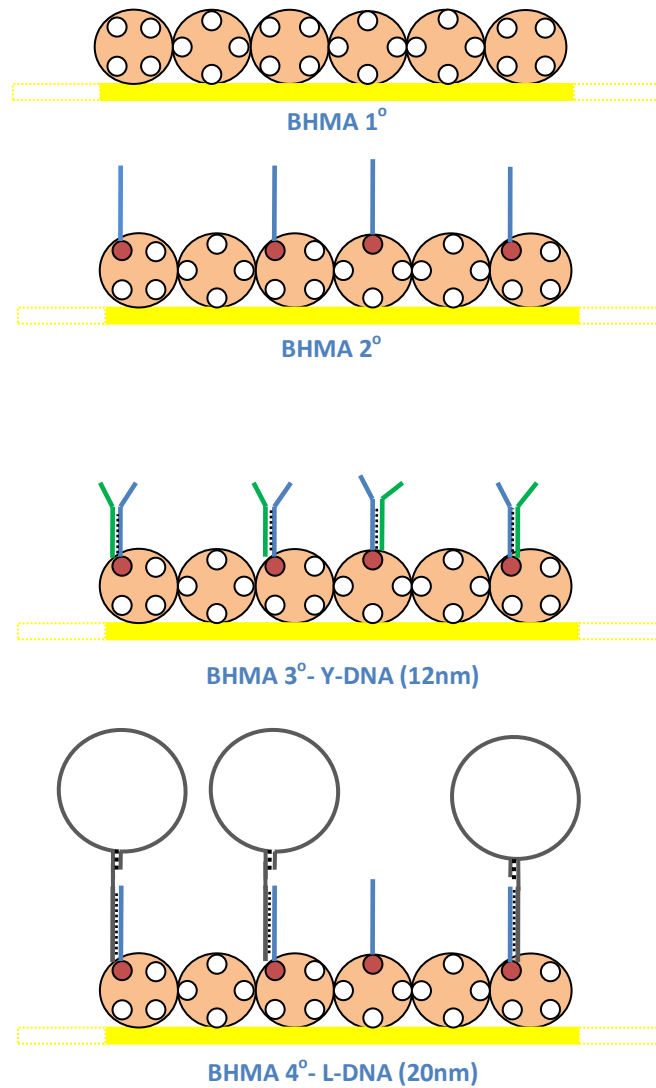
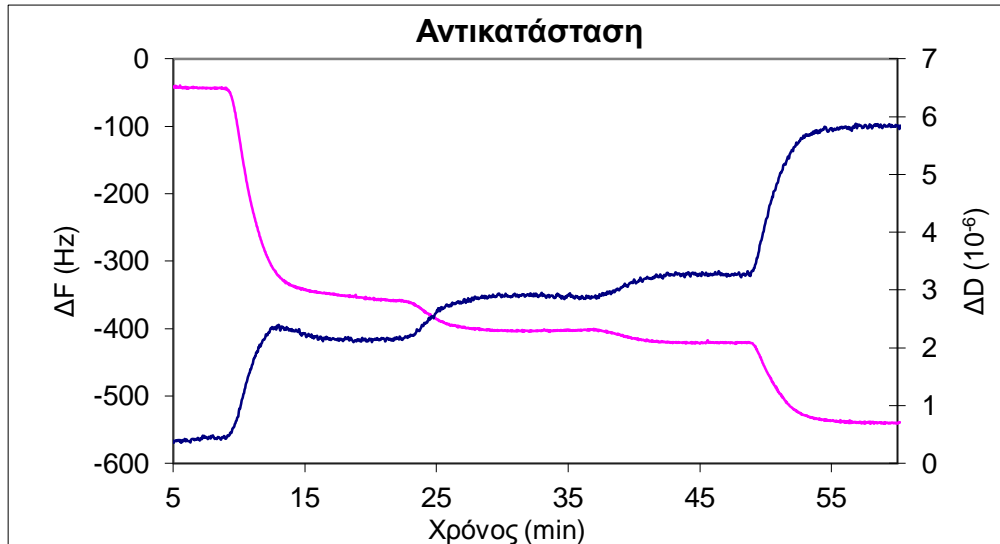
Θέλουμε να παρασκευάσουμε 900μL διαλύματος Au-NPs σε PB (100mM) Προσθέτουμε λοιπόν 190μL PB(0,5M), 500μL Au-NPs (9×10^{10} pt/ml), 210μL απιονισμένο νερό. Παράλληλα έχουμε αναμίξει 50λ από το 5'-SH-DNA(100μM) με 50μL από το TCEP(100μM) και περιμένουμε 5-10 λεπτά να δράσει το TCEP. Η αναλογία DNA:TCEP μπορεί να είναι 1:1-1:3. Έπειτα αναμιγνύουμε τα διαλύματα και αφήνουμε το τελικό διάλυμα (1mL) overnight στους 37°C. Την επόμενη μέρα προσθέτουμε 150μL ρυθμιστικού διαλύματος (1M NaCl / 100mM PB), δηλαδή 75μL NaCl (2M), 30μL PB (0,5M) και 45μL H₂O και άλλα 350μL απιονισμένο νερό. Το διάλυμα (1,5mL) πρέπει να φυλαχθεί για 24h πάλι στους 37°C. Μετά το πέρας των ωρών, το διάλυμα φυγοκεντρείται στις 13.000 rpm για 40 λεπτά. Αφού αφαιρεθεί στην συνέχεια το υπερκείμενο, το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε 1mL ρυθμιστικού διαλύματος (100mM NaCl/100mM PB), δηλαδή προστίθενται 100μL NaCl(1M), 20μL PB(0,5M) και 880μL H₂O. Το βήμα αυτό επαναλήφτηκε 3 φορές και το τελικό ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 0,5mL PBS. Με την προϋπόθεση ότι κατά τις απομακρύνσεις του υπερκειμένου δεν απομακρύνθηκαν σφαιρίδια, στο τελικό διάλυμα η συγκέντρωση τους θα πρέπει να είναι περίπου η ίδια με την αρχική. Από την άλλη, το DNA που δεν προσδέθηκε στα σφαιρίδια απομακρύνθηκε, επομένως η τελική συγκέντρωση σίγουρα θα είναι 10 φορές μικρότερη της αρχικής (100μM), λόγω αραιώσης, και ανάλογα με το ποσοστό που προσδέθηκε μπορεί να κυμαίνεται από 0,1μM μέχρι 10μM. Για τον ακριβή υπολογισμό μπορεί να χρησιμοποιηθεί φωτόμετρο, το οποίο στα 260nm μπορεί να υπολογίσει την οπτική πυκνότητα του DNA στο τελικό διάλυμα και να συγκριθεί με την οπτική πυκνότητα DNA διαλύματος γνωστής συγκέντρωσης. Αντίστοιχα για να υπολογιστεί η οπτική πυκνότητα των Au-NPs η φωτομέτρηση πρέπει να γίνει στα 510nm.

3.3 Απεικονίσεις

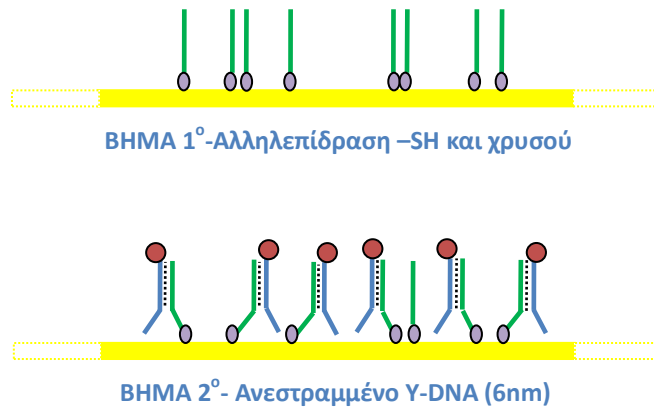
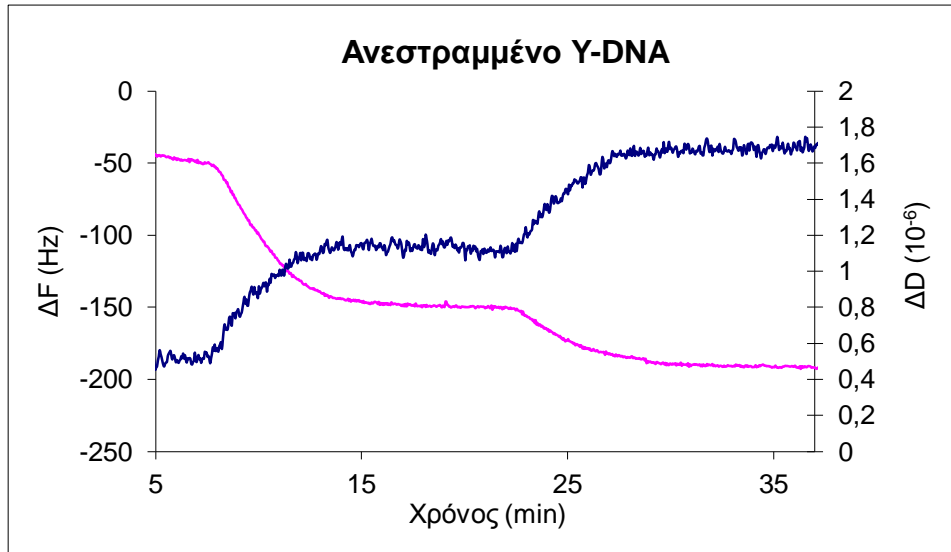
Οι απεικονίσεις που ακολουθούν περιγράφουν σχηματικά τα πειράματα της εργασίας αυτής. Η πρώτη απεικόνιση περιγράφει σχηματικά την υβριδοποίηση του miR159b με το miR159 FC. Η δεύτερη απεικόνιση περιγράφει την αντικατάσταση του miR159 Y από το miR159 Long. Η τρίτη απεικόνιση περιγράφει την πρόσδεση του SH-Y-DNA στην επιφάνεια και τον σχηματισμό του ανεστραμμένου Y-DNA. Η τελευταία απεικόνιση δείχνει πως θα ήταν η αντικατάσταση των ssDNA-AuNPs από το miR159 FC



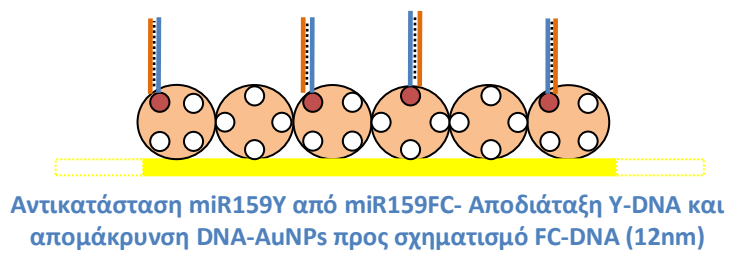
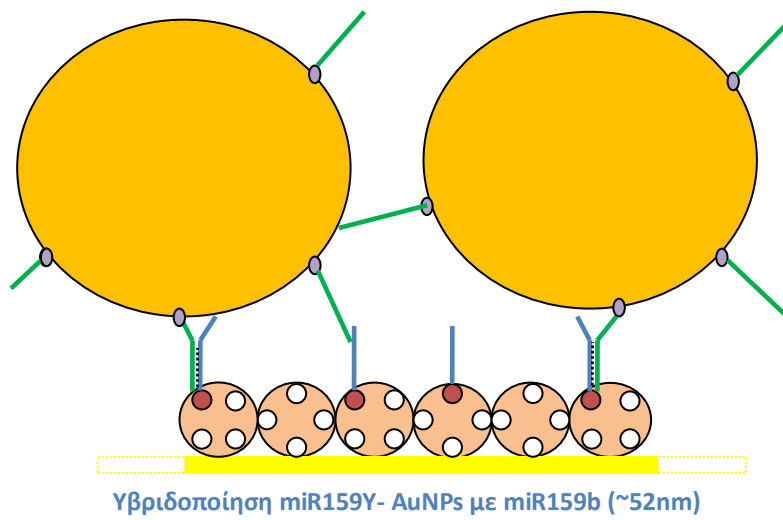
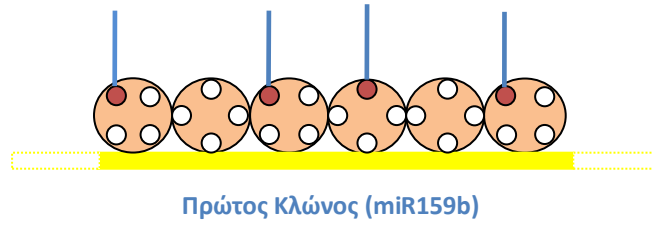
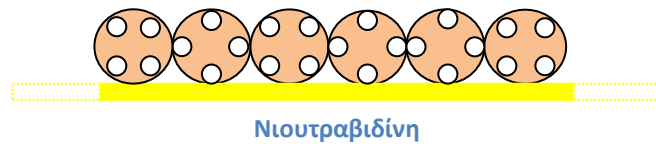
Απεικόνιση 1. ΒΗΜΑ 1^ο (9'): Νιουτραβιδίνη, ΒΗΜΑ 2^ο (23'): miR159b, ΒΗΜΑ 3^ο (35'): miR159 FC- Σχηματισμός δίκλωνου μορίου DNA (FC-DNA).



Απεικόνιση 2. ΒΗΜΑ 1° (8'): Νιουτραβιδίνη, ΒΗΜΑ 2° (24'): miR159b, ΒΗΜΑ 3° (35'): miR159 Y- Σχηματισμός δίκλωνου μορίου Y-DNA, ΒΗΜΑ 4° (48'): miR159 Long- Αντικατάσταση Y-DNA και σχηματισμός L-DNA.

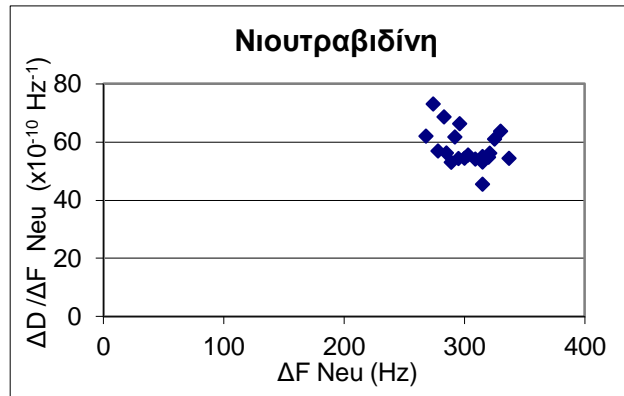


Απεικόνιση 3. ΒΗΜΑ 1^ο (7'): SH-Y-DNA, ΒΗΜΑ 2^ο (23'): miR159b- Σχηματισμός δίκλωνου μορίου DNA (Ανεστραμμένο Y-DNA)



4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1. Νιουτραβιδίνη (Neutravidin)

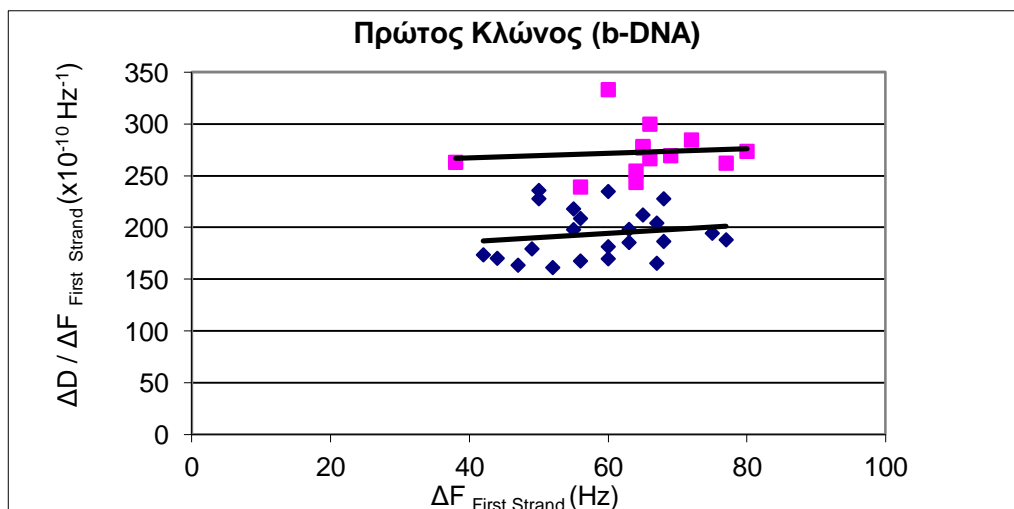


Διάγραμμα 1. Στο διάγραμμα $\Delta D/\Delta F - \Delta F$, παρατηρούμε ότι στο εύρος 250-350 Hz διατηρείται σταθερός ο ακουστικός λόγος $\Delta D/\Delta F=58\pm 6$ της νιουτραβιδίνης συνεπώς καταλαβαίνουμε πως γίνεται κάλυψη της επιφάνειας από ένα στρώμα μορίων μονής στοιβάδας.

Το πρώτο πράγμα που θέλαμε ήταν να καλύψουμε την επιφάνεια του κρυστάλλου με ένα στρώμα από Νιουτραβιδίνες, οι οποίες θα παρείχαν τις θέσεις πρόσδεσης του βιοτινιλιωμένου πρώτου κλώνου (miR159b). Η συγκέντρωση της νιουτραβιδίνης ήταν σταθερή 3.3nM και οδηγούσε σε 100% κάλυψη της επιφάνειας (~300Hz), μέσω φυσικής προσρόφησης των μορίων, σύμφωνα με προηγούμενες δημοσιεύσεις.⁶

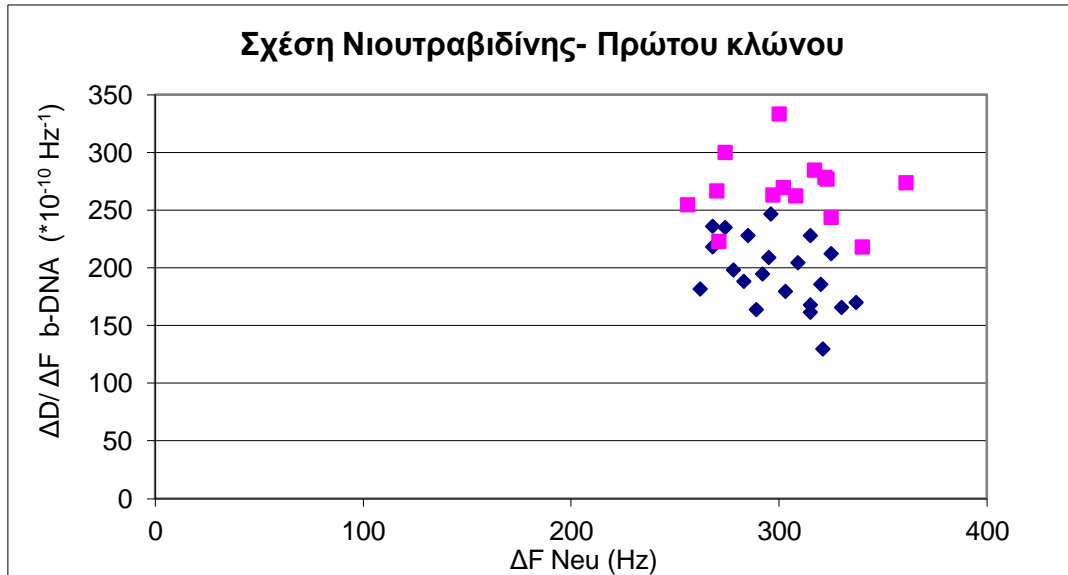
4.2. Πρώτος Κλώνος DNA (First Strand): miR159b

Το δεύτερο βήμα, μετά τις νιουτραβιδίνες, ήταν η προσθήκη του πρώτου κλώνου. Όπως είπαμε και στην εισαγωγή η τοποθέτηση του ανιχνευτή στον βιοαισθητήρα είναι ένα από τα πιο σημαντικά στοιχεία για την επιτυχία του πειράματος. Στα πειράματα μας χρησιμοποιήσαμε δυο διαφορετικούς κρυστάλλους για να μειώσουμε τον χρόνο προετοιμασίας του κάθε πειράματος. Ωστόσο αυτό που φάνηκε, για το βήμα αυτό, ήταν ότι οι κρύσταλλοι έδιναν διαφορετικά αποτελέσματα.



Διάγραμμα 2. Στο διάγραμμα $\Delta D/\Delta F - \Delta F$ για τον πρώτο κλώνο παρατηρούμε για τις ίδιες τιμές ΔF δυο διαφορετικές τιμές για τον ακουστικό λόγο $\Delta D / \Delta F$ ($\times 10^{-10} \text{ Hz}^{-1}$). Ο μέσος όρος του λόγου αντιστοιχεί σε 270 ± 27 για τον κρύσταλλο Α (ροζ) και 186 ± 26 για τον κρύσταλλο G (μπλε).

Για να ελέγξουμε αν το πρόβλημα αυτό έγκειται σε κάποιο λάθος του πρώτου βήματος δηλαδή αν ο ακουστικός λόγος $\Delta D/\Delta F$ του πρώτου κλώνου εξαρτάται με οποιονδήποτε τρόπο από την νιουτραβιδίνη (ποσοστό κάλυψης επιφάνειας κρυστάλλου, στερεοχημικές παρεμποδίσεις κ.α.), δημιουργήσαμε το παρακάτω διάγραμμα.



Διάγραμμα 3. Παρατηρούμε την σταθερότητα του ακουστικού λόγου $\Delta D / \Delta F$ του πρώτου κλώνου για το κρύσταλλο A, ροζ σημεία, και για τον κρύσταλλο G, μπλε σημεία, η οποία υποδηλώνει πως δεν υπάρχουν στερεοχημικές παρεμποδίσεις ή εξάρτηση μεταξύ των 2 βημάτων.

	ΔF (Hz) Neu	ΔD (10^{-6}) Neu	$\Delta D/\Delta F$ (10^{-10} Hz^{-1}) Neu	ΔF (Hz) b-DNA	ΔD (10^{-6}) b-DNA	$\Delta D/\Delta F$ (10^{-10} Hz^{-1}) b-DNA
Chip A	291±40	1,84±0,39	63±10	61±11	1,66±0,46	270±27
Chip G	308±21	1,79±0,20	58±6	54±9	1,00±0,23	186±26

Πίνακας 2. Η διαφορά του ακουστικού λόγου $\Delta D/\Delta F$ ανάμεσα στους δυο κρυστάλλους παρατηρείται σε μικρότερο ποσοστό, βέβαια, και για την Νιουτραβιδίνη

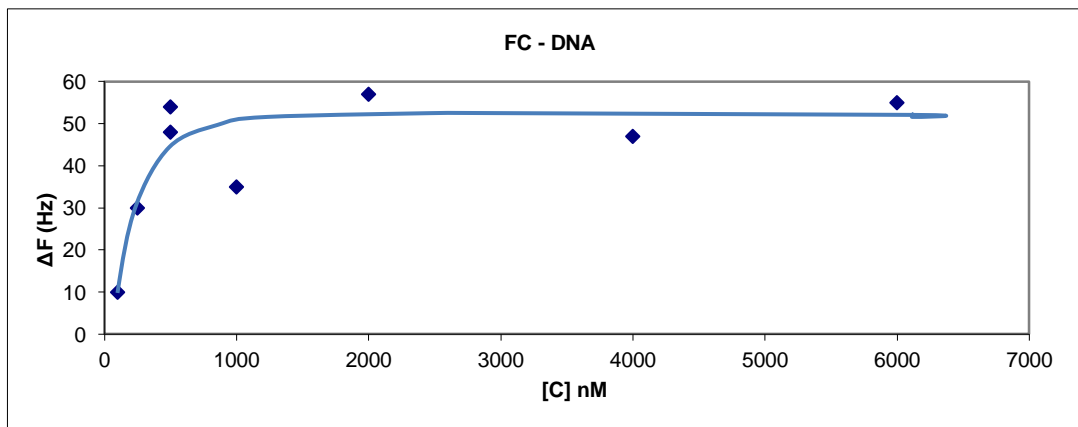
Συμπεραίνουμε πως οι διαφορετικές τιμές του ακουστικού λόγου $\Delta D/\Delta F$, ανάμεσα στους δυο κρυστάλλους, αν και προφανείς, δεν μπορούν να εξηγηθούν πλήρως. Όπως αναφέραμε στην εισαγωγή, ο ακουστικός λόγος σχετίζεται με την ιξωδοελαστικότητα του μορίου και είναι χαρακτηριστικό αυτού, επομένως τέτοιες πειραματικές διαφορές δεν θα έπρεπε να υπάρχουν. Μια υπόθεση για το φαινόμενο αυτό είναι ότι η πολύχρονη χρήση του κρυστάλλου A, μπορεί να μειώνει την αποδοτικότητα του ως επιφάνεια διάδοσης ακουστικού κύματος και αυτό να επηρεάζει τις μετρήσεις μας. Η Q-sense Corp. ωστόσο δεν προβλέπει πως κάτι τέτοιο μπορεί να συμβεί. Τα αποτελέσματα του κρυστάλλου G, για μονόκλωνο DNA

(ssDNA) 21nt σε PBS πάνω στη νουτραβιδίνη, επαληθεύονται και από άλλες δημοσιεύσεις⁶, επομένως τα αποτελέσματα που ακολουθούν βασίστηκαν σε αυτόν. Το πλατό επιτυγχάνεται με 500pmoles από το b-DNA στα 100Hz, κατ' αντιστοιχία των μορίων Neutravidin που υπάρχουν στην επιφάνεια, τα οποία διατηρούσαμε σταθερά. Επειδή όμως θέλαμε να αποφευχθούν οι στερεοχημικές παρεμποδίσεις κατά την υβριδοποίηση, φορτώναμε 200pmoles b-DNA ώστε να έχουμε 50-60% κάλυψη θέσεων.

4.3. Δεύτερος κλώνος (Second Strand): miR159 FC, miR159 Y, miR159 Long

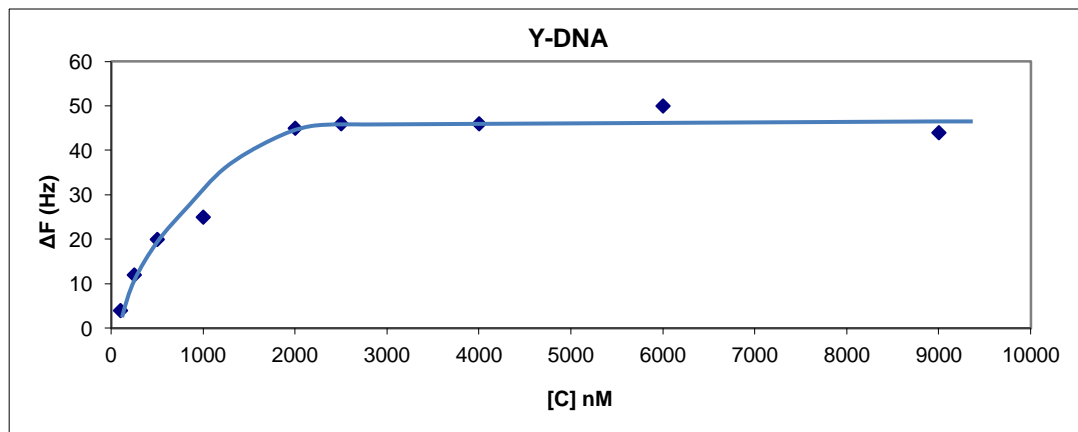
Το τρίτο βήμα ήταν να περάσουμε πάνω από την επιφάνεια τον δεύτερο κλώνο και να παρατηρήσουμε την υβριδοποίηση στον βιοαισθητήρα. Υβριδοποίηση παρατηρήθηκε και για τα τρία διαφορετικά μόρια DNA που αναφέραμε ήδη, και περνώντας διαφορετικές συγκεντρώσεις, μπορέσαμε δημιουργήσαμε την ισόθερμη καμπύλη για το καθένα.

- **miR159 FC (Πλήρως συμπληρωματικό)**



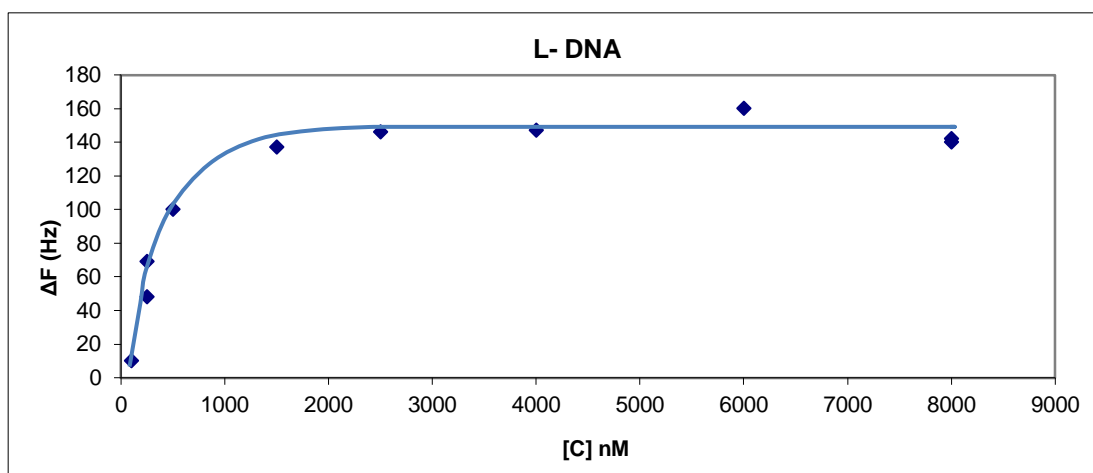
Διάγραμμα 4. Ισόθερμη καμπύλη για το FC-DNA. Παρατηρούμε την ελάχιστη αντιληπτή υβριδοποίηση (10Hz) στα 100nM, φορτώνοντας 20pmoles και το πλατώ (50Hz) στα 500nM, φορτώνοντας 100pmoles.

- **miR159 Y (14 / 21 βάσεις συμπληρωματικές)**



Διάγραμμα 5. Ισόθερμη Καμπύλη για το Y-DNA. Παρατηρούμε την ελάχιστη αντιληπτή υβριδοποίηση (4Hz) στα 100nM, φορτώνοντας 20pmoles και το πλατώ (45Hz) στα 2000nM, φορτώνοντας 400pmoles.

- **miR159 Long (Πλήρως συμπληρωματικό +59 βάσεις)**



Διάγραμμα 6. Ισόθερμη Καμπύλη για το Long-DNA. Παρατηρούμε την ελάχιστη αντιληπτή υβριδοποίηση (10Hz) στα 100nM, φορτώνοντας 20pmoles και το πλατώ (140Hz) στα 1500nM, φορτώνοντας 300pmoles.

4.4. Τα δίκλινα μόρια (FC-DNA, Y-DNA και Long-DNA)

Το επόμενο σημαντικό σημείο που θέλαμε να εξετάσουμε ήταν ο ακουστικός λόγος $\Delta D/\Delta F$ των τριών διαφορετικών δίκλωνων μορίων που σχηματίστηκαν από την υβριδοποίηση πάνω στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα. Στον παρακάτω πίνακα παρατίθεται ο μέσος όρος $\Delta D/\Delta F$ για κάθε μόριο, στους δυο διαφορετικούς κρυστάλλους A και G.

	FC-DNA	Y-DNA	L-DNA	L-DNA Αντικατάστασης
Κρύσταλλος A	210 ± 16	209 ± 20	241 ± 17	264 ± 36
Κρύσταλλος G	171 ± 26	183 ± 20	217 ± 9	228 ± 27

Πίνακας 3. Ο μέσος όρος του ακουστικού λόγου $\Delta D/\Delta F$ (10^{-10} Hz^{-1}) για τα δίκλινα μόρια που προκύπτουν από την υβριδοποίηση στους δυο διαφορετικούς κρυστάλλους.

Αυτό που παρατηρούμε καταρχάς είναι ότι οι τιμές $\Delta D/\Delta F$ του FC-DNA (171 ± 26) και του Y-DNA (183 ± 20) σε PBS στον κρύσταλλο G, επαληθεύουν προηγούμενα αποτελεσματά⁶.

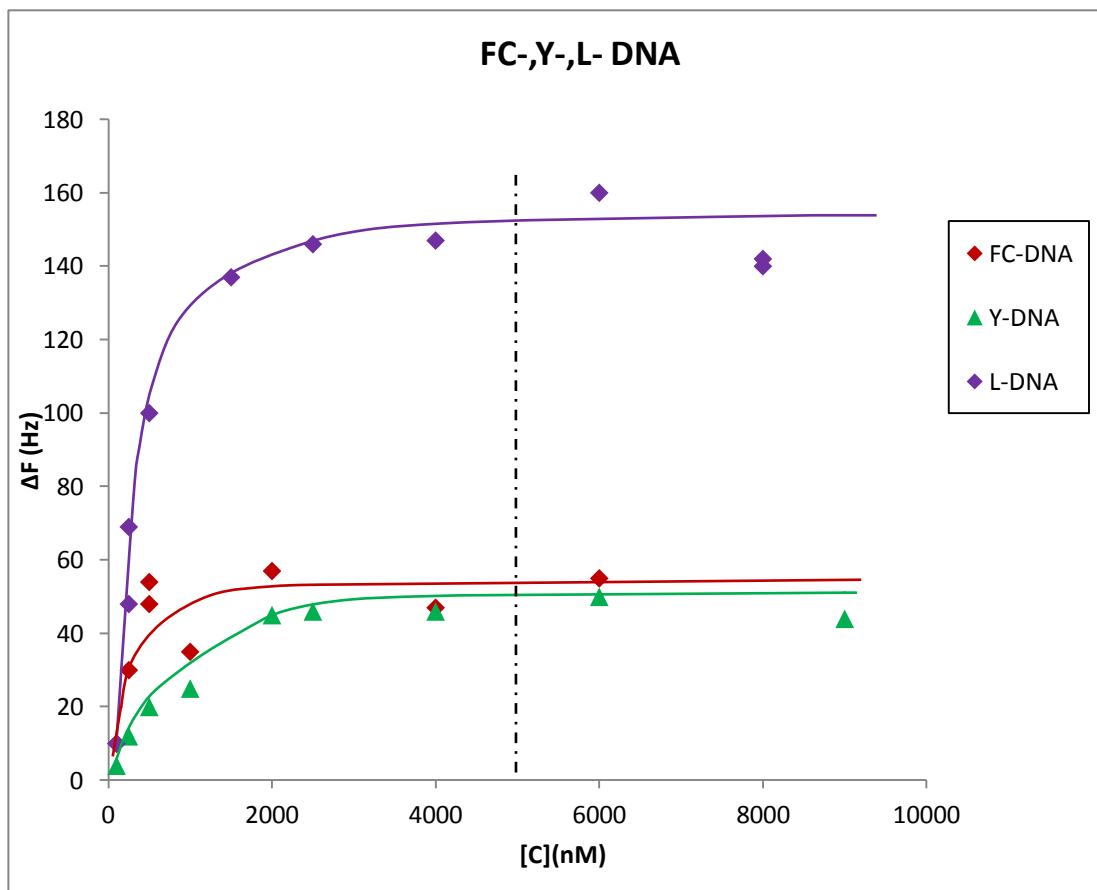
Στη συνέχεια, συγκρίνοντας την μέση τιμή $\Delta D/\Delta F$ του FC-DNA (171 ± 26) με την μέση τιμή $\Delta D/\Delta F$ του L-DNA (217 ± 9), παρατηρούμε σημαντική διαφορά. Το miR159Long διαφέρει ως προς την μάζα με το miR159FC καθώς έχει 59 νουκλεοτίδια περισσότερα, τα οποία σχηματίζουν μια κλειστή κυκλική δομή. Αυτή η δομή μέσα στον βιοαισθητήρα φαίνεται με την αύξηση τόσο στην απόλυτη τιμή του ΔF όσο και στο ΔD . Επειδή όμως το ποσοστό της αύξησης των 2 μεγεθών (F, D) δεν

είναι το ίδιο ώστε να διατηρηθεί ο λόγος, συμπεραίνουμε ότι τα 2 μόρια έχουν διαφορετική $[\eta]$, και η διαμόρφωση τους είναι διαφορετική.

Η διαμόρφωση του L-DNA δεν φαίνεται να επηρεάζεται ανάλογα αν πρόκειται για άμεσο υβριδισμό (217 ± 9) ή υβριδισμό μετά από αντικατάσταση (228 ± 27) του Y-DNA. Αυτό είναι αρκετά ενδιαφέρον καθώς τονίζει πως η διαδικασία της αντικατάστασης του Y, όταν υπάρχει αρκετός χώρος για την δομή του L-DNA και δεν υπάρχουν στερεοχημικές παρεμποδίσεις, δεν επηρεάζει την $[\eta]$ δηλαδή την διάταξη του μορίου επάνω στον βιοαισθητήρα.

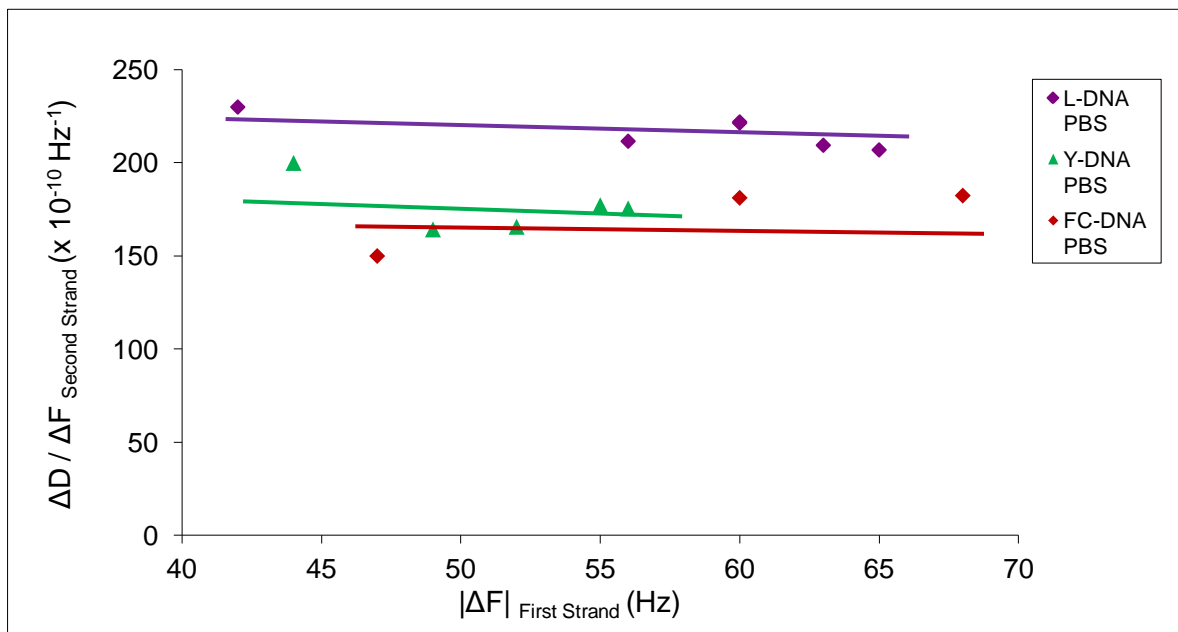
Αξίζει να σημειωθεί πως οι αυξημένες τιμές του $\Delta D/\Delta F$ των δίκλωνων μορίων που φαίνεται να υπάρχουν στον κρύσταλλο A σε σχέση με τον κρύσταλλο G, είναι ανεξάρτητες του ποίος είναι ο δεύτερος κλώνος.

Στο παρακάτω διάγραμμα, παρουσιάζονται συγκεντρωτικά οι τρεις ισόθερμες καμπύλες για τα δίκλινα μόρια DNA σε μια προσπάθεια σύγκρισης τους. Η γραμμή τάσης έχει σχεδιαστεί βάση των πειραματικών δεδομένων όπως και στα διαγράμματα 4-6.



Διάγραμμα 7. Σύγκριση των ισόθερμων καμπύλων για τα 3 διαφορετικά δίκλινα μόρια Y-DNA (πράσινο), FC-DNA(κόκκινο), L-DNA (μωβ) σε PBS.

Αυτό που παρατηρήθηκε με την σύγκριση των FC-DNA ,Y-DNA και Long-DNA ήταν ότι για την ίδια συγκέντρωση, τα ΔF έχουν διαφορετικές τιμές. Με άλλα λόγια μπορεί η συγκέντρωση που περνάει πάνω από την επιφάνεια να είναι η ίδια αλλά το σύνολο των μορίων που όντως προσδένεται είναι διαφορετικό (δημιουργώντας έτσι τις διαφορετικές κλίσεις). Ανάμεσα στα 3 μόρια, το Long –DNA δίνει το δυνατότερο σήμα ΔF . Αυτό ήταν αναμενόμενο, καθώς έχει 3 φορές περισσότερη μάζα σε σχέση με τα άλλα δυο. Επομένως, αν για 5 μ M FC-DNA παίρνουμε 50 Hz, μπορούμε να πάρουμε 140-150Hz από, ίδιας συγκέντρωσης, Long-DNA (Διάγραμμα 7). Αυτό είναι μια μορφή ενίσχυσης του σήματος που παίρνουμε από τον βιοαισθητήρα ωστόσο δεν μπορέσαμε να παρατηρήσουμε κάτι τέτοιο για συγκεντρώσεις μικρότερες του 0,1 μ M.

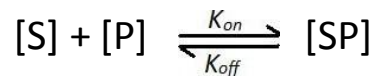


Διάγραμμα 8. Ο Ακουστικός λόγος $\Delta D / \Delta F$ του δίκλωνου μορίου Y-DNA (κίτρινο), FC-DNA(πράσινο), Long-DNA (μοβ) μετά την υβριδοποίηση σε σχέση με τα διαθέσιμα μόρια miR159b που υπήρχαν πάνω στην επιφάνεια.

Στο παραπάνω διάγραμμα (8) παρατηρούμε σταθερό $\Delta D / \Delta F$ στο συγκεκριμένο εύρος ΔF πρώτου κλώνου, δηλαδή όταν ο ανιχνευτής (b-DNA) έχει 50-60% κάλυψη θέσεων στις νιουτραβιδίνες (40-65Hz), το φαινόμενο της στερεοχημικής παρεμπόδισης δεν επηρεάζει την διάταξη του dsDNA (surface coverage-independence).

4.5. Σταθερές Ισορροπίας miR159 Y, miR159 Long

Το επόμενο βήμα ήταν να συγκρίνουμε την συγγένεια πρόσδεσης ανάμεσα στο miR159Y και στο miR159Long πάνω στο miR159b, το οποίο ήταν προσδεμένο στην νιουτραβιδίνη. Η αντίδραση και οι κινητικές σταθερές της υβριδοποίησης⁴⁰ μπορούν να περιγραφούν με τους εξής τύπους:



$$K_{eq} = \frac{[SP]}{[S]+[P]} = \frac{K_{on}}{K_{off}} [M^{-1}]$$

Όπου:

[S]: τα ελεύθερα μόρια ανιχνευτή

[P]: τα μόρια-στόχοι (miR159Y ή miR159Long)

[SP]: τα δίκλιωνα μόρια

$K_{on,off}$: κινητικές σταθερές της αντίδρασης

Εμείς για να υπολογίσουμε όμως την σταθερά ισορροπίας της αντίδρασης χρησιμοποιήσαμε την εξίσωση Langmuir της ισόθερμης καμπύλης απορροφησης όπως περιγράφεται από τον τύπο:

$$\frac{[c]}{\Delta F} = \frac{[c]}{\Delta F_{max}} + \frac{1}{K_{eq} \Delta F_{max}}$$

Όπου:

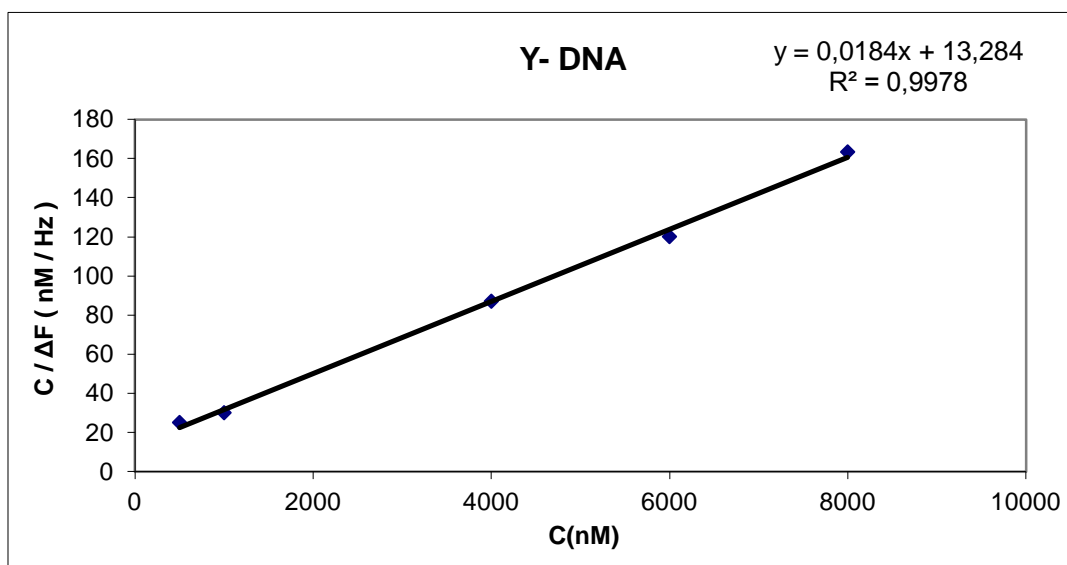
[c]: η συγκέντρωση των μορίων-στόχου

ΔF : η μεταβολή στην συχνότητα λόγω πρόσδεσης

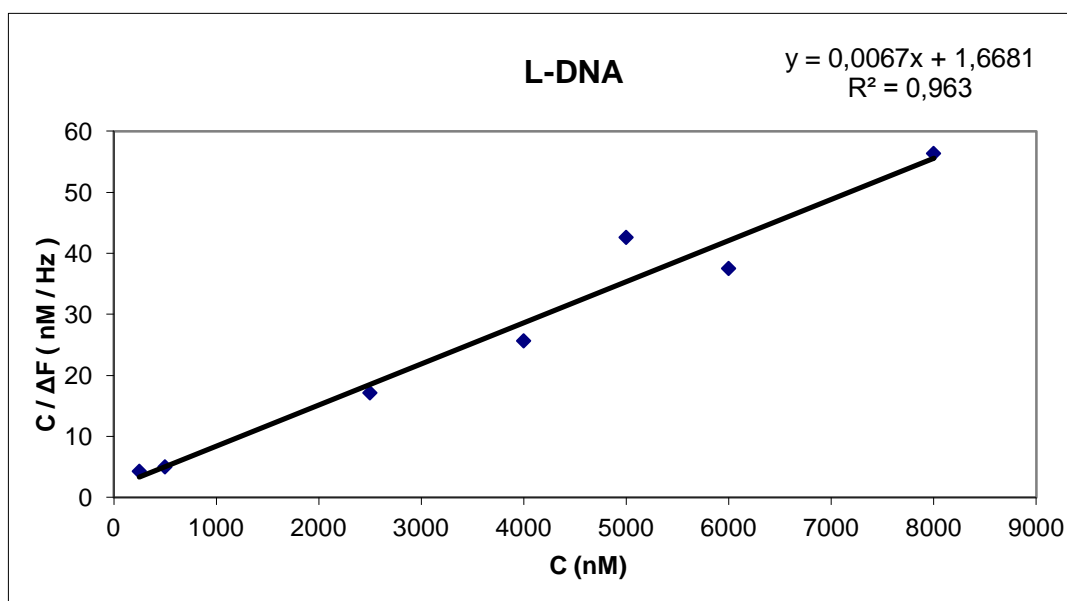
ΔF_{max} : η μέγιστη μεταβολή στην συχνότητα (στο πλατώ)

K_{eq} : η σταθερά ισορροπίας (ή πρόσδεσης)

Στα διαγράμματα $[C]/\Delta F - [C]$, μπορούμε να προσδιορίσουμε τις τιμές του $1/\Delta F_{max}$ από την κλίση της ευθείας και το $1/(K_{eq} \times \Delta F_{max})$ από το σημείο τομής της ευθείας με τον κάθετο άξονα. Έτσι μπορούμε να υπολογίσουμε και την σταθερά ισορροπίας της κάθε αντίδρασης.



Διάγραμμα 9. Υπολογίζουμε την σταθερά ισορροπίας για το miR159 Y, $K_{eq} = 1,38 \times 10^{-3} M^{-1}$

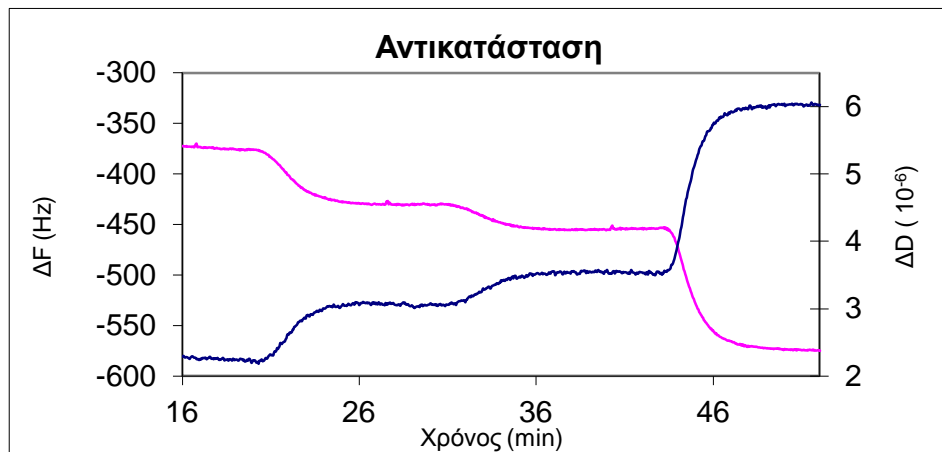


Διάγραμμα 10. Υπολογίζουμε την σταθερά ισορροπίας για το miR159 Long, $K_{eq} = 4,01 \times 10^{-3} M^{-1}$

Όταν συγκρίναμε την συγγένεια πρόσδεσης ανάμεσα στο miR159Y και στο miR159Long ως προς το miR159b παρατηρήθηκε ότι το Long έχει $K_{eq} \sim 3$ φορές μεγαλύτερη από το Y. Αυτή η διαφορά προφανώς οφείλεται στην διαφορά της αλληλουχίας του Y-DNA και στην μη πλήρη συμπληρωματικότητα του απέναντι στο b-DNA. Αυτό βοήθησε να καταλάβουμε πως μπορεί να επιτευχτεί αντικατάσταση του Y από το Long.

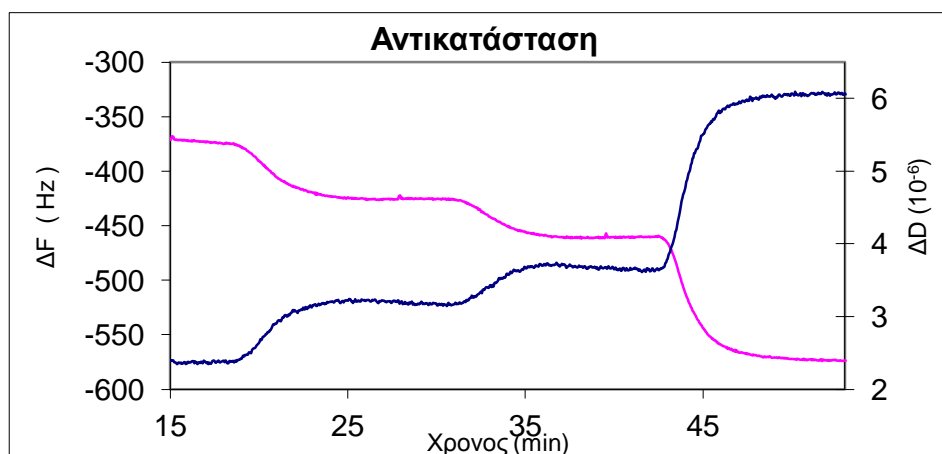
4.6. Αντικατάσταση

Στα πειράματα αντικατάστασης που ακολουθούν παρατηρούμε το πρώτο βήμα που είναι η τοποθέτηση του ανιχνευτή πάνω στο στρώμα νιουτραβιδίνης που έχει σχηματιστεί προηγουμένως. Το δεύτερο βήμα είναι η προσθήκη του ημισυμπληρωματικού κλώνου (miR159Y), σε αρκετή ποσότητα ώστε να βεβαιωθούμε την κάλυψη όλων των διαθέσιμων θέσεων πρόσδεσης, σε σημείο όπου δεν παρουσιαζόταν άλλο σήμα πρόσδεσης μάζας και στην συνέχεια περνάμε το δείγμα με το miR159Long, το οποίο όπως φαίνεται και στα διαγράμματα αντικαθιστά το miR159Y.

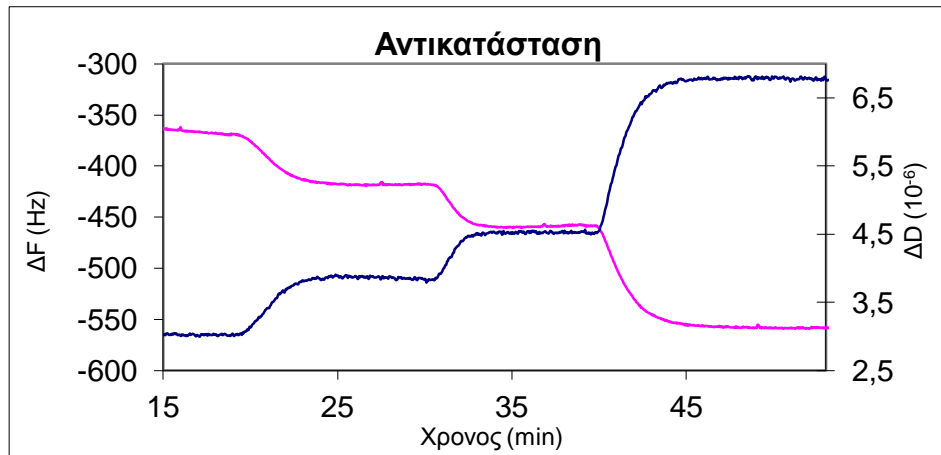


Διάγραμμα 11. ΒΗΜΑ 1^ο(21'): miR159b - $\Delta F=65\text{Hz}$, ΒΗΜΑ 2^ο (31'): miR159Y- $\Delta F=30\text{Hz}$
ΒΗΜΑ 3^ο(43'): miR159Long- $\Delta F=120\text{Hz}$

Η αντικατάσταση δεν είναι πάντοτε πλήρης καθώς η μάζα που προστίθεται στο τελευταίο βήμα είναι περίπου 2 - 4 φορές η μάζα που προστέθηκε στο βήμα με το miR159Y.

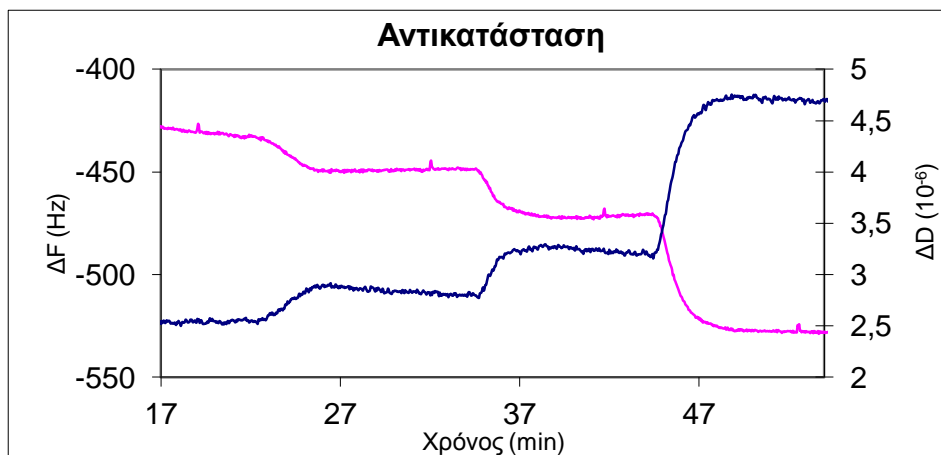


Διάγραμμα 12. ΒΗΜΑ 1^ο(20'): miR159b - $\Delta F=52\text{Hz}$, ΒΗΜΑ 2^ο (30'): miR159Y- $\Delta F=35\text{Hz}$
ΒΗΜΑ 3^ο (43'): miR159Long- $\Delta F=114\text{Hz}$



Διάγραμμα 13. ΒΗΜΑ 1^ο (20'): miR159b -ΔF=49Hz, ΒΗΜΑ 2^ο (31'): miR159Y-ΔF=42Hz
ΒΗΜΑ 3^ο (41'): miR159Long- ΔF=101Hz

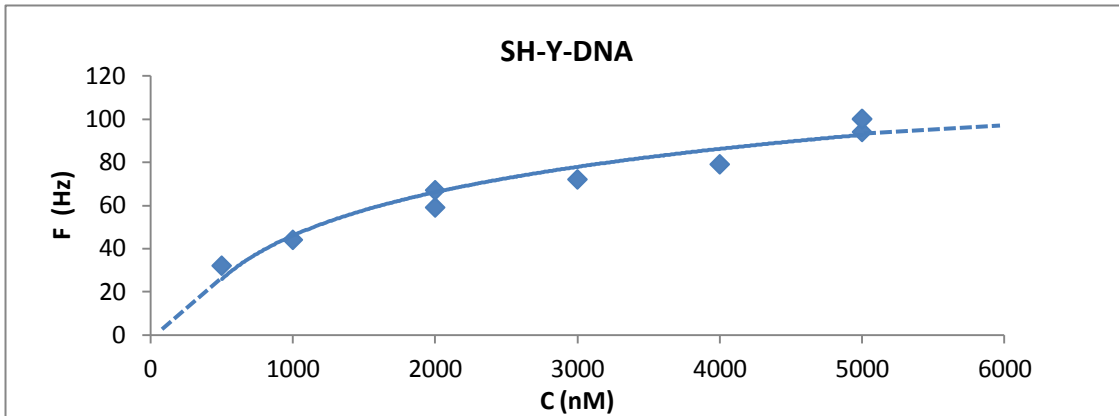
Σε ορισμένα πειράματα αντικατάστασης όμως, παρατηρήθηκε η μάζα που προσδέθηκε όταν φορτώσαμε το miR159 Y να είναι μεγαλύτερη από την μάζα που έδεσε όταν φορτώσαμε τον ανιχνευτή. Κάτι τέτοιο δεν θα έπρεπε να υφίσταται και δεν μπορεί να εξηγηθεί διαφορετικά πέρα του ότι πρόκειται για πειραματικό σφάλμα.



Διάγραμμα 14. ΒΗΜΑ 1^ο (24'): miR159b -ΔF=17Hz, ΒΗΜΑ 2^ο (35'): miR159Y-ΔF=25Hz
ΒΗΜΑ 3^ο (45'): miR159Long- ΔF=58Hz

4.7. SH-Y-DNA (ssDNA) και Reverse Y-DNA (dsDNA)

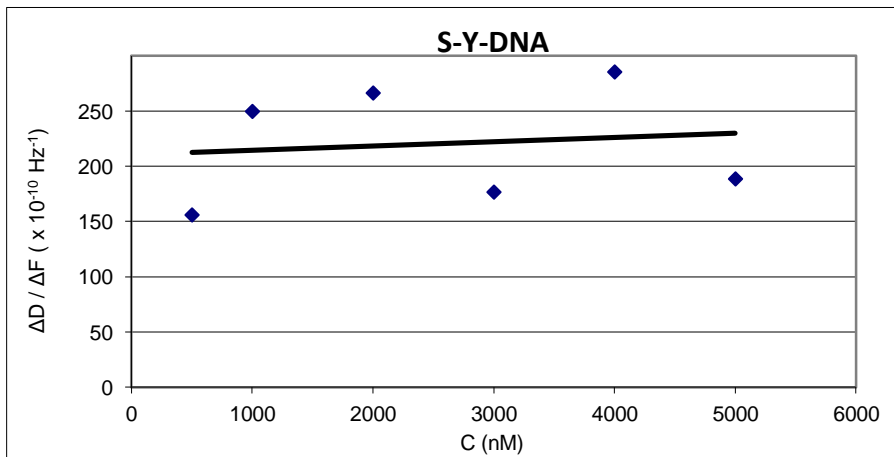
Μια άλλη σειρά πειραμάτων τα οποία που έγιναν με στόχο την ανίχνευση της υβριδοποίησης εντός του ακουστικού βιοαισθητήρα, ήταν με την τοποθέτηση του ανιχνευτή κατευθείαν πάνω στην επιφάνεια χρυσού του μεταγωγέα-κρυστάλλου. Ο ανιχνευτής στην περίπτωση αυτή ήταν το 5'-SH-Y-DNA. Το διάγραμμα που ακολουθεί είναι η ισόθερμη καμπύλη για τον ανιχνευτή μας, ολοκληρωμένο στον βαθμό που μας επέτρεψε η διαθέσιμη ποσότητα.



Διάγραμμα 15. Ισόθερμη Καμπύλη για το SH-Y-DNA. Παρατηρούμε την ελάχιστη αντιληπτή πρόσδεση (32Hz) στα 500nM, φορτώνοντας 100ρmoles και το πλατώ (100Hz) στα 5000nM, φορτώνοντας 1000ρmoles.

Βλέπουμε (διάγραμμα 15) πως το SH-Y-DNA κατευθείαν στην επιφάνεια φτάνει σε παρόμοιο πλατώ (~100Hz) με αυτό του b-DNA (ssDNA) που προσδέεται στην νιουτραβιδίνη με πλήρη κάλυψη των θέσεων. Ακόμα βλέπουμε πως για το S-Y-DNA φορτώνουμε 1000 ρmoles, ενώ για το b-DNA μπορούμε με την μίση ποσότητα (500ρmoles) να φτάσουμε σε πλατώ.

Στο διάγραμμα που ακολουθεί (16), περιγράφουμε τον ακουστικό λόγο $\Delta D/\Delta F$ συναρτήσει της συγκέντρωσης που φορτώνουμε, για να δούμε αν επηρεάζεται έτσι η διαμόρφωση του μορίου πάνω στον βιοαισθητήρα.

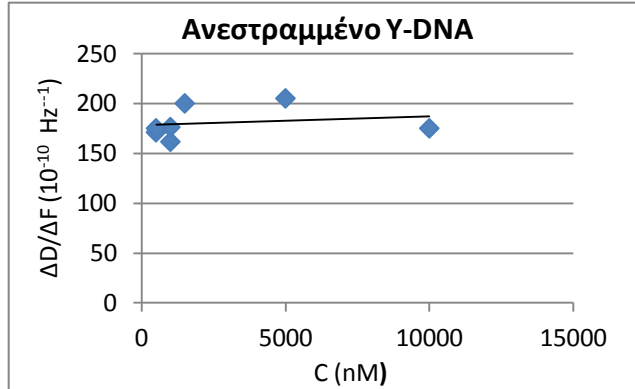


Διάγραμμα 16. Μέση τιμή ακουστικού λόγου $\Delta D/\Delta F = 229 \pm 34 \times 10^{-10} \text{ Hz}^{-1}$

Τα δυο ssDNA έχουν διαφορετικές μέσες τιμές λόγου $\Delta D/\Delta F$ καθώς το b-DNA έχει 186 ± 26 (Πίνακας 2) ενώ το SH-Y-DNA έχει 229 ± 34 . Από τα πειράματα αυτά μπορέσαμε να παρατηρήσουμε ότι ο λόγος $\Delta D/\Delta F$ ανάμεσα στα δυο ssDNA επάνω στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα είναι διαφορετικός. Αυτό δεν θα έπρεπε να μας παραξενέψει διότι αν φανταστούμε σχηματικά την επιφάνεια με τις νιουτραβιδίνες, τα miR159b μόρια, λόγο των ειδικών θέσεων πρόσδεσης

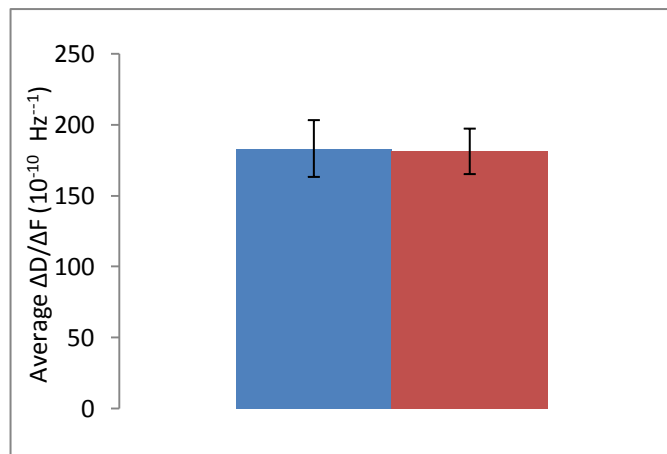
καταλαμβάνουν θέσεις μακριά το ένα από το άλλο. Αντίθετα τα SH-Y-DNA προσδένονται πιο άτακτα πάνω στην επιφάνεια του χρυσού μέσω του δεσμού που αναπτύσσεται, συνεπώς και η διαμόρφωση των μορίων είναι διαφορετική.

Το επόμενο βήμα ήταν να περάσουμε το συμπληρωματικό κλώνο (miR159b) προς υβριδοποίηση μέσα στον βιοαισθητήρα. Όπως γίνεται κατανοητό σκοπός μας ήταν να παρατηρήσουμε την διαμόρφωση του δίκλωνου μορίου, του ανεστραμμένου Y-DNA, μέσα από τον λόγο $\Delta D/\Delta F$ και να το συγκρίνουμε με το δίκλωνο Y-DNA πάνω στις νιουτραβιδίνες. Παρατηρώντας την σταθερότητα του λόγου $\Delta D/\Delta F$, αυξανόμενης της συγκέντρωσης, καταλαβαίνουμε ότι η πρόσδεση του δεύτερου κλώνου και η διαμόρφωση του dsDNA παραμένει η ίδια και είναι ανεξάρτητη της επιφάνειας κάλυψης.



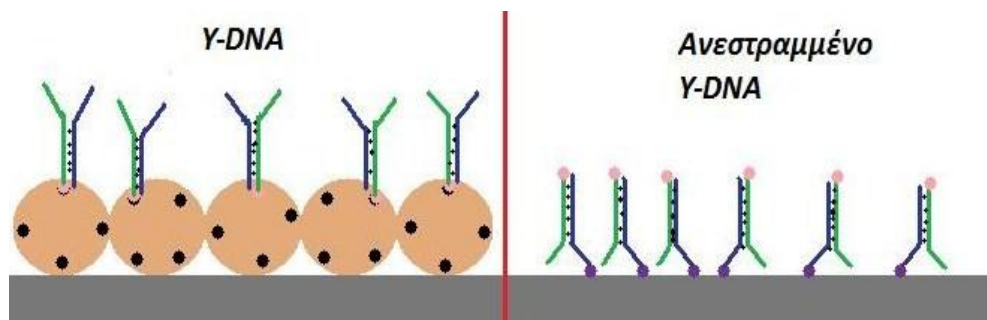
Διάγραμμα 17. Ο ακουστικός λόγος $\Delta D/\Delta F$ του ανεστραμμένου Y-DNA, διατηρείται σταθερός ($181 \pm 16 \cdot 10^{-10} \text{ Hz}^{-1}$).

Αυτό που αξίζει να τονιστεί εδώ είναι ότι από τα πειράματα υβριδοποίησης μπορέσαμε να συγκρίνουμε τα dsDNA Y-DNA ως προς το $\Delta D/\Delta F$. Όπως παρατηρήθηκε λοιπόν, ο μέσος ορός των ακουστικών λόγων $\Delta D/\Delta F$ για το Y-DNA (183 ± 20) πάνω στην νιουτραβιδίνη και του ανεστραμμένου Y-DNA (181 ± 16) πάνω στην επιφάνεια του χρυσού, φαίνεται να είναι



Διάγραμμα 18. Σύγκριση του ακουστικού λόγου των δίκλωνων μορίων Y-DNA (μπλε) και ανεστραμμένων Y-DNA (κόκκινο).

οι ίδιοι. Αυτό σημαίνει πως τα δίκλινα μόρια αποκτούν την διαμόρφωση και ο βιοαισθητήρας τα αντιλαμβάνεται ως το ίδιο μόριο (Εικόνα 3).



Εικόνα 3. Σχηματική σύγκριση των δυο μορίων DNA.

4.7. Φωτομέτρηση διαλύματος ssDNA- AuNPs.

Πριν μάθουμε ότι η επιφάνεια των νανοσφαιριδίων παύει να είναι ενεργή μετά από ένα συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, θελήσαμε να δούμε στο διάλυμα που παρασκευάσαμε σύμφωνα με το πρωτόκολλο, αν όντως έχουν προσδεθεί μονόκλωνα μόρια DNA πάνω στα σφαιρίδια. Για αυτόν τον λόγο φωτομετρήσαμε το δείγμα μας στα 260 nm (για το DNA) και στα 510nm (για τα Au-NPs), πριν και μετά τις φυγοκεντρίσεις όπως περιγράφονται στην εισαγωγή. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

ΔΙΑΛΥΜΑ ssDNA- AuNPs	Volume (μ L)	[C] μ M	NPs /mL	Απορρόφηση στα 260nm	Απορρόφηση στα 510nm
		DNA	Au- NPs	DNA	Au-NPs
ΠΡΙΝ ΤΗΝ ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΙΣΗ	1500	6,7	3×10^{10}	0,0142	0,0020
ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΙΣΗ	500	0,1-10 (υποτιθέμενο)	9×10^{10}	0,0017	0,0030

Πίνακας 4. Οπτική απορρόφηση DNA και Au-NPs, πριν τις φυγοκεντρίσεις και μετά την τελική επαναδιάλυση.

Τέλος, από τις φωτομετρήσεις και από τα πειράματα με τα DNA-AuNPs στον βιοασθητήρα, τα οποία δεν εμφάνιζαν κανένα σήμα αλλαγής στα μεγέθη F, D (δεν παρουσιάστηκαν στην πτυχιακή), μπορούμε να πούμε ότι δεν προσδέθηκαν καθόλου μόρια DNA πάνω στα Au-NPs. Η εξήγηση που δίνεται για το γεγονός αυτό είναι ότι, η επιφάνεια χρυσού των νανοσφαιριδίων μετά από αρκετό καιρό παύει να είναι ενεργή. Ο χρυσός είναι δραστικό μέταλλο το οποίο οξειδώνεται εύκολα και η εταιρία (Nanocs®) υπογραμμίζει πως μετά από ένα χρόνο συντήρησης τα νανοσφαιρίδια ενδεχομένως να σταματήσουν να λειτουργούν.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Αναμφίβολα, η ιδέα να ενισχύσουμε το σήμα ανίχνευσης μικροποσοτήτων DNA του ακουστικού βιοαισθητήρα QCM-D, με την χρήση Au-NPs, αποτέλεσε σημαντικό έναυσμα για την αρχή μιας σειράς πειραμάτων υβριδοποίησης και αντικατάστασης πάνω στην επιφάνεια. Από τα πειράματά μας μπορέσαμε να επαληθεύσουμε τιμές $\Delta D/\Delta F$ μορίων από προηγούμενες μελέτες ενώ μετρήσαμε κάποιες καινούργιες όπως αυτές του L-DNA και του Ανεστραμμένου Y-DNA. Ακόμα καταφέραμε να δείξουμε μια «ενίσχυση σήματος» μέσω της αντικατάστασης του Y-DNA από το Long-DNA και να παρατηρήσουμε τον διαφορετικό ακουστικό λόγο $\Delta D/\Delta F$ και τις διαφορετικές σταθερές ισορροπίας των αντιδράσεων υβριδοποίησης των δυο αυτών μορίων με τον ανιχνευτή μας. Επίσης δείξαμε ότι η διαμόρφωση που αποκτά το L-DNA με άμεση υβριδοποίηση ή μετά από την αντικατάσταση είναι η ίδια. Ακόμα παρατηρήσαμε πόσο διαφορετική διαμόρφωση παίρνει ο ανιχνευτής όταν τοποθετείται αμέσως πάνω στην επιφάνεια του μεταγωγέα ή έμμεσα πάνω στο στρώμα από νιουτραβιδίνες. Και τέλος μέσα από τον ίδιο ακουστικό λόγο $\Delta D/\Delta F$, συμπεράναμε πως ο βιοαισθητήρας κατανοεί το μόριο του Y-DNA και του Ανεστραμμένου Y-DNA ως ίδιο.

6. ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Καταρχάς θα ήθελα να ευχαριστήσω το Πανεπιστήμιο Κρήτης και ιδιαίτερα την Δρ Η. Γκιζελή, που μου έδωσαν την ευκαιρία να εργαστώ σε αυτόν τον τομέα Βιολογίας, στα πλαίσια της πτυχιακής μου εργασίας. Οι γνώσεις, οι συμβουλές και ο τρόπος σκέψης που μεταλαμπαδεύτηκαν από την ίδια και τους συνεργάτες της, Δρ Α. Τσόρτο και Δρ Γ. Παπαδάκη, θα αποτελέσουν σημαντικό εφόδιο τόσο στην επιστημονική μου σταδιοδρομία όσο και στη ζωή έξω από το εργαστήριο. Ακόμα θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στους συναδέλφους μου και στους ανθρώπους που ήταν κοντά μου όλον αυτόν τον καιρό για την υποστήριξη τους και την βοήθεια μου προσέφεραν. Και τέλος, δεν θα μπορούσα να ξεχάσω να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για τις αρχές και τις αξίες που μου έχουν διδάξει.

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Wenonah Vercoutere and Mark Akeson. **Biosensors for DNA sequence detection**. Current Opinion in Chemical Biology, 6, 816-822 (2002)
2. Joseph Wang. **From DNA biosensors to gene chips**. Nucleic Acid Research, Vol. 28, No. 16, 3011-3016 (2000)
3. Q-sense manual- q-sense.com
4. Eric Reimhult, Fredrik Höök and Bengt Kasemo. **Intact Vesicle Adsorption and Supported Biomembrane Formation from Vesicles in Solution: Influence of Surface Chemistry, Vesicle Size, Temperature and Osmotic Pressure**. Langmuir, 19, 1681-1691 (2003)
5. Nam-Joon Cho, Curtis W. Frank, Bengt Kasemo & Fredrik Höök. **Quartz Crystal microbalance with dissipation monitoring of supported lipid bilayers on various substrates**. Nature Protocols, vol.5, No.6, 1096-1106 (2010)
6. Achilleas Tsortos, George Papadakis, Electra Gizeli. **Shear acoustic wave biosensor for detecting DNA intrinsic viscosity and conformation: A study with QCM-D**. Biosensors and Bioelectronics, 24, 836-841(2008)
7. Achilleas Tsortos, George Papadakis, Konstantinos Mitsakakis, Kathryn A. Melzak, Electra Gizeli. **Quantitative Determination of Size and Shape of Surface-Bound DNA Using an Acoustic Wave Sensor**. Biophysical Journal, Vol. 94, 2706–2715 April (2008)
8. George Papadakis, Achilleas Tsortos, Florian Bender, Elena E. Ferapontova, and Electra Gizeli. **Direct Detection of DNA Conformation in Hybridization Processes**. Analytical Chemistry, 84, 1854–1861 (2012)
9. Achilleas Tsortos, George Papadakis, Electra Gizeli. **The Intrinsic Viscosity of Linear DNA**. Biopolymers, Vol. 95, No. 12, 824-832 (2011)
10. Serge Cosnier and Pascal Mailley. **Recent advances in DNA sensors**. Analyst, 133, 984-991 (2008)
11. **Εικόνα 1.:** <http://inano.au.dk/research/research-platforms/nanoanalysis/quartz-crystal-microbalance/>
12. **US 2011/0048114 A1 March 3, (2011)** (a)[0006], (b)[0014] – [0018], (c)[0068], (d)[0085]
13. Javier F. Palatnik, Heike Wollmann, Carla Schommer, Rebecca Schwab, Jerome Boisbouvier, Ramiro Rodriguez, Norman Warthmann, Edwards Allen, Tobias Dezulian, Daniel Huson, James C. Carrington, and Detlef Weigel. **Sequence and Expression Differences Underlie Functional Specialization of Arabidopsis MicroRNAs miR159 and miR319**. Developmental Cell, 13, 115–125, July (2007)

14. Emily Bernstein and C. David Allis. **RNA meets chromatin**. *Genes & Development*, 19, 1635-1655 (2005)
15. E. Levine and T. Hwa. **Small RNAs establish gene expression thresholds**. *Current Opinion in Microbiology*, vol. 11, no. 6, 574-579. Dec. (2008)
16. D Peer and J Lieberman. Special delivery: targeted therapy with small RNAs. *Gene Therapy*, 18, 1127–1133 (2011)
17. Jose L. Reyes and Nam-Hai Chua. **ABA induction of miR159 controls transcript levels of two MYB factors during Arabidopsis seed germination**. *The Plant Journal*, 49, 592–606 (2007)
18. Nathaniel L. Rosi and Chad A. Mirkin. **Nanostructures in Biodiagnostics**. *Chemical Reviews*, Vol.105, No.4, 1547- 1561 (2005)
19. David A. Giljohann & Chad A. Mirkin. **Drivers of biodiagnostics development**. *Nature*, Vol. 462, 461-464 26 November (2009)
20. Savka I. Stoeva, Jae-Seung Lee, C. Shad Thaxton, and Chad A. Mirkin. **Multiplexed DNA Detection with Biobarcoded Nanoparticle Probes**. *Angewandte Chemie Int. Ed.*, 45, 3303 – 3306 (2006)
21. Yi-Cheun Yeh, Brian Creran and Vincent M. Rotello. **Gold nanoparticles: preparation, properties, and applications in bionanotechnology**. *Nanoscale*, 4, 1871-1880 (2012)
22. David A. Giljohann, Dwight S, Seferos, Andrew E. Prigodich, Pinal C. Patel, Chad A. Mirkin. **Gene Regulation with Polyvalent siRNA- Nanoparticle Conjugates**. *J. Am. Chem. Soc.*, 131, 2072-2073 (2009)
23. Dianping Tang, Ruo Yuan, Yaqin Chai. **Biochemical and immunochemical characterization of the antigen–antibody reaction on a non-toxic biomimetic interface immobilized red blood cells of crucian carp and gold nanoparticles**. *Biosensors and Bioelectronics* 22, 1116–1120 (2007)
24. Alastair W. Wark, Hye Jin Lee, Abraham J. Qavi, and Robert M. Corn. **Nanoparticle-Enhanced Diffraction Gratings for Ultrasensitive Surface Plasmon Biosensing**. *Analytical Chemistry*, 79, 6697-6701 (2007)
25. Kongcheng Hu, Ping Liu, Sujuan Ye, Shusheng Zhang. **Ultrasensitive electrochemical detection of DNA based on PbS nanoparticle tags and nanoporous gold electrode**. *Biosensors and Bioelectronics* 24, 3113–3119 (2009)
26. Jae-Seung Lee, Min Su Han, and Chad A. Mirkin. **Colorimetric Detection of Mercuric Ion (Hg²⁺) in Aqueous Media using DNA-Functionalized Gold Nanoparticles**. *Angewandte Chemie Int. Ed.*, 46, 4093 –4096 (2007)

27. Qiang Chen, Wei Tang, Dingzhong Wang, Xiaojie Wu, Na Li, Feng Liu. **Amplified QCM-D biosensor for protein based on aptamer-functionalized gold nanoparticles**. *Biosensors and Bioelectronics* 26, 575–579 (2010)
28. Robert L. Letsinger, Chad A. Mirkin, Robert Elghaman, Robert C. Mucic and James J. Storhoff. **Chemistry of oligonucleotide-Gold Nanoparticle Conjugates**.
29. Katherine C. Grabar, R. GrWith Freeman,t Michael B. Hommer, and Michael J. Natan. **Preparation and Characterization AU colloid Monolayers**. *Analytical Chemistry*, 67, 735-743 (1995)
30. Hye Jin Lee, Alastair W. Wark and Robert M. Corn. **Microarray methods for protein biomarker detection**. *Analyst*, 133, 975-983 (2008)
31. QCM-D AND NANOPARTICLES RESEARCH-qsense.com
32. Xiao-xiao He, Kemin Wang, Weihong Tan, Bin Liu, Xia Lin, Chunmei He, Du Li, Shasheng Huang, and Jun Li. **Bioconjugated Nanoparticles for DNA Protection from Cleavage**. *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 125, no. 24, 7168–7169 (2003)
33. Edward M. Nelson and Lewis J. Rothberg. **Kinetics and Mechanism of Single-Stranded DNA Adsorption onto Citrate-Stabilized Gold Nanoparticles in Colloidal Solution**. *Langmuir*, 27(5), 1770–1777 (2011)
34. Sung Yong Park, Abigail K. R. Lytton-Jean, Byeongdu Lee, Steven Weigand, George C. Schatz & Chad A. Mirkin. **DNA-programmable nanoparticle crystallization**. *Nature*, Vol. 451, 553-556, January (2008)
35. Wolfgang J. Parak, Teresa Pellegrino, Christine M. Micheel, Danielle Gerion, Shara C. Williams, A. Paul Alivisatos. **Conformation of Oligonucleotides Attached to Gold Nanocrystals Probed by Gel Electrophoresis**. *Nanoletters*, Vol. 3, 33-36 (2003)
36. Joshua I. Cutler, Evelyn Auyeung, Chad A. Mirkin. **Spherical Nucleic Acids**. *J. Am. Chem. Soc.*, 134, 1376-1391 (2012)
37. Zhi Li, Rongchao Jin, Chad A. Minkin and Robert L. Letsinger. **Multiple thiol-anchor capped DNA-GOLD nanoparticle conjugates**. *Nucleic Acid Research*, vol. 30, No 7, 1558-1562 (2002)
38. Sarah J. Hurst, Abigail K. R. Lytton-Jean and Chad A. Mirkin. **Maximizing DNA Loading on a Range of GoldNanoparticle Sizes**. *Analytical Chemistry*, 78, 8313-8318 (2006)
39. Nishi Bhatt, Po-Jung Jimmy Huang, Neeshma Dave, and Juewen Liu. **Dissociation and Degradation of Thiol-Modified DNA on Gold Nanoparticles in Aqueous and Organic Solvents**. *Langmuir*, 27, 6132–6137 (2011)
40. Yoshio Okahata,* Masanori Kawase, Kenichi Niikura, Fuyuka Ohtake, Hiroyuki Furusawa, and Yasuhito Ebara. **Kinetic Measurements of DNA Hybridization on an Oligonucleotide-Immobilized 27-MHz Quartz Crystal Microbalance**. *Analytical Chemistry*, 70, 1288-1296 (1998)