

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ - ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΩΝ

Μελέτη της πρόσδεσης της SecA σε πρότυπες μεμβράνες με ακουστικό βιοαισθητήρα και μικροσκοπία φθορισμού

ΠΕΤΡΑΚΗ ΚΑΤΕΡΙΝΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΓΚΙΖΕΛΗ ΗΛΕΚΤΡΑ



HPAKAEIO 2005



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ - ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΠΟΚΤΗΣΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΤΙΤΛΟΥ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Μελέτη της πρόσδεσης της SecA σε πρότυπες μεμβράνες με ακουστικό βιοαισθητήρα και μικροσκοπία φθορισμού

ΠΕΤΡΑΚΗ ΚΑΤΕΡΙΝΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΓΚΙΖΕΛΗ ΗΛΕΚΤΡΑ

<u>Διμελής επιτροπή</u>: Γκιζελή Η. Πανόπουλος Ν.

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2005

Η μελέτη αυτή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Τεχνολογίας Βιοαισθητήρων του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ειλικρινά την Καθηγήτρια Γκιζελή Ηλέκτρα, αρχικά διότι με δέχτηκε στο εργαστήριό της και μετά για την πολύτιμη βοήθειά της και τη συνεχή συμπαράστασή της κατά τη διάρκεια της εκπόνησης αυτής της μελέτης. Εισέπραξα το συνεχές ενδιαφέρον της και τις συμβουλές της με μεγάλη αμεσότητα και μου ήταν πολύτιμα τόσο κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων όσο και κατά τη συγγραφή.

Επίσης, ευχαριστώ βαθιά την ερευνήτρια Kathryn Melzak που με τις γνώσεις της και την υπομονή της με υποστήριζε καθημερινά αλλά και για τη συμπαράστασή της στις δύσκολες στιγμές. Ευχαριστώ και την Tamar Shahal που με τις συμβουλές της και την εμπειρία της στο αντικείμενο με διευκόλυνε κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων.

Όμως, αισθάνομαι δυστυχής που ο καθηγητής Β. Γαλανόπουλος δεν είναι πια κοντά μας και δεν μπορώ να εκφράσω την ευγνωμοσύνη για τη βοήθειά του όποτε τη χρειάστηκα, για τη φιλοξενία στο Εργαστήριο Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας και για την ευγένειά του.

Οι φωτογραφίες από το μικροσκόπιο φθορισμού ελήφθησαν με την κάμερα του Εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας Φυτών και ευχαριστώ για τη διευκόλυνση αυτή. Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον ερευνητή Κρίτωνα Καλαντίδη για όλο το ενδιαφέρον και τη βοήθεια του πριν ξεκινήσω τη μελέτη αλλά και για κάθε είδους βοήθεια κατά τη διάρκεια αυτής.

Θα ήθελα επίσης να αναφερθώ στα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου Τεχνολογίας Βιοαισθητήρων και ιδιαίτερα στη Δώρα Αυχούδια αφενός για τις φωτογραφίες AFM και αφετέρου για την ευχάριστη παρουσία της και την αισιοδοξία της.

Τέλος, νιώθω την ανάγκη να αναφερθώ στην οικογένειά μου και στους ανθρώπους που μπορεί να μη βοήθησαν στα πειράματα, αλλά η παρουσία τους ήταν τόσο ευχάριστη και η συμπαράστασή τους τόσο δυνατή που τα θεωρώ εξίσου σημαντικά. Έτσι, στον Νίκο, στη Τζένη και φυσικά στον Τάσο ένα μεγάλο ευχαριστώ.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Γ	ΙΕΡΙΛ	HΨE	Ι	3
1	ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΜΒΡΑΝΕΣ			
	1.1	Нc	σημασία των βιολογικών μεμβρανών και τα κύρια χαρακτηριστικά	
	τους	4		
	1.1	1.1	Αυθόρμητος σχηματισμός διπλοστοιβάδων από λιπίδια	5
	1.1	1.2	Ιδιότητες των διπλοστοιβάδων λιπιδίων	7
	1.1.3		Διάχυση των λιπιδίων και μεμβρανικών πρωτεϊνών	9
	1.2	Eφ	αρμογές των υποστηριζόμενων λιπιδικών διπλοστοιβάδων (ΥΛΔ) 1	1
	1.2	2.1	Σχηματισμός και χειρισμός των υποστηριζόμενων μεμβρανών1	1
	1.2.2		Οι λιπιδικές διπλοστοιβάδες ως εργαλείο1	4
	1.2	2.3	Μέθοδοι μελέτης λιπιδικής διπλοστοιβάδας1	6
2	AK	ζΟΥΣ	ΤΙΚΟΙ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ1	9
	2.1	Ако	ουστικοί αισθητήρες1	9
	2.2	Ако	ουστικός βιοαισθητήρας βασισμένος σε κύματα Love	0
	2.3	Χα	ρακτηριστικά ακουστικού κύματος και ακουστικών μετρήσεων 2	3
	2.4	Па	ρασκευή ακουστικών μικροσυσκευών	6
	2.4	4.1	Love wave device ως βιοαισθητήρας: Πλεονεκτήματα και	
	μει	ιονεκ	τήματα2	7
	2.5	Ап	όκριση ακουστικού σήματος κατά τη δημιουργία λιπιδιακής	
διπλοστοιβάδας			7	
2.6 To PD		То	PDMS στην επιφάνεια του ακουστικού βιοαισθητήρα για τη	
	δημιο	ουργί	α υποστηριζόμενης λιπιδικής διπλοστοιβάδας	8
	2.6	5.1	Χάραξη με χημεία πλάσματος2	9
	2.7	Σκα	οπός της μελέτης	0
	2.7	7.1	Η πρωτεΐνη SecA	1
3	YΛ	IKA	ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	3
	3.1	Ак	ουστική μικροσυσκευή	3
	3.2	Σύα	στημα ακουστικών μετρήσεων3	3
	3.3	Δηι	1ιουργία ακουστικού κυματοδηγού3	4
	3.4	Xά	ραξη με χημεία πλάσματος (plasma etching)3	6
	3.5	Eνα	αιώρημα λιποσωμάτων egg PC και E. coli	6
	3.5	5.1	Εξώθηση3	7

	3.6	Πρωτεΐνη SecA	38				
	3.7	Μικροσκόπιο φθορισμού	38				
	3.8	Καθαρισμός των μικροσυσκευών μετά το τέλος του πειράματος	39				
4	АПС	ΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	40				
	4.1	Δημιουργία υποστηριζόμενης λιπιδικής διπλοστοιβάδας (ΥΛΔ) από egg	•				
	ΡС λιτ	PC λιπίδια					
	4.2	Δημιουργία υποστηριζόμενης λιπιδικής διπλοστοιβάδας από λιπίδια					
	Esche	Escherichia coli					
	4.3	Δέσιμο της πρωτεΐνης SecA στην υποστηριζόμενη λιπιδική					
	διπλοσ	ποιβάδα από Ε. coli λιπίδια 5	54				
5	ΣΥΝ	ΙΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	58				
В	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ						

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σε αυτή την εργασία γίνεται προσπάθεια για την ανάπτυξη μεμβρανικού μοντέλου δημιουργώντας υποστηριζόμενη λιπιδική διπλοστοιβάδα (ΥΛΔ) από Ε. coli λιπίδια. Η διπλοστοιβάδα σχηματίζεται πάνω στην επιφάνεια του ακουστικού αισθητήρα Love wave αφού έχει προηγουμένως επικαλυφθεί με PMMA 17% (ως κυματοδηγός) πάνω από το οποίο έχει τοποθετηθεί υδρόφιλο στρώμα PDMS 1 % και πολυλυσίνη. Ο σχηματισμός της ΥΛΔ γίνεται ως αποτέλεσμα της σύντηξης των λιποσωμάτων από E. coli λιπίδια. Ο σχηματισμός αυτός μελετάται από τη μεταβολή στη φάση του ακουστικού κύματος σε συνάρτηση με το χρόνο, ενώ επιβεβαιώνεται από την εξέταση της επιφάνειας στο μικροσκόπιο φθορισμού για τη διαπίστωση ανάληψης φθορισμού μετά τη φωτολεύκανση. Η δημιουργία της ΥΛΔ συνδέθηκε με χαρακτηριστική πτώση της φάσης του ακουστικού κύματος μεγέθους 0.7 deg. Στη συνέχεια, πάνω στη σχηματισμένη ΥΛΔ τοποθετήθηκε η βακτηριακή πρωτεΐνη SecA (πρωτεΐνη του εκκριτικού συστήματος του κυττάρου) όπου πραγματοποιήθηκε πρόσδεση με την ΥΛΔ. Ο ακουστικός βιοαισθητήρας Love wave και ιδιαίτερα η μελέτη της μεταβολής του ακουστικού κύματος έδωσαν επαρκείς πληροφορίες για τις βιολογικές μεταβολές και αντιδράσεις που συνέβησαν στην επιφάνειά του.

1 ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΜΒΡΑΝΕΣ

1.1 Η σημασία των βιολογικών μεμβρανών και τα κύρια χαρακτηριστικά τους

Οι βιολογικές μεμβράνες μπορεί να θεωρηθούν ως οργανωμένα συγκροτήματα σε σχήμα λεπτού φύλλου που αποτελούνται κυρίως από πρωτεΐνες και λιπίδια. Οι λειτουργίες που επιτελούνται από τις μεμβράνες είναι απαραίτητες για την ίδια τη ζωή. Η μελέτη των βιολογικών μεμβρανών είναι μεγάλης σπουδαιότητας και πολλά εγχειρίδια Βιοχημείας και Κυτταρικής Βιολογίας αναφέρονται εκτενώς σε αυτή (Struyer 1997, Alberts et al., 2002) Οι κυπαρικές μεμβράνες προσδίδουν στα κύτταρα την ατομικότητά τους χωρίζοντας το κάθε κύτταρο από το περιβάλλον του, την ίδια στιγμή όμως είναι φραγμοί με μεγάλη επιλεκτική διαπερατότητα αφού περιέχουν εξειδικευμένες μοριακές αντλίες και μοριακά κανάλια. Επίσης, ελέγχουν τη ροή πληροφοριών μεταξύ των κυττάρων και του περιβάλλοντός τους. Περιέχουν ειδικούς υποδοχείς για την ανίχνευση σημάτων έξωθεν και σε ορισμένες περιπτώσεις παράγουν σήματα χημικής ή ηλεκτρικής φύσης. Επιπλέον, οι δύο πιο σημαντικές διεργασίες μετατροπής ενέργειας σε βιολογικά συστήματα, η φωτοσύνθεση και η οξειδωτική φωσφορυλίωση, πραγματοποιούνται από μεμβρανικά συστήματα που περιέχουν κανονικά διατεταγμένες σειρές ενζύμων και άλλων πρωτεϊνών.

Οι μεμβράνες ενώ διαφέρουν μεταξύ τους τόσο στη δομή όσο και στη λειτουργία τους (ανάλογα με το είδος των κυττάρων που βρίσκονται), εντούτοις έχουν ορισμένα κοινά χαρακτηριστικά.

- Έχουν δομή όμοια με αυτή ενός λεπτού φύλλου, με πάχος μερικών μόνο μορίων, και σχηματίζουν ένα κλειστό σύνορο μεταξύ διαμερισμάτων που έχουν διαφορετική σύσταση. Το πάχος των περισσοτέρων μεμβρανών είναι μεταξύ 60 και 100 Å.
- Οι μεμβράνες αποτελούνται κυρίως από λιπίδια και πρωτεΐνες. Ο λόγος της μάζας πρωτεΐνης προς λιπίδιο στις περισσότερες βιολογικές μεμβράνες κυμαίνεται μεταξύ 1:4 και 4:1. Οι μεμβράνες περιέχουν επίσης υδατάνθρακες που είναι συνδεδεμένοι με τα λιπίδια και τις πρωτεΐνες.
- Τα μεμβρανικά λιπίδια είναι συγκριτικά μικρά μόρια τα οποία έχουν μια υδρόφοβη και μια υδρόφιλη περιοχή. Αυτά τα λιπίδια σε υδατικό περιβάλλον σχηματίζουν αυθόρμητα κλειστά διμοριακά λεπτά φύλλα.

Αυτές οι διπλοστοιβάδες λιπιδίων αποτελούν φραγμούς στη ροή πολικών μορίων.

- Συγκεκριμένες πρωτεΐνες επιτελούν χαρακτηριστικές λειτουργίες της κάθε μεμβράνης. Οι πρωτεΐνες λειτουργούν ως αντλίες, κανάλια (δίοδοι), υποδοχείς, μεταγωγείς ενέργειας και ένζυμα. Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες είναι βυθισμένες μέσα στη διπλοστοιβάδα λιπιδίων, η οποία και δημιουργεί το κατάλληλο περιβάλλον για τη δράση τους.
- Οι μεμβράνες είναι μη ομοιοπολικά συγκροτήματα. Τα μόρια πρωτεϊνών και λιπιδίων που τις αποτελούν διατηρούνται ως δομημένο σύνολο μέσω των πολλών μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων, οι οποίες είναι και συνεργειακές.
- Οι μεμβράνες είναι ασυμμετρικές. Οι δύο όψεις της κάθε μεμβράνης είναι διαφορετικές μεταξύ τους.
- Οι μεμβράνες είναι ρευστές δομές. Τα λιπιδικά μόρια διαχέονται με μεγάλη ταχύτητα μέσα στο μεμβρανικό επίπεδο, όπως κάνουν και οι μεμβρανικές πρωτεΐνες, εκτός εάν είναι αγκυροβολημένες μέσω ειδικών αλληλεπιδράσεων. Οι μεμβράνες μπορούν να θεωρηθούν ως δισδιάστατα διαλύματα προσανατολισμένων λιπιδίων και πρωτεϊνών (Struyer, 1997).

1.1.1 <u>Αυθόρμητος σχηματισμός διπλοστοιβάδων από λιπίδια</u>

Η ποικιλία των μεμβρανικών λιπιδίων είναι πολύ μεγάλη αλλά όλα τα λιπίδια είναι αμφιπαθή μόρια, δηλαδή περιέχουν μια υδρόφοβη και μία υδρόφιλη περιοχή (Εικόνα 1-1).



Εικόνα 1-1: Συμβολισμός για ένα μόριο φωσφολιπιδίου ή γλυκολιπιδίου

Η διάταξη των φωσφολιπιδίων και γλυκολιπιδίων σε υδατικό περιβάλλον σχετίζεται άμεσα με το γεγονός ότι οι πολικές κεφαλές τους έχουν μια συγγένεια προς το νερό, ενώ οι υδρογονανθρακικές ουρές τους το αποφεύγουν. Αυτές οι προτιμήσεις θα μπορούσαν να ικανοποιηθούν με τον σχηματισμός ενός μικυλλίου, μιας σφαιρικής δομής όπου οι πολικές κεφαλές βρίσκονται στην επιφάνεια του μικυλλίου, ενώ οι υδρογονανθρακικές αλυσίδες έχουν συσσωρευθεί στο εσωτερικό του. Μία άλλη διάταξη που ικανοποιεί τις προτιμήσεις τόσο των υδδρόφιλων όσο και των υδρόφοβων ομάδων αυτών των μεμβρανικών λιπιδίων είναι αυτή του διμοριακού λεπτού φύλλου, που ονομάζεται επίσης διπλοστοιβάδα λιπιδίων (Εικόνα 1-2)



Εικόνα 1-2: Διάγραμμα μιας διατομής μεμβρανικής διπλοστοιβάδας που έχει σχηματιστεί από μόρια φωσφολιπιδίου. Δεξιά, διάγραμμα της διατομής ενός μικυλλίου το οποίο έχει σχηματιστεί από ιοντισμένα μόρια λιπαρών οξέων.

Η ευνοούμενη δομή για τα περισσότερα φωσφολιπίδια και γλυκολιπίδια σε υδατικό περιβάλλον είναι το διμοριακό λεπτό φύλλο, παρά το μικύλλιο. Ο λόγος είναι ότι οι δύο αλυσίδες λιπαρών οξέων καταλαμβάνουν υπέρμετρα μεγάλο όγκο και δε χωρούν στο εσωτερικό του μικυλλίου. Αντίθετα, τα άλατα των λιπαρών οξέων τα οποία περιέχουν μόνο μια αλυσίδα λιπαρού οξέος, αυθόρμητα σχηματίζουν μικύλλια. Ο σχηματισμός διπλοστοιβάδων αντί μικυλλίων από τα φωσφολιπίδια έχει κρίσιμη βιολογική σημασία. Το μικύλλιο είναι μία περιορισμένη δομή με μέση διάμετρο 200 Å. Από την άλλη πλευρά, ένα διμοριακό λεπτό φύλλο μπορεί να έχει μακροσκοπικές διαστάσεις, μέχρι και 107 Å. Τα φωσφολιπίδια και τα γλυκολιπίδια είναι βασικά συστατικά της κυτταρικής μεμβράνης επειδή σχηματίζουν αυθόρμητα εκτεταμένα διμοριακά φύλλα. Επιπροσθέτως, τέτοιου είδους φύλλα λειτουργούν και φραγμοί ως διαπερατότητας, παραμένοντας όμως σε ρευστή κατάσταση.

Ο σχηματισμός διπλοστοιβάδων είναι μία διεργασία αυτοσυγκρότησης. Με άλλα λόγια η δομή του διμοριακού λεπτού φύλλου προκύπτει από τη δομή των επί μέρους λιπιδικών συστατικών, συγκεκριμένα από τον αμφιπαθή χαρακτήρα τους. Ο σχηματισμός διπλοστοιβάδων λιπιδίων από γλυκολιπίδια και φωσφολιπίδια στο νερό είναι μια γρήγορη και αυθόρμητη διαδικασία. Οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις είναι η κύρια κινητήρια δύναμη στο σχηματισμό διπλοστοιβάδων λιπιδίων. Οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις παίζουν επίσης καθοριστικό ρόλο στην αναδίπλωση των πρωτεΐνών σε υδατικό περιβάλλον. Τα μόρια του νερού απελευθερώνονται από τις υδρογονανθρακικές ουρές των λιπιδίων καθώς αυτές οι ουρές μετακινούνται προς το μη πολικό εσωτερικό της διπλοστοιβάδας. Επιπροσθέτως, μεταξύ των υδρογονανθρακικών αλυσίδων ασκούνται ελκτικές δυνάμεις van der Waals. Τέλος, υπάρχουν ηλεκτροστατικές δυνάμεις και δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των πολικών κεφαλών και των μορίων νερού από το περιβάλλον. Συνεπώς, οι διπλοστοιβάδες λιπιδίων σταθεροποιούνται από το σύνολο των δυνάμεων που μεσολαβούν στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ μορίων στα βιολογικά συστήματα (Alberts et al., 2002).

1.1.2 Ιδιότητες των διπλοστοιβάδων λιπιδίων

Ένα χαρακτηριστικο των διπλοστοιβάδων λιπιδίων είναι ότι είναι συνεργειακές δομές. Τέτοιες δομές διατηρούνται εξ αιτίας πολλών αλληλοενισχυόμενων, μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων. Τα φωσφολιπίδια και τα γλυκολιπίδια σε υδατικό περιβάλλον συναθροίζονται το ένα δίπλα στο άλλο ώστε να ελαχιστοποιήσουν τον αριθμό των εκτεθειμένων υδρογονανθρακικών αλυσίδων. Αυτή η συνάθροιση ευνοείται επίσης και από τις μεταξύ τους ελκτικές δυνάμεις τύπου van der Waals. Η άσκηση αυτού του συνόλου των δυνάμεων έχει τρεις σημαντικές βιολογικές προεκτάσεις: α) Οι διπλοστοιβάδες λιπιδίων έχουν την τάση να είναι εκτεταμένες, β)οι διπλοστοιβάδες λιπιδίων θα έχουν την τάση να ενώνουν τα άκρα τους ώστε να μην υπάρχουν εκτεθειμένες υδρογονανθρακικές αλυσίδες, πράγμα που σημαίνει ότι θα δημιουργείται με το κλείσιμό τους ένα διαμέρισμα και γ) οι διπλοστοιβάδες λιπιδίων κλείνουν από μόνες τους, επειδή κάθε οπή ή άνοιγμα στη διπλοστοιβάδα είναι ενεργειακά μη επιτρεπτό.



Εικόνα 1-3: Απεικόνιση ενός λιπιδικού κυστιδίου (λιπόσωμα)

Η διαπερατότητα των διπλοστοιβάδων λιπιδίων έχει προσδιοριστεί σε δύο πολύ καλά καθορισμένα πρότυπα συστήματα: τα λιπιδικά κυστίδια (λιποσώματα) και τις επίπεδες μεμβρανικές διπλοστοιβάδες. Αυτά τα πρότυπα συστήματα έχουν καταστεί οι πηγές σημαντικών πληροφοριών αναφορικά με τη λειτουργία των βιολογικών μεμβρανών, συγκεκριμένα τον ρόλο τους ως φραγμοί διαπερατότητας.

Τα λιποσώματα είναι υδατικά διαμερίσματα που περικλείονται από μία λιπιδική διπλοστοιβάδα (Εικόνα 1-3). Μπορούν να σχηματιστούν με την εναιώρηση ενός κατάλληλου λιπιδίου, όπως της φωσφατιδυλοχολίνης, σε ένα υδατικό μέσο. Αυτό το μείγμα στη συνέχεια εκτίθεται σε υπερήχους (sonication) ώστε να προκύψει ένα εναιώρημα κόκκων (κλειστών κυστιδίων) όμοιου μεγέθους. Εναλλακτικά, μπορούν να παραχθούν κυστίδια με τη γρήγορη ανάμειξη ενός αλκοολικού διαλύματος λιπιδίου με νερό. Αυτό μπορεί να γίνει με την ένεση του λιπιδικού διαλύματος μέσω μίας λεπτής βελόνας σε ένα υδατικό διάλυμα. Τα κυστίδια που σχηματίζονται με αυτές τις μεθόδους είναι περίπου σφαιρικά σε μέγεθος και έχουν διάμετρο περίπου 500 Å. Η παγίδευση ιόντων ή πολικών μορίων στο υδατικό διαμέρισμα των κυστιδίων είναι δυνατή εφ όσον ο σχηματισμός των κυστιδίων γίνει παρουσία τέτοιων ουσιών.

Μία άλλη συνθετική μεμβράνη καθορισμένης σύστασης και δομής είναι η επίπεδη μεμβρανική διπλοστοιβάδα. Αυτή η δομή μπορεί να σχηματιστεί στον κενό χώρο μίας οπής διαμέτρου 1 χιλιοστού που βρίσκεται πάνω σε ένα χώρισμα μεταξύ δύο υδατικών διαλυμάτων. Μία τέτοιου είδους μεμβράνη είναι κατάλληλη για μελέτες των ηλεκτρικών ιδιοτήτων των μεμβρανών λόγω του μεγάλου μεγέθους της και της απλής γεωμετρικής της κατασκευής. Η ηλεκτρική αγωγιμότητα αυτής της μακροσκοπικής μεμβρανικής διπλοστοιβάδας μελετάται πολύ εύκολα με την τοποθέτηση ηλεκτροδίων στο κάθε υδατικό διαμέρισμα. Για παράδειγμα, η διαπερατότητά της σε ιόντα προσδιορίζεται από τη μέτρηση του ηλεκτρικού ρεύματος δια μέσου της μεμβράνης, ως συνάρτηση της εφαρμοζόμενης διαφοράς δυναμικού.

Μελέτες προσδιορισμού της διαπερατότητας μεμβρανικών κυστιδίων και της αγωγιμότητας επίπεδων διπλοστοιβάδων έχουν δείξει ότι οι μεμβρανικές λιπιδικές διπλοστοιβάδες έχουν πολύ χαμηλή διαπερατότητα σε ιόντα και στα περισσότερα πολικά μόρια. Το νερό αποτελεί τη φωτεινή εξαίρεση σε αυτή τη γενίκευση αφού διασχίζει τέτοιου είδους μεμβράνες με μεγάλη ευκολία. Το εύρος των προσδιορισθέντων συντελεστών διαπερατότητας είναι πολύ μεγάλο. Για παράδειγμα, το Na⁺ και το K⁺ διασχίζουν τέτοιες μεμβράνες 10⁹ φορές πιο αργά από ότι το H₂0.Οι συντελεστές διαλυτότητας των μικρών μορίων σχετίζονται με τη διαλυτότητά τους σε έναν μη πολικό διαλύτη σε σχέση με τη διαλυτότητά τους στο νερό. Αυτή η σχέση υπονοεί ότι τα μικρά μόρια μάλλον διαπερνούν τη μεμβρανική λιπιδική διπλοστοιβάδα με τον ακόλουθο τρόπο: Πρώτα απ' όλα χάνουν τα μόρια νερού με τα οποία περιβάλλονται και στη συνέχεια διαλύονται στον υδρογονανθρακικό πυρήνα της μεμβράνης και τελικά διαχέονται μέσω αυτού του πυρήνα στην άλλη πλευρά της μεμβράνης όπου και επαναδιαλύονται στο νερό. Ένα ιόν όπως το Na⁺ διασχίζει τη μεμβράνη πολύ αργά, γιατί η απομάκρυνση του συγκροτημένου υδατικού περιβλήματός του είναι ενεργειακά μη ευνοϊκή διαδικασία.

1.1.3 Διάχυση των λιπιδίων και μεμβρανικών πρωτεϊνών

Οι βιολογικές μεμβράνες δεν είναι άκαμπτες και αδιατάρακτες δομές. Αντίθετα, τα λιπίδια και πολλές μεμβρανικές πρωτεΐνες βρίσκονται σε διαρκή πλευρική κίνηση μέσα στο επίπεδο της μεμβράνης. Η πολύ γρήγορη μετακίνηση των μεμβρανικών πρωτεΐνών έχει παρατηρηθεί μέσω μικροσκοπίας φθορισμού.



Εικόνα 1-4: Η τεχνική της ανάληψης φθορισμού μετά από φωτολεύκανση: (Α) φθορισμός από μια σημασμένη μεμβρανική συνιστώσα σε μια μικρή φωτιζόμενη περιοχή του κυττάρου. (Β) τα φθορίζοντα μόρια λευκαίνονται μετά από έναν έντονο παλμό φωτός. (Γ) η ένταση του φθορισμού επανέρχεται. (Δ) Η ταχύτητα ανάληψης εξαρτάται από το συντελεστή διάχυσης

Μία γενική και ποσοτική μέθοδος για τη μέτρηση της κινητικότητας μεμβρανικών μορίων σε ανέπαφα ζωντανά κύτταρα είναι αυτή της ανάληψης φθορισμού μετά από φωτολεύκανση (fluorescence recovery after photobleaching) (Εικόνα 1-4). Πρώτα, σημαίνεται ειδικά με φθορίζουσα χρωμοφόρο ουσία μία συνιστώσα της μεμβρανικής επιφάνειας. Μία μικρή περιοχή της κυτταρικής επιφάνειας (περίπου 3 μm²) παρατηρείται κάτω από το φθορίζον μικροσκόπιο.

Τα φθορίζοντα μόρια αυτής της περιοχής καταστρέφονται στη συνέχεια από έναν πολύ έντονο οπτικό παλμό που προέρχεται από ακτίνες λέιζερ. Ο φθορισμός της περιοχής αυτής καταγράφεται ως συνάρτηση του χρόνου, χρησιμοποιώντας μία αρκετά χαμηλή ένταση φωτός ώστε να μη σημειωθεί περαιτέρω λεύκανση. Αν η σημασμένη ένωση είναι ευκίνητη, τα λευκαθέντα μόρια θα απομακρυνθούν από τη φωτιζόμενη περιοχή της μεμβράνης, ενώ τα μη λευκαθέντα μόρια θα μετακινηθούν προς αυτή την περιοχή. Η ταχύτητα της ανάληψης φθορισμού εξαρτάται από την κινητικότητα της σημασμένης συνιστώσας μέσα στο επίπεδο της κυτταρικής μεμβράνης. Η κινητικότητα αυτή εκφράζεται ως συνάρτηση του συντελεστή διάχυσης D. Η μέση απόσταση s (σε cm) που καλύπτεται στο επίπεδο των δύο διαστάσεων σε χρόνο t (σε s) εξαρτάται από το συντελεστή D (cm²s⁻¹) σύμφωνα με την εξίσωση:

$s=(4Dt)^{1/2}$

Ο συντελεστής διάχυσης λιπιδίων σε διάφορες μεμβράνες είναι περίπου 10-8 cm²s⁻¹. Άρα ένα μόριο φωσφολιπιδίου μετακινείται κατά μία μέση απόσταση 2x10-4 cm σε 1 s. Αυτό σημαίνει ότι ένα μόριο λιπιδίου μπορεί να μετακινηθεί από το ένα άκρο ενός βακτηρίου στο άλλο σε ένα δευτερόλεπτο. Το μέγεθος του παρατηρούμενου συντελεστή διάχυσης δείχνει ότι το ιξώδες της μεμβράνης είναι περίπου εκατό φορές μεγαλύτερο από αυτό του νερού, δηλαδή περίπου όσο αυτό του ελαιολάδου.

Αντίθετα, οι πρωτεΐνες διαφέρουν πάρα πολύ στην πλευρική κινητικότητά τους στο επίπεδο της κυτταρικής μεμβράνης. Ορισμένες πρωτεΐνες είναι τόσο ευκίνητες όσο και τα μεμβρανικά λιπίδια, ενώ ορισμένες άλλες είναι ουσιαστικά αμετακίνητες. Για παράδειγμα, η πρωτεΐνη φωτοϋποδοχέας ροδοψίνη, η οποία είναι πολύ ευκίνητη, έχει συντελεστή διάχυσης 4x10-4cm²s-1 Η πολύ ταχεία μετακίνηση της ροδοψίνης είναι απαραίτητη για γρήγορη μεταβίβαση μηνύματος. Στο άλλο άκρο βρίσκεται η ινοσυνδετίνη (fibronectin), μία περιφερειακή μεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη η οποία αλληλεπιδρά με τα συστατικά του εξωκυττάριου χώρου. Ο συντελεστής D της ινοσυνδετίνης είναι μικρότερος από 10-¹²cm²s-1. Η ινοσυνδετίνη έχει τόσο μικρή κινητικότητα επειδή είναι αγκυροβολημένη στα κυτταρικά νημάτια ακτίνης στο εσωτερικό της κυτταρικής μεμβράνης, μέσω της ενσωματίνης (integrin). Αυτή η διαμεμβρανική πρωτεΐνη συνδέει τον εξωκυττάριο χώρο με τον κυτταροσκελετό (Struyer L., 1997)

Τέλος, ακριβώς επειδή η πλευρική διάχυση είναι χαρακτηριστικό των μεμβρανών, η ανάληψη της φωτολεύκανσης μέσω φθορισμού αποτελεί μία

τεχνική με την οποία διαπιστώνεται η παρουσία ή όχι λιπιδικής διπλοστοιβάδας πάνω σε μία επιφάνεια.

1.2 Εφαρμογές των υποστηριζόμενων λιπιδικών διπλοστοιβάδων (ΥΛΔ)

Όταν μια λιπιδική διπλοστοιβάδα δημιουργηθεί και τοποθετηθεί πάνω σε μια στερεή επιφάνεια τότε πρόκειται για υποστηριζόμενη λιπιδική διπλοστοιβάδα (Οι υποστηριζόμενες λιπιδικές διπλοστοιβάδες ιδιαίτερα όταν περιέχουν και πρωτεΐνες προσομοιάζουν τις βιολογικές μεμβράνες. Οι υποστηριζόμενες μεμβράνες σε στερεά έχουν πρακτικό και επιστημονικό ενδιαφέρον για διάφορους λόγους. Αρχικά, επιτρέπουν σε ανόργανα στερεά (ημιαγωγούς, επιφάνειες επικαλυμμένες με χρυσό) και πολυμερή να αποδεικνύουν τη λειτουργικότητά τους με βιολογικό υλικό. Παρέχουν ένα φυσικό περιβάλλον για την ακινητοποίηση πρωτεΐνών (π.χ. υποδοχείς ορμονών και αντισώματα) χωρίς να υφίστανται μετουσίωση και με ορισμένο προσανατολισμό. Επιτρέπουν την προετοιμασία πολύ λεπτών μονωμένων στρωμάτων για το σχεδιασμό βιοαισθητήρων που βασίζονται στην ηλεκτρική και οπτική ανίχνευση της πρόσδεσης ενός μορίου.

Οι υποστηριζόμενες λιπιδικές διπλοστοιβάδες χωρίζονται από την επιφάνεια του στερεού είτε με στρώμα νερού πάχους της τάξης λίγων nm, είτε με πολύ λεπτά στρώματα μαλακών πολυμερών. Και στις δύο περιπτώσεις διατηρούν τις θερμοδυναμικές και δομικές ιδιότητες των ελεύθερων διπλοστοιβάδων. Αυτό επιτρέπει την εφαρμογή διαφόρων τεχνικών που είναι ευαίσθητες σε μεταβολές της επιφάνειας (μικροσυμβολομετρία, (microinterferometry), ελλειψομετρία (ellipsometry), Φασματοσκοπία Επιφάνειας Πλάσματος (SPS), τεχνική μετασχηματισμού Fourier φασματασκοπίας υπερύθρων (FTIR), πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός (NMR) και ανάκλαση της επιφάνειας με ακτίνες χ και με νετρόνια).

1.2.1 Σχηματισμός και χειρισμός των υποστηριζόμενων μεμβρανών

Τρεις τύποι υποστηριζόμενων μεμβρανών μπορούν να σχηματιστούν: α) Διπλοστοιβάδες που έχουν την εσωτερική λιπιδική στοιβάδα προσκολημμένη στο υπόστρωμα είτε ομοιοπολικά, είτε με ιονικό δεσμό, β) Ελεύθερα υποστηριζόμενες λιπιδικές διπλοστοιβάδες που χωρίζονται από το υπόστρωμα με πολύ λεπτά στρώματα νερού (-10 Å) και γ) Λιπιδικές διπλοστοιβάδες που στέκονται σε πολύ λεπτά, μαλακά και ενυδατωμένα φιλμ πολυμερών. Ένα τελείως διαφορετικό είδος υποστηριζόμενης μεμβράνης μπορεί να σχηματιστεί με πολύ λεπτά φιλμ πολυμερών (π.χ. δεξτράνης) που γίνονται υδρόφοβα με σύζευξη των μακριών αλκυλικών αλυσίδων με τον υδρόφιλο σκελετό του πολυμερούς. Αυτή η μεμβράνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ακινητοποίηση αμφιπαθών υποδοχέων (Εικόνα 1-5).



Εικόνα 1-5: Οι τρεις τύποι των υποστηριζόμενων μεμβρανών: (Α) ενωμένη μεμβράνη με ομοοιοπολικά ακινητοποιημένη την εσωτερική μονοστοιβάδα, (Β) υποστηριζόμενη διπλοστοιβάδα διαχωρισμένη από το υπόστρωμα με πολύ λεπτό φιλμ νερού ή στρώμα πολυμερούς και (Γ) λεπτό φύλλο πολυμερούς από μακρομόρια που έχουν γίνει υδρόφοβα σχηματίζοντας ένα στρώμα για αμφιπαθείς υποδοχείς (Sackmann, 1996)

Οι πιο γνωστοί τρόποι για το σχηματισμό μεμβρανών είναι η μεταφορά της μονοστοιβάδας (με την τεχνική Langmuir-Blodgett (LB)) και η εναπόθεση και σύντηξη λιποσωμάτων. Και στις δύο περιπτώσεις η ομοιομορφία και η συνέχεια της υποστηριζόμενης μεμβράνης εξαρτάται κυρίως από την απαλότητα του υποστρώματος. Για την εναπόθεση και σύντηξη των λιποσωμάτων, η επιφάνεια στην οποία θα στηριχθεί η σχηματιζόμενη μεμβράνη θα πρέπει να είναι η κατάλληλη, ή τα λιποσώματα πρέπει να βρίσκονται υπό πίεση (tension) ή και τα δύο. Η διπλοστοιβάδα μπορεί να συνδεθεί με το υπόστρωμα ηλεκτροστατικά με ιονικές δυνάμεις ή ομοιοπολικά. Δύο διαφορετικοί μηχανισμοί για το άπλωμα της λιπιδικής διπλοστοιβάδας είναι δυνατοί: a) όταν ένα μεγάλο λιπόσωμα απλώνεται μεν, αλλά έχοντας ένα τμήμα της διπλοστοιβάδας ακινητοποιημένο στην επιφάνεια το οποίο όμως τυλίγεται σχηματίζοντας λοβό με λιπιδική διπλοστοιβάδα πάνω στο ακινητοποιημένο τμήμα και β) όταν ένα μονό φύλλο λιπιδικής διπλοστοιβάδας αναπτύσσεται με ανοιχτά άκρα, κάτι που παρατηρείται όταν η επιφάνεια είναι υδρόφιλη και η διπλοστοιβάδα χωρίζεται από την επιφάνεια είτε με πολύ λεπτό στρώμα νερού, είτε με κάποιο φιλμ πολυμερούς (Εικόνα 1-6)



Εικόνα 1-6:Απεικόνιση των δύο πιθανών τρόπων με τους οποίους μπορεί να σχηματιστεί λιπιδική διπλοστοιβάδα

Ο μηχανισμός με τον οποίο σχηματίζεται η λιπιδική διπλοστοιβάδα από τα λιποσώματα έχει μελετηθεί με μέτρηση της μεταβολής της μεταφοράς μάζας και ενέργειας σε μια επιφάνεια χρησιμοποιώντας μικροζυγό κρυσταλλικού χαλαζία (Quartz Crystal Microbalance, QCM). Αυτές οι μελέτες έδειξαν πως τα μικρά λιποσώματα (συνήθως διαμέτρου 25-100 nm) αρχικά απορροφώνται στην επιφάνεια. Όσο βρίσκονται σε μικρή συγκέντρωση και καταλαμβάνουν μικρή περιοχή στην επιφάνεια, παραμένουν σταθερά. Όταν όμως αυξάνεται η συγκέντρωσή τους και καταλαμβάνουν μεγάλο ποσοστό της επιφάνειας, τότε τα λιποσώματα διαρρηγνύονται και συντήκονται ώστε να σχηματίσουν υποστηριζόμενη μεμβράνη (Keller et al., 2000). Το πιο δημοφιλές «στήριγμα» πάνω στο οποίο γίνεται η σύντηξη των λιποσωμάτων και σχηματίζονται οι μεμβράνες είναι μια γυάλινη επιφάνεια. Ο βαθμός στον οποίο συμβαίνει αυτό έχει μελετηθεί ως συνάρτηση του pH και της ιονικής ισχύος. Συγκεκριμένα, για αρνητικά φορτισμένα λιποσώματα η σύντηξη γίνεται ευκολότερα σε υψηλή ιονική ισχύ και χαμηλό pH, ενώ για τα ουδέτερα και θετικά φορτισμένα λιπίδια η σύντηξη είναι εφικτή σε πολύ μεγαλύτερο εύρος pH. Αυτό δηλώνει πως οι Van der Waals και οι ηλεκτροστατικές δυνάμεις καθορίζουν τη σύντηξη των λιποσωμάτων. Όμως, έχει δειχθεί πως το άπλωμα της διπλοστοιβάδας πάνω σε μια επίπεδη επιφάνεια ήταν ευνοϊκό σε χαμηλό pH ανεξάρτητα από το φορτίο της λιπιδικής διπλοστοιβάδας και η διαδικασία καθορίζεται κυρίως από τις δυνάμεις Van der Waals. Από την άλλη, σε υψηλό pH ή σε επιφάνεια που δεν είναι λεία και επίπεδη, η εξάπλωση της μεμβράνης παρεμποδίζεται. Οι ανωμαλίες της επιφάνειας μπορούν να επηρεάσουν τον ομοιόμορφο σχηματισμό υποστηριζόμενης λιπιδικής διπλοστοιβάδας και να αποτελέσουν εμπόδιο στην πλευρική διάχυσή τους (Cremer et al., 1999).

Αφού οι ΥΛΔ διατηρούν τις δομικές και θερμοδυναμικές ιδιότητες των «ελεύθερων» λιπιδιακών διπλοοστοιβάδων, μπορούν να γίνουν αντικείμενο μελέτης ως μεμβράνες μοντέλα. Εξίσου ενδιαφέρουσα όμως είναι η εφαρμογή τους για το σχεδιασμό βιοαισθητήρων. Η βασική ιδέα είναι να χρησιμοποιηθεί η διπλοστοιβάδα ταυτόχρονα α) ως ένας πολύ λεπτός ηλεκτρικός μονωτής, β) ως ένα υπόστρωμα για την ενσωμάτωση κάποιων υποδοχέων και γ) για την καταστολή μη ειδικής πρόσδεσης των μορίων (Sackmann, 1996).

1.2.2 <u>Οι λιπιδικές διπλοστοιβάδες ως εργαλείο</u>

Οι υποστηριζόμενες λιπιδικές διπλοστοιβάδες έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως στην Ανοσολογία ως μοντέλα προκειμένου να μελετηθούν διάφορες κυτταρικές αλληλεπιδράσεις. Για παράδειγμα έχει μελετηθεί η προσκόλληση του υποδοχέα Fc, η σηματοδότηση και ο σχηματισμός ανοσολογικής σύναψης των Τ βοηθητκών κυττάρων και των κυττάρων αντιγονοπαρουσιαστών (Groves et al., 2003). Έχει δειχθεί πως λιπιδικές διπλοστοιβάδες που φέρουν το σύμπλοκο ιστοσυμβατότητας μπορούν να αντικαταστήσουν τα κύτταρα αντιγονοπαρουσιαστές προκειμένου να μελετηθεί η αλληλεπίδρασή τους με τα Τ βοηθητικά κύτταρα (Watts et al, 1986). Επίσης, αντιγόνα που βρίσκονται πάνω σε ΥΛΔ έχουν χρησιμοποιηθεί για την ποσοτικοποίηση της προσκόλλησης των Τ λεμφοκυττάρων στις μεμβράνες (Toezeren et al., 1992).

Λιπιδικές διπλοστοιβάδες από διαφόρων ειδών λιπίδια έχουν χρησιμοποιηθεί ως μοντέλα και έχουν προσδεθεί διάφορα βιομόρια προκειμένου να μελετηθεί είτε η αλληλεπίδρασή τους με άλλα βιομόρια, είτε να μελετηθούν κάποιες δομικές και άλλες ιδιότητες. Τέτοια παραδείγματα είναι η δημιουργιά λιπιδικής διπλοστοιβάδας από E. coli και η εισχώρηση σε αυτήν της πρωτεΐνη SecA για τη μελέτη των μεταβολών στη διάταξή της και το βαθμό εισχώρησής της μέσα στη μεμβράνη (Ulbrandt et al., 1992). Επίσης, οι μηχανικές ιδιότητες και ο βαθμός προσκόλλησης της μυελίνης που είναι σημαντικά για τη λειτουργία της έχουν μελετηθεί με τη βοήθεια μεμβρανικών μοντέλων (Mueller et al., 1999). Άλλο παράδειγμα αποτελεί η νισίνη (βακτηριοσίνη, αντιμικροβιακό πεπτίδιο που παράγεται από κάποια στελέχη του Lactococcus lactis), που χρησιμοποιείται ευρέως στην τεχνολογία τροφίμων, ως φυσικό συντηρητικό ενάντια σε Gram+ βακτήρια. Η ενσωμάτωσή της σε λιπιδική διπλοστοιβάδα και η μελέτη με ανάληψη φθορισμού μετά τη φωτολεύκανση έδωσε πληροφορίες για τον τρόπο αλληλεπίδρασής της με την επιφάνεια των βακτηριακών κυττάρων (Giffard C.J. et al., 1996).

Μια άλλη σημαντική εφαρμογή είναι η δημιουργία μικρομορφωμάτων (micropatterns) από υποστηριζόμενες μεμβράνες. Δηλαδή, με τη βοήθεια κάποιων υλικών που τοποθετούνται στην επιφάνεια, ελέγχεται η συσσώρευση, η οργάνωση και η πλευρική διάχυση των υποστηριζόμενων μεμβρανών. Πολλές μέθοδοι υπάρχουν για αυτό το σκοπό συμπεριλαμβανομένων της φωτολιθογραφίας, της λιθογραφίας με ακτίνα ηλεκτρονίων (electron beam lithography) και εκτύπωση μικροεπαφής (microcontact printing). Επίσης, έχει βρεθεί πως η διπλοστοιβάδα μπορεί να απομακρυνθεί από την επιφάνεια «στυπώνοντας» με μια σφραγίδα από polydimethylsiloxane (PDMS). Με την αφαίρεση της απαραίτητης ποσότητας διπλοστοιβάδας από την επιφάνεια, η επανένωση των τμημάτων της διπλοστοιβάδας που έχουν μείνει δεν είναι δυνατή και έτσι έχουμε μια μεμβρανική σχηματομορφή (Εικόνα 1-7). Είναι επίσης δυνατό να γίνει «εκτύπωση» (printing) μεβρανών που έχουν μείνει στη σφραγίδα από PDMS όταν αυτή εναποτεθεί σε μια καθαρή γυάλινη επιφάνεια (Boxer, 2000).



Εικόνα 1-7: Μορφώματα υποστηριζόμενων μεμβρανών με στύπωμα και εκτύπωση. a) Η υποστηριζόμενη μεμβράνη αφαιρείται στυπώνοντάς την με PDMS. β) Εκτύπωμα υποστηριζόμενης μεμβράνης για τον σχηματισμό μεμβρανικών μορφωμάτων αυθαιρέτου σχήματος σε καθαρό γυαλί

1.2.3 Μέθοδοι μελέτης λιπιδικής διπλοστοιβάδας.

Όπως έχει αναφερθεί και πρωτύτερα, η ανάληψη φωτολεύκανσης μετά το φθορισμό με τη χρήση μικροσκοπίου φθορισμού είναι ένας τρόπος να για να επιβεβαιώσουμε την ύπαρξη της λιπιδικής διπλοστοιβάδας. Πρόκειται για μια μέθοδο ευρέως χρησιμοποιούμενη και έχει αναφερθεί τόσο στην περίπτωση της πρόσδεσης της νισίνης στη λιπιδική διπλοστοιβάδα (Giffard et al., 1996), όσο και για την ύπαρξη ΥΛΔ. από POPC λιπίδια πάνω σε επιφάνεια από silicate (Melzak et al., 2002)

Η τεχνολογία των βιοαισθητήρων χρησιμοποιείται επίσης για την ανίχνευση της λιπιδικής διπλοστοιβάδας αλλά και για τις περαιτέρω μεταβολές και αντιδράσεις που θα συμβούν σε διάφορα βιομόρια που θα εναποτεθούν πάνω σε αυτήν.

Οπτικοί βιοαισθητήρες έχουν χρησιμοποιηθεί για το σκοπό αυτό, όπως ο Επιφανειακός Συντονισμός Πλάσματος (Surface Plasmon Resonance, SPR). Η τεχνική αυτή έχει χρησιμοποιηθεί κατά τη μελέτη του σχηματισμού λιπιδικών διπλοστοιβάδων από πρωτεωλιποσώματα που περιέχουν διαμεμβρανικές πρωτεΐνες πάνω σε επιφάνεια silica (Graneli et al., 2003). Με το SPR μετρείται η απορρόφηση των μορίων βάσει των μεταβολών του δείκτη διάθλασης. Οι μετρήσεις που προκύπτουν είναι ενδεικτικές της μάζας που προσροφάται σε μια επιφάνεια. Η τεχνική αυτή έχει κάποια σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι κάποιων άλλων για τον χαρακτηρισμό λεπτών στοιβάδων: 1) Ανιχνεύει άμεσα, δηλαδή σε πραγματικό χρόνο μεταβολές στη μάζα που λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια μοριακών αλληλεπιδράσεων, 2) είναι πολύ ευαίσθητη, 3) μπορεί να συνδέσει οπτικές παραμέτρους (π.χ. δείκτη διάθλασης, συντελεστή απόσβεσης) με το πάχος της προσροφώμενης στοιβάδας, 4) η απλότητα και η ταχύτητα με την οποία παίρνουμε τα δεδομένα είναι εξαιρετικά σημαντικά για συστήματα που η ποσότητα και η σταθερότητα του βιολογικού υλικού είναι περιοριστικοί παράγοντες, όπως συμβαίνει συχνά με τη μελέτη των μεμβρανών (Salamon et al., 2000).

Μια άλλη οπτική τεχνική που έχει χρησιμοποιηθεί για τον ίδιο λόγο είναι η Μικροσκοπία Ατομικών Δυνάμεων (Atomic Force Microscopy, AFM) που δίνει μια εικόνα της επιφάνειας και μπορεί να μετρηθεί το πάχος μαλακών στρωμάτων. Με αυτή την τεχνική έχει μελετηθεί ο σχηματισμός υποστηριζόμενης λιπιδικής διπλοστοιβάδας από eggPC (phosphatidyl-choline) λιποσώματα πάνω σε επιφάνεια mica. Με το AFM η λιπιδική διπλοστοιβάδα απεικονίζεται ως δίσκος με σταθερό πάχος (ύψος) 5 nm περίπου, ενώ στην περίπτωση των προσροφημένων στην επιφάνεια λιποσωμάτων το ύψος αυτό διαφέρει. Επίσης, οι ιδιότητες της διπλοστοιβάδας μελετήθηκαν και βρέθηκε πως εξαρτώνται από το μέγεθος των λιποσωμάτων, τη συγκέντρωση των λιπιδίων και την παρουσία ή απουσία Ca²⁺ (Reviakine et al., 2000). Η τοπογραφία της λιπιδικής διπλοστοιβάδας έχει μελετηθεί με AFM όταν η διπλοστοιβάδα έχει προκύψει από σύντηξη μείγματος διαφορετικών λιπιδίων (DPPC, DPPG, DPPE) και του βιοτυνιλιωμένου LC-DPPE με το γλυκολιπιδικό υποδοχέα GM1 πάνω σε επιφάνεια silicon nitride. Στην περίπτωση αυτή η μελέτη έγινε σε συνδυασμό με μετρήσεις κατόπτρου συντονισμού (Resonant Mirror, RM) και έτσι δόθηκαν περισσότερες πληροφορίες για τη δομή και τη δραστικότητα της επιφάνειας του βιοαισθητήρα (Fisher et al., 2000).

Οι ακουστικοί βιοαισθητήρες έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη των λιπιδιακών διπλοστοιβάδων. Σε αυτή την κατηγορία ανήκει ο Μικροζυγός Κρυσταλλικού Χαλαζία (Quartz Crystal Microbalance, QCM). Οι μετρήσεις που προκύπτουν με αυτή την τεχνική στη μεταβολή της συχνότητας και στη μεταβολή της ενέργειας σε συνάρτηση με το χρόνο, δίνουν πληροφορίες για την προσροφώμενη μάζα και τις μηχανικές ιδιότητες της διπλοστοιβάδας που σχηματίζεται αντίστοιχα. Το QCM έχει χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της κινητικής κατά τον σχηματισμό διπλοστοιβάδας από πολύ μικρά λιποσώματα eggPC πάνω σε τρεις διαφορετικές επιφάνειες (silica, οξειδωμένο χρυσό και μια στοιβάδα από methyl terminated alkane thiols) όπου δείχθηκε και η δυνατότητα της τεχνικής αυτής να ξεχωρίσει διαφορετικούς τύπους κινητικής ανάλογα με την επιφάνεια και να προσδιορίσει της ιδιότητες της σχηματιζόμενης μεμβράνης (Keller et al., 1998). Η ίδια τεχνική έχει χρησιμοποιηθεί και για τη μελέτη μεμβρανών που προκύπτουν από λιποσώματα που έχουν ήδη ενσωματωμένες διαμεμβρανικές πρωτεΐνες (Graneli et al., 2003).

Τέλος, οι ακουστικοί βιοαισθητήρες τύπου Love wave (με κυματοδηγό) έχουν χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη υποστηριζόμενης λιπιδικής διπλοστοιβάδας και για την αλληλεπίδρασή τους με διάφορα βιομόρια. Η ακουστική μικροσυσκευή λειτουργεί σε υψηλότερες συχνότητες σε σχέση με το QCM και είναι μεγαλύτερης ευαισθησίας. Με αυτή τη μέθοδο μετρούνται οι ακουστικές παράμετροι (μεταβολή στη φάση και το πλάτος του ακουστικού κύματος, βλέπε Κεφάλαιο 2) στη μεσεπιφάνεια στερεού-υγρού κατά τη διάρκεια μιας βιολογικής αντίδρασης. Λιπιδικές διπλοστοιβάδες από μίγμα POPC λιποσωμάτων με βιοτυνυλιωμένα DPPE λιπίδια έχουν σχηματιστεί στην επιφάνεια της μικροσυσκευής, αφού προηγουμένως έχει επικαλυφθεί με χρυσό. Σε αυτή την επιφάνεια προστέθηκε στρεπταβιδίνη και στη συνέχεια βιοτυνιλιωμένο αντίσωμα goat IgG. Με την επιφάνεια αυτή προκύπτει ένας βιοαισθητήρας που δίνει πληροφορίες τέτοιες ώστε όταν προστεθεί anti-goat IgG, μπορεί να μελετηθεί η κινητική της αντίδρασης που γίνεται (Gizeli et al., 1997). Ο ίδιος αισθητήρας (Love wave) έχει επικαλυφθεί με silicate και έχει σχηματιστεί στην επιφάνειά του διπλοστοιβάδα από POPC λιποσώματα. Η αλληλεπίδρασή της με μία κυτταρολυτική τοξίνη (CytB) που προκαλεί πόρους (τρύπες) στη διπλοστοιβάδα έχει μελετηθεί με τη χρήση του βιοαισθητήρα σε ότι αφορά την εξειδίκευση, την ταχύτητα και την έκταση της αντίδρασης (Melzak et al., 2003).

2 ΑΚΟΥΣΤΙΚΟΙ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ

2.1 Ακουστικοί αισθητήρες

Οι ακουστικοί αισθητήρες αποτελούν μια μεγάλη οικογένεια από μικροσυσκευές (devices) με διάφορες εφαρμογές. Με τους ακουστικούς αισθητήρες τα χαρακτηριστικά που μπορούν να μετρηθούν είναι η προσροφώμενη μάζα στην επιφάνεια του αισθητήρα, οι ελαστικές και οι ιξωδοελαστικές ιδιότητες των λεπτών φιλμ. Μεταβολές στις παραμέτρους αυτές θα επηρεάσουν τα χαρακτηριστικά της διάδοσης του ακουστικού κύματος. Στην απλούστερη περιίπτωση, οι ακουστικές μετρήσεις επιτρέπουν την ανίχνευση της αλληλεπίδρασης μεταξύ βιομορίων, βάσει της μεταβολής της μάζας στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα.

Οι ακουστικοί αισθητήρες μπορεί να χρησιμοποιηθούν σε ακραία περιβάλλοντα όπως υγρό ήλιο, κενό και σε σύνθετες συνθήκες όπως αυτές που επικρατούν στα βιολογικά υλικά. Σήμερα, κάποιοι αισθητήρες είναι διαθέσιμοι εμπορικά ενώ άλλοι παραμένουν ερευνητικά εργαλεία. Σε αυτό το κεφάλαιο θα γίνει λεπτομερής περιγραφή των ακουστικών βιοαισθητήρων τύπου Love wave, μια κατηγορία μικροσυσκευών με οριζόντια ακουστικά κύματα επιφάνειας υψηλής συχνότητας.

Τα ακουστικά κύματα είναι κανονικές ελαστικές παραμορφώσεις που μπορεί να παραχθούν σε στερεά. Μια παραμόρφωση σε ένα στερεό μέσο συμβαίνει όταν οι αποστάσεις μεταξύ των ατόμων όταν είναι σε ηρεμία μεταβάλλονται εξαιτίας κάποιας δύναμης. Αν η δύναμη αυτή παύσει, τότε δυνάμεις επαναφοράς θα επαναφέρουν τα άτομα στην αρχική τους θέση. Αν η εφαρμοζόμενη δύναμη είναι περιοδική τότε παράγεται μια κυματοειδής (oscillatory) παραμόρφωση γνωστή ως ακουστικό κύμα.

Οι ακουστικές μικροσυσκευές μπορούν να κατηγοριοποιηθούν με βάση τον τρόπο διάδοσης του ακουστικού κύματος. Όταν το ακουστικό κύμα είναι περιορισμένο ώστε το πλάτος του να μειώνεται σε λίγα μήκη κύματος στην επιφάνεια της μικροσυσκευής και διαδίδεται στην επιφάνεια του υποστρώματος τότε χαρακτηρίζεται ως επιφανειακό ακουστικό κύμα (Surface Acoustic Wave, SAW). Αισθητήρας SAW είναι η ακουστική μικροσυσκευή Love wave που θα περιγραφεί παρακάτω. Όταν το ακουστικό κύμα διαδίδεται σε όλο τον όγκο του υλικού της μικροσυσκευής τότε πρόκειται για ακουστικό κύμα όγκου (Bulk Acoustic Wave, BAW). Παράδειγμα ενός αισθητήρα BAW, είναι ο μικροζυγός κρυσταλλικού χαλαζία (Quartz Crystal Microbalance, QCM).

2.2 Ακουστικός βιοαισθητήρας βασισμένος σε κύματα Love

Ο όρος βιοαισθητήρας αναφέρεται σε ένα σύστημα που μπορεί να μετρήσει τις φυσικοχημικές μεταβολές που λαμβάνουν χώρα όταν ένα βιολογικό μόριο αντιδρά με ένα άλλο βιολογικό μόριο και με αυτό τον τρόπο ανιχνεύεται η αντίδραση. Αυτό το σύστημα το συνιστούν τρία τμήματα: a) ο μεταγωγέας (transducer) που μετράει τη φυσικοχημική μεταβολή και μπορεί να είναι ακουστικός, οπτικός ή ηλεκτρικός, β) το βιολογικό υλικό που ακινητοποιείται στην επιφάνεια του αισθητήρα και αντιδρά με κάποιο άλλο μόριο που του προστίθεται σε διάλυμα και γ) το ηλεκτρονικό τμήμα που λαμβάνει το σήμα από το μεταγωγέας, το καταγράφει συνεχόμενα και το εκφράζει υπό μορφή μετρήσεων.



Εικόνα 2-1: Κάτοψη ακουστικού βιοαισθητήρα Love wave

Ο ακουστικός βιοαισθητήρας Love wave είναι μια μικροσυσκευή που αποτελείται από πιεζοηλεκτρικό υλικό (π.χ. χαλαζίας) διότι η λειτουργία της βασίζεται στο πιεζοηλεκτρικό φαινόμενο. Το φαινόμενο αυτό αναφέρεται στην εμφάνιση μηχανικής δύναμης όταν εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση σε πιεζοηλεκτρικό υλικό και αντίστροφα. Δηλαδή, η μηχανική δύναμη που ασκείται έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας η οποία συντελεί στην παραγωγή ακουστικού κύματος. Συγκεκριμένα, ο ακουστικός αισθητήρας Love wave είναι ένα πλακίδιο από χαλαζία που φέρει δύο ηλεκτρόδια (Interdigitated Transducers, IDTs), ένα σε κάθε άκρο της ίδιας επιφάνειας του πλακιδίου. Τα ηλεκτρόδια αυτά αποτελούνται από ράβδους χρυσού που είναι ενωμένοι εναλλάξ σε ένα ζεύγος "μαξιλαράκια" χρυσού (pads). Κάθε τέτοιο τμήμα χρυσού είναι συνδεδεμένο ηλεκτρικά με τις ράβδους, αλλά τα τμήματα αυτά δε συνδέονται μεταξύ τους (Εικόνα 2-1). Όταν εφαρμοστεί στο ένα άκρο της συσκευής (στο ένα ζεύγος) εναλλασσόμενη τάση και παραχθεί εναλλασσόμενο ρεύμα στα IDT, τότε εξαιτίας του πιεζοηλεκτρικού φαινομένου θα δημιουργηθεί μια μετατόπιση των σωματιδίων του υλικού στην κατεύθυνση που καθορίζεται από τον πιεζοηλεκτρικό κρύσταλλο και θα παραχθεί ένα επιφανειακό ακουστικό κύμα (SAW). Αυτό διαδίδεται κατά μήκος της μικροσυσκευής και μετρείται στο άλλο άκρο ως ηλεκτρικό σήμα. Η απόσταση που χωρίζει τις ράβδους χρυσού (fingers) του ΙDT μεταξύ τους καθορίζει το μήκος κύματος λ του παραγόμενου ακουστικού κύματος. Η συχνότητα λειτουργίας καθορίζεται τόσο από το μήκος κύματος όσο και από την εγκάρσια ταχύτητα διάδοσης του κύματος.



Εικόνα 2-2: Όψη ενός αισθητήρα Love wave

Στο πιεζοηλεκτρικό υλικό παράγεται μεν οριζόντιο εγκάρσιο ακουστικό κύμα, εντούτοις αυτό δεν είναι απολύτως οριζόντιο αλλά μέρος της ενέργειας χάνεται με τη μορφή BAW στο σώμα του αισθητήρα. Αυτό μπορεί να αποφευχθεί με τη χρήση ενός ακουστικού κυματοδηγού (waveguide). Ο κυματοδηγός χαρακτηρίζεται από χαμηλή ταχύτητα διάδοσης του ακουστικού κύματος (μικρότερη από την ταχύτητα διάδοσης εντός του υποστρώματος-πιεζοηλεκτρικού υλικού) και παγιδεύει την ενέργεια στην επιφάνεια της μικροσυσκευής. Το υλικό αυτό είναι συνήθως κάποιο πολυμερές. Αυτά τα ακουστικά κύματα ονομάζονται Love waves και οι μικροσυσκευές Love wave devices ή waveguide (Εικόνα 2-2). Δηλαδή, η ύπαρξη του κυματοδηγού είναι που διαφοροποιεί τον αισθητήρα τύπου Love wave από κάποιον άλλο αισθητήρα SAW. Το ακουστικό κύμα που παράγεται, είναι ένα εγκάρσιο κύμα το οποίο διαδίδεται στην επιφάνεια της

ΑΚΟΥΣΤΙΚΟΙ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ

συσκευής και κάθετα στη διεύθυνση διάδοσης (Εικόνα 2-3). Έτσι, όταν χρησιμοποιηθεί ως βιοαισθητήρας και εναποτεθεί βιολογικό υλικό στην επιφάνεια, το γεγονός ότι η ακουστική ενέργεια περιορίζεται κοντά στην επιφάνεια που γίνεται η αντίδραση τον καθιστά εξαιρετικά ευαίσθητο.



Εικόνα 2-3: Κάτοψη ενός αισθητήρα Love wave και τρόπος διάδοσης του ακουστικού κύματος

Το κυριότερο πλεονέκτημα της συσκευής αυτού του τύπου είναι ότι η ακουστική ενέργεια περιορίζεται κοντά στην επιφάνεια που γίνεται η αντίδραση και έτσι η ευαισθησία είναι υψηλή

Για μια συγκεκριμένη συχνότητα, η ταχύτητα διάδοσης του ακουστικού κύματος σε κάθε περίπτωση θα είναι μικρότερη από αυτή που χαρακτηρίζει το πιεζοηλεκτρικό υλικό και μεγαλύτερη από αυτή του κυματοδηγού (Gizeli et al., 2003) εξαρτάται όμως και από το πάχος του κυματοδηγού. Το πάχος του κυματοδηγού συμβάλλει στη μετάδοση του κύματος και συνεπώς στην ευαισθησία του βιοαισθητήρα. Συγκεκριμένα, έχει δειχθεί πως αν η ταχύτητα του κυματοδηγού είναι πολύ χαμηλή, (όπως συμβαίνει στην περίπτωση του ΡΜΜΑ), τότε ακόμα και αν το πάχος του είναι πολύ λεπτό, επιτυγχάνεται υψηλή ταχύτητα διάδοσης (που πλησιάζει αυτή του υποστρώματος), η μεταβολή στη συχνότητα είναι πολύ μικρή και η ευαισθησία στην ανίχνευση της προσροφώμενης μάζας υψηλή. Αντίθετα, όσο το πάχος του κυματοδηγού αυξάνεται, τόσο η ταχύτητα διάδοσης του κύματος μειώνεται και μπορεί τελικά να φτάσει την ταχύτητα διάδοσης του κύματος του κυματοδηγού με μεγαλύτερη πτώση στη συχνότητα λειτουργίας. Αν η ακουστική ταχύτητα του υλικού είναι υψηλή (όπως στην περίπτωση του silica), τότε για να επιτευχθεί η ίδια ευαισθησία απαιτείται μεγαλύτερο πάχος κυματοδηγού.

2.3 Χαρακτηριστικά ακουστικού κύματος και ακουστικών μετρήσεων

Όπως αναφέρθηκε και στην παραπάνω ενότητα, όταν εναλλασσόμενο ρεύμα εφαρμοστεί στους διαμεταγωγείς του ενός άκρου της ακουστικής μικροσυσκευής παράγεται ένα οριζόντιο ακουστικό κύμα στην επιφάνεια εξαιτίας του πιεζοηλεκτρικού φαινομένου. Το ακουστικό σήμα "μετακινείται" κατά μήκος της μικροσυσκευής φτάνοντας στο άλλο άκρο, όπου καταγράφεται ως ηλεκτρικό σήμα. Το μήκος κύματος του ακουστικού κύματος ταυτίζεται με την απόσταση που απέχουν οι ράβδοι χρυσού των IDTs. Η συχνότητα λειτουργίας καθορίζεται από το μήκος κύματος και την ταχύτητα με την οποία διαδίδεται το κύμα στο υλικό.

Εφόσον πρόκειται για οριζόντιο ακουστικό κύμα, όταν στην επιφάνεια της μικροσυσκευής προστεθεί υγρό δείγμα, τότε η διάδοση του κύματος δε θα ανακοπεί σημαντικά. Αντίθετα, το υγρό σε επαφή με το πιεζοηλεκτρικό υπόστρωμα θα ταλαντωθούν (oscillation), δημιουργώντας έτσι ένα αποσβένον πεδίο (evanescent acoustic field) στη μεσεπιφάνεια του στερεού υποστρώματος με το υγρό δείγμα. Η ταλάντωση πραγματοποιείται στο σώμα του υγρού σε μία απόσταση δ που καθορίζεται από τη συχνότητα (f) του κύματος, και από το ιξώδες (η) και την πυκνότητα (ρ) του διαλύματος σύμφωνα με την παρακάτω εξίσωση:

$\delta = (2\eta/\rho\omega)^{1/2}$,

όπου ω είναι η γωνιακή ταχύτητα που είναι ίση με 2πf. Οποιεσδήποτε μεταβολές του υγρού που μπορεί να επηρεάσουν τη μάζα και το ιξώδες στη μεσεπιφάνεια σε αυτή την απόσταση δ, θα αλλάξουν τα χαρακτηριστικά διάδοσης του κύματος. Επιπλέον, εξαιτίας του πιεζοηλεκτρικού υποστρώματος της μικροσυσκευής, υπάρχει ένα λεπτό ηλεκτρικό πεδίο στη μεσεπιφάνεια που επηρεάζεται από τα ιόντα και δίπολα του υγρού δείγματος.

Στην πράξη, οι αλλαγές στις ιδιότητες της μεσεπιφάνειας ανιχνεύονται μετρώντας το πλάτος (amplitude) και τη φάση (phase) του ακουστικού κύματος. Με τον όρο πλάτος αναφερόμαστε στην "απόδοση" (efficiency) κατά τη διάδοση του ακουστικού κύματος στην επιφάνεια της μικροσυσκευής. Το πλάτος μετράται σε dB και οι μεταβολές του είναι ενδεικτικές των ιξωδοελαστικών μεταβολών στη μεσεπιφάνεια στερεού-υγρού. Η φάση αναφέρεται στην ταχύτητα διάδοσης του κύματος, ουσιαστικά πρόκειται δηλαδή για την ταχύτητα με την οποία ένα σταθερό σημείο της φάσης του κύματος μεταφέρεται κατά μήκος της διεύθυνσης

διάδοσης. Η φάση μετρείται σε deg και οι μεταβολές που παρατηρούνται σε αυτήν έχουν να κάνουν κυρίως με μεταβολές της μάζας στη μεσεπιφάνεια (Gizeli, 2002).



Εικόνα 2-4: Ο τρόπος που παρακολουθούνται οι μετρήσεις μέσω των στοιχείων σε ένα ακουστικό πείραμα. Τα χαρακτηριστικά του ακουστικού κύματος που παράγεται στη μικροσυσκευή φαίνονται στον αναλυτή δικτύου με τον οποίο συνδέεται η μικροσυσκευή και από εκεί γίνεται επεξεργασία των δεδομένων με ηλεκτρονικό υπολογιστή.

Η παρακολούθηση των χαρακτηριστικών του ακουστικού κύματος γίνεται με τον αναλυτή δικτύου (network analyzer). Πρόκειται για ένα όργανο το οποίο υπολογίζει τα χαρακτηριστικά (πλάτος της ακουστικής μικροσυσκευής και φάση του κύματος σε συνάρτηση ενός εύρους συχνοτήτων του εφαρμοζόμενου εναλλασσόμενου ρεύματος. Ο network analyzer είναι συνδεδεμένος με έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή όπου κατά τη διάρκεια των πειραμάτων μπορούμε να καταγράφουμε τα χαρακτηριστικά του ακουστικού σήματος για μια ορισμένη συχνότητα σε συνάρτηση με το χρόνο (Εικόνα 2-4). Στα διαγράμματα 2-1 και 2-2 φαίνονται τα χαρακτηριστικά του ακουστικού σήματος (πλάτος και φάση) όπως απεικονίζονται στο network analyzer .



Διάγραμμα 2-1:Απόκριση του πλάτους του ακουστικού κύματος για ένα ευρύ φάσμα συχνοτήτων όπως φαίνεται στο network analyzer



Διάγραμμα 2-2: Η φάση (φούξια χρώμα) και το πλάτος όπως φαίνονται στο network analyser για ένα μικρό φάσμα συχνοτήτων (3 MHz)

2.4 Παρασκευή ακουστικών μικροσυσκευών

Το πιεζοηλεκτρικό υλικό που χρησιμοποιείται για την κατασκευή του device είναι συνήθως ο χαλαζίας (quartz). Παρουσιάζει μεγάλη χημική σταθερότητα όταν είναι σε υδατικό διάλυμα και αντοχή σε υψηλές θερμοκρασίες χωρίς να χάνει την πιεζοηλεκτρική του ιδιότητα. Επίσης, η γωνία κοπής του κρυστάλλου του χαλαζία καθορίζει τη διεύθυνση διάδοσης του κύματος. Άλλο υλικό που χρησιμοποιείται για αυτές τις συσκευές είναι το lithium tantalate, υλικό υψηλής ποιότητας και αντοχής. Οι συσκευές αυτές κατασκευάζονται με τεχνικές όπως η φωτολιθογραφία.

Τα IDTs (Interdigitated Transducers) στα οποία παράγεται το εναλλασσόμενο ηλεκτρικό πεδίο είναι φτιαγμένα από χρώμιο και χρυσό και οι ράβδοι που τα αποτελούν τοποθετούνται σε ίσες αποστάσεις μεταξύ τους που είναι της τάξης των μm.

Όπως αναφέρθηκε και στο προηγούμενο κεφάλαιο, η προσθήκη του κυματοδηγού είναι αυτή που ουσιαστικά χαρακτηρίζει τη μικροσυσκευή τύπου Love wave. Η προσθήκη αυτού του στρώματος όχι μόνο βελτιώνει τη μετάδοση του σήματος και την ευαισθησία του βιοαισθητήρα αλλά μειώνει τις αντανακλάσεις, λειτουργεί μονωτικά αφού προστατεύει τους μεταγωγείς και τέλος παρεμποδίζει τις απώλειες ενέργειας από το ένα άκρο ως το άλλο της συσκευής από το υγρό δείγμα. Υλικά που έχουν χρησιμοποιηθεί ως κυματοδηγοί είναι το silica, το PMMA (πολυμερές) και κάποιο φωτοσταθερό υλικό όπως είναι το Novolac με μεγάλη χημική σταθερότητα. Ο κυματοδηγός προστίθεται πάνω στη συσκευή με επικάλυψη με φυγοκέντρηση (spin coating) διαλύματος γνωστής συγκέντρωσης (π.χ.ΡΜΜΑ). Η συγκέντρωση του διαλύματος και η ταχύτητα που γίνεται το spin coating καθορίζουν και το πάχος του στρώματος του κυματοδηγού που θα στρωθεί πάνω στη συσκευή. Το στρώμα αυτό μπορεί να απομακρυνθεί με καθαρισμό (cleaning off) με ακετόνη και να ξαναγίνει επίστρωση.

Πάνω στον κυματοδηγό μπορεί να τοποθετηθεί ένα λεπτό στρώμα άλλου πολυμερούς όπως το Poly-dimethyl siloxane (PDMS), χωρίς να επηρεάσει τη διάδοση του κύματος. Στην κορυφή, τοποθετείται το βιολογικό υλικό (π.χ. λιπιδική διπλοστοιβάδα). Όπως θα φανεί και στα παρακάτω κεφάλαια, για τη διεξαγωγή πειραμάτων με ακουστικό βιοαισθητήρα Love wave πάνω από τον κυματοδηγό τοποθετήθηκε ένα λεπτό στρώμα από PDMS.

2.4.1 <u>Love wave device ως βιοαισθητήρας: Πλεονεκτήματα και</u> μειονεκτήματα

Συμπερασματικά θα μπορούσαμε να πούμε τα παρακάτω για τη χρήση των ακουστικών μικροσυσκευών Love wave για τη χρήση των ακουστικών μικροσυσκευών Love ως βιοαισθητήρες:

- Επειδή η ακουστική ενέργεια παγιδεύεται κοντά στην επιφάνεια της μικροσυσκευής και δε διαχέεται στο υπόλοιπο σώμα της μικροσυσκευής είναι πολύ πιο ευαίσθητοι αισθητήρες σε σχέση με μικροσυσκευές bulk wave (π.χ. QCM)
- Οι μικροσυσκευές SAW λειτουργούν σε υψηλές συχνότητες και γι αυτό είναι περισσότερο ευαίσθητες στις αντιδράσεις που συμβαίνουν στην επιφάνεια. Όταν το υλικό κατασκευής είναι το lithium tantalate ή το lithium niobate η ευαισθησία αυτή αυξάνεται ακόμα περισσότερο.
- Δεδομένου ότι η ανίχνευση (sensing) συμβαίνει μόνο στην επιφάνεια της μικροσυσκευής (δηλαδή στη μία πλευρά της), αυτό σημαίνει ότι το πίσω μέρός της μπορεί να συνδεθεί ή να τοποθετηθεί σε κάτι άλλο χωρίς προβλήματα παρεμβολών στο σήμα. Αυτό δε συμβαίνει με μικροσυσκευές bulk wave (π.χ. QCM) αφού τα κύματα αλληλεπιδρούν και με τις δύο επιφάνειες.
- Μειονέκτημα σε αυτήν την κατηγορία ακουστικών μικροσυσκευών, είναι ότι η έρευνα σχετικά με αυτές διεξάγεται τα τελευταία μόνο χρόνια και έτσι θα χρειαστεί αρκετός χρόνος μέχρι αυτές να χρησιμοποιηθούν σε ευρεία και ενδεχομένως εμπορική κλίμακα (Tullier M., 2004)

2.5 Απόκριση ακουστικού σήματος κατά τη δημιουργία λιπιδιακής διπλοστοιβάδας.

Όπως αναφέρθηκε και στα πλαίσια της ενότητας 1.1.3 ο ακουστικός βιοαισθητήρας Love wave έχει χρησιμοποιηθεί για τη δημιουργία υποστηριζόμενης λιπιδικής διπλοστοιβάδας στην επιφάνειά του ως μεμβρανικό μοντέλο. Η ακουστική ανίχνευση του σχηματισμού της λιπιδικής διπλοστοιβάδας γίνεται παρατηρώντας κυρίως τη μεταβολή στη φάση του ακουστικού κύματος. Συγκεκριμένα, όταν εναποτίθεται εναιώρημα λιποσωμάτων στην επιφάνεια της ακουστικής μικροσυσκευής, εξαιτίας της μεταβολής της μάζας στην επιφάνεια, παρατηρείται μια απότομη πτώση στη φάση του ακουστικού κύματος, η οποία λαμβάνει χώρα για όσο χρονικό διάστημα γίνεται η συσσώρευση λιποσωμάτων στην επιφάνεια. Στη συνέχεια, όταν τα λιποσώματα συντήκονται και σχηματίζεται η λιπιδική διπλοστοιβάδα, τότε η φάση του ακουστικού σήματος παρουσιάζει μια ανάκαμψη και στη συνέχεια όταν ο σχηματισμός έχει ολοκληρωθεί, η φάση σταματά να μεταβάλλεται και το σύστημα ισορροπεί. Στο διάγραμμα 2-3 φαίνεται μια χαρακτηριστική μεταβολή της φάσης κατά το σχηματισμό λιπιδικής διπλοστοιβάδας.

Στην περίπτωση που δεν πραγματοποιηθεί σχηματισμός διπλοστοιβάδας, η φάση μειώνεται συνεχώς χωρίς να παρατηρηθεί καθόλου η ανάκαμψη που φαίνεται στο διάγραμμα 2-3, κάτι που είναι χαρακτηριστικό του σχηματισμού στοιβάδας λιποσωμάτων. Έτσι, οι λαμβανόμενες ακουστικές μετρήσεις και το πρότυπο που δίνει σε συνάρτηση με το χρόνο μας βοηθούν να γνωρίζουμε πότε έχουμε σχηματισμό λιπιδικής διπλοστοιβάδας και πότε όχι.



Διάγραμμα 2-3: Απόκριση του ακουστικού σήματος κατά το σχηματισμό λιπιδικής διπλοστοιβάδας από λιποσώματα 0,5 mg/ml POPC. Το βέλος δείχνει την προσθήκη των λιποσωμάτων (Gizeli et al., 1997)

2.6 Το PDMS στην επιφάνεια του ακουστικού βιοαισθητήρα για τη δημιουργία υποστηριζόμενης λιπιδικής διπλοστοιβάδας

To PDMS (Poly-dimethyl siloxane) είναι ένα ελαστομερές το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί πάνω από τον κυματοδηγό της ακουστικής μικροσυσκευής για πειράματα σχηματισμού λιπιδικής διπλοστοιβάδας (Τ. Shahal, Ε. Gizeli, unpublished data). Το PDMS χαρακτηρίζεται από χαμηλή ταχύτητα διάδοσης του ακουστικού κύματος. Μια ευρεία εφαρμογή του PDMS είναι η δημιουργία σφραγίδας από αυτό το υλικό που θα χρησιμοποιηθεί για δημιουργία κάποιων στρωμάτων για την προστασία περιοχών κατά τη λιθογραφία ή μπορεί να χρησιμεύσουν ως μήτρες για κυτταρική προσκόλληση. Το PDMS είναι υλικό που είναι βιοσυμβατό και επομένως μπορεί να χρησιμοποιηθεί με βιολογικά υλικά όπως κύτταρα και πρωτεΐνες (Kane et al., 1999). Επιπλέον, είναι διαπερατό στα αέρια, οπτικά διαφανές και εξαιτίας του ότι είναι ελαστομερές μπορεί να εφαρμοστεί εύκολα ακόμα και σε επιφάνειες που δεν είναι εντελώς επίπεδες. Κάτι που το κάνει επίσης δημοφιλές υλικό είναι ότι μπορεί να φτιαχτεί εύκολα και έχει αρκετά χαμηλό κόστος. Το μεγαλύτερο μειονέκτημα που παρουσιάζει είναι ότι είναι εξαιρετικά υδρόφοβο και αυτό δυσχεραίνει τις εφαρμογές του στη Βιολογία. Ο συντακτικός τύπος του PDMS φαίνεται παρακάτω.



Το πρόβλημα αυτό (του υδρόφοβου χαρακτήρα του PDMS) μπορεί να ξεπεραστεί με χημική τροποποίηση της επιφάνειας του PDMS. Η έκθεση της επιφάνειας σε πλάσμα, οξειδώνει την επιφάνεια και την καθιστά υδρόφιλη αφού από τη δομή που φαίνεται παραπάνω μετατρέπεται σε SiO_x. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με χάραξη με χημεία πλάσματος (plasma etching). Βέβαια, αξίζει να σημειωθεί πως ο υδρόφοβος χαρακτήρας του PDMS μπορεί να επανέλθει εφόσον αυτό εκτεθεί στον αέρα για αρκετή ώρα.

2.6.1 Χάραξη με χημεία πλάσματος

Η χάραξη που επιτυγχάνεται είναι αποτέλεσμα ως επί το πλείστον χημικής κατεργασίας και λιγότερο μηχανικής φθοράς. Για τη χάραξη με χημεία πλάσματος, η διεργασία που συμβαίνει είναι η εξής: Το αέριο που τροφοδοτείται (π.χ. O₂ ή Ar) διασπάται ως πλάσμα σε χημικά ενεργές ρίζες, οι οποίες οδηγούνται στην επιφάνεια (π.χ. PDMS), απορροφώνται και αντιδρούν με αυτήν.

Τα προϊόντα της αντίδρασης διαχέονται πάνω από την επιφάνεια και μέσω του ρεύματος αερίου μεταφέρονται εκτός του θαλάμου χάραξης.

Πλεονεκτήματα αυτής της τεχνικής είναι ότι είναι μια διαδικασία που ξεκινά και σταματά εύκολα. Είναι πολύ λίγο ευαίσθητη στις μεταβολές της θερμοκρασίες και παράγει λιγότερα χημικά απόβλητα σε σχέση με άλλες μεθόδους. Το πλάσμα χρησιμοποιείται για να δημιουργήσει και να επιταχύνει ιόντα τα οποία θα προκαλέσουν το σπάσιμο κάποιων μορίων και θα οδηγήσουν σε μια χημική αντίδραση. Μειονεκτήματα της διεργασίας αυτής μπορεί να είναι ότι η επιφάνεια υφίσταται σταδιακά κάποια υποβάθμιση εξαιτίας της φυσικής καταπόνησης και ότι συμβάλλει στην περιβαλλοντική μόλυνση.

Έχει βρεθεί πως όταν το PDMS εκτεθεί σε πλάσμα O_2 τότε η επιφάνεια τροποποιείται χημικά (chemical etching) και οξειδώνεται. Το πάχος του οξειδωμένου στρώματος του PDMS αυξάνεται όσο περισσότερο χρόνο το υλικό μείνει εκτεθειμένο στο πλάσμα. Συγκεκριμένα, 5 δευτερόλεπτα έκθεσης σε πλάσμα O_2 είναι αρκετά για την οξείδωση στρώματος PDMS πάχους 40 Å. Η χάραξη με χημεία πλάσματος μπορεί να επιτευχθεί όχι μόνο με πλάσμα O_2 αλλά και με διαφορετική σύνθεση αερίου. Για τη μελέτη της συμπεριφοράς του PDMS σε αυτή την περίπτωση έχουν χρησιμοποιηθεί μίγματα σε O_2/SF_6 , Ar/SF₆ και He/SF₆ σε αναλογία 92/8. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως για τα πρώτα 5 δευτερόλεπτα το PDMS απομακρύνεται γρήγορα με ένα ρυθμό της τάξης των 50 nm/min ανεξαρτήτως του μίγματος αερίου, ενώ για μεγαλύτερους χρόνους etching ο ρυθμός μεταβάλλεται ανάλογα με τη σύσταση του μίγματος (Tserepi et al., 2003).

2.7 Σκοπός της μελέτης

Η παρούσα μελέτη έχει ως σκοπό τη χρησιμοποίηση ακουστικού βιοαισθητήρα Love wave προκειμένου να εναποτεθεί στην επιφάνειά του υποστηριζόμενη λιπιδική διπλοστοιβάδα από λιπίδια που προέρχονται από E. coli. Η μελέτη της απόκρισης του ακουστικού σήματος μπορεί να μας δώσει πληροφορίες για την αντίδραση που συμβαίνει στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα και για το αν είναι επιτυχής ή όχι η απόπειρα σχηματισμού ΥΛΔ. Η σχηματιζόμενη διπλοστοιβάδα αποτελεί μεμβράνη-μοντέλο πάνω στην οποία μπορεί να προσδεθεί η μεμβρανική βακτηριακή πρωτεΐνη SecA. Από τη μελέτη κυρίως της φάσης του ακουστικού σήματος, μπορεί να γίνει αντιληπτό αν πρόσδεση η

πραγματοποιήθηκε καθώς επίσης και να προσδιοριστεί η απαιτούμενη συγκέντρωση πρωτεΐνης για το σκοπό αυτό.

2.7.1 <u>Η πρωτεΐνη SecA</u>

Η έκκριση βακτηριακών πρωτεϊνών είναι μία πολύπλοκη αντίδραση με πολλά στάδια που είναι όμως πολύ σημαντική για τη βιοσύνθεση της μεμβράνης και των κυτταρικών τοιχωμάτων. Η διαμεμβρανική μεταφορά καταλύεται από το πρωτεϊνικό σύμπλοκο translocase. Μελετώντας το σύστημα του Escherichia coli, διαπιστώνεται ότι υπάρχουν τουλάχιστον έξι μονοπάτια για την εξαγωγή πρωτεϊνών από το κύτταρο. Μεταξύ αυτών είναι και το μονοπάτι Sec (secretory). Η πρωτεΐνη SecA αποτελεί μία υπομονάδα του συμπλόκου translocase και έχει ορισμένα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά. Συγκεκριμένα, αποτελεί πολύ σημαντικό στοιχείο που συμμετέχει στην αντίδραση και βρίσκεται σε όλα τα βακτήρια. Είναι φυσικά συνδεδεμένη με τη μεμβράνη αλλά και με τα άλλα υδοτοδιαλυτά στοιχεία που συμμετέχουν στο μονοπάτι Sec. Η πρωτεΐνη αυτή επίσης ευθύνεται για τη μετατροπή της χημικής ενέργειας υπό τη μορφή ΑΤΡ σε μηχανικό έργο. Επιπλέον, μετακινείται μεταξύ μιας περιφερειακής μεμβράνη και του κυτταροπλάσματος, ενώ υφίσταται χωροδιατακτικές (conformational) μεταβολές. Η SecA απαντά ως διμερές και έχει βάρος 102 kDa. Το αμινο-τελικό της άκρο είναι μια περιοχή βάρους 68 kDa με δράση ATPase, ενώ το καρβοξυ-τελικό της άκρο είναι βάρους 34 kDa. Ο διμερισμός που εμφανίζει οφείλεται στο καρβοξυτελικό της άκρο, διότι αυτή η περιοχή σχηματίζει εύκολα διμερή σε διάλυμα (Economou, 2002).

Κάποιες μελέτες έχουν δείξει πως η αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης αυτής με την εσωτερική μεμβράνη απαιτεί την παρουσία ανιονικών φωσφολιπιδίων. Έχει εξεταστεί επίσης ο βαθμός αλληλεπίδρασης της SecA με μεμβρανικά μοντέλα σημαίνοντάς την με υδρόφοβο αντιδραστήριο και έχει προσδιοριστεί το βάθος εισχώρησης στη διπλοστοιβάδα. Αυτή η μελέτη έδειξε πως η SecA διαπερνά τη διπλοστοιβάδα μέχρι την περιοχή των ακυλικών αλυσίδων. Βρέθηκε επίσης πως η είσοδος της SecA σε λιποσώματα συνοδεύεται από μια σημαντική χωροδιατακτική μεταβολή στην πρωτεΐνη. Η μεταβολή αυτή επάγεται ευκολότερα με υψηλότερες θερμοκρασίες και συμπεριλαμβάνει το μερικό ξεδίπλωμά της και την αυξημένη ευαισθησία της στην πρωτεόλυση. Η ίδια μεταβολή παρατηρήθηκε σε χαμηλότερες θερμοκρασίες όταν οι μεμβράνες περιείχαν ένα ποσοστό του ανιονικού φωσφολιπιδίου phosphatidylglycerol. Το μερικό ξεδίπλωμα και η επακόλουθη εισχώρηση της SecA στις μεμβράνες μάλλον βοηθά και την εισχώρηση ἀλλων πρωτεΐνών που μεταφέρουν πεπτίδια-σινιἀλα (precursor proteins) ώστε να επηρεἀσσουν ενδεχόμενες αλληλελπιδρἀσεις μεταξύ της SecA και των ἀλλων στοιχείων που συμμετέχουν στο μονοπἀτι της ἐκκρισης.(Ulbrandt N. et al., 1992)

3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Ακουστική μικροσυσκευή

Τα ακουστικά πλακίδια Love wave με τα οποία δούλεψα είναι συχνότητας 108 MHz φτιαγμένα από κρυστάλλους πιεζοηλεκτρικού χαλαζία. Η μικροσυσκευή αποτελείται από σετ ηλεκτροδίων που έχουν εναποτεθεί στην ίδια επιφάνεια χαλαζία πάχους 0,5 mm (Y cut: γωνία 42,5°). Η διάδοση του κύματος γίνεται κάθετα (90°) ως προς τον άξονα των χ. Τα ηλεκτρόδια (IDTs) αποτελούνται από 80 ζεύγη ξεχωριστούς ράβδους χρυσού που απέχουν μεταξύ τους 45 μm και είναι εναλλάξ συνδεδεμένα με διαφορετικό μέρος του ηλεκτροδίου (Εικόνα 3-1). Το καθένα έχει πάχος 210 nm και αποτελείται από Cr/Au (10/200 nm). Σε όλα τα πειράματα η επιφάνεια των μικροσυσκευών επικαλύφθηκε αρχικά από το πολυμερές PMMA 17% και στη συνέχεια από PDMS 1%.



Εικόνα 3-1: Ακουστική μικροσυσκευή Love wave

3.2 Σύστημα ακουστικών μετρήσεων

Το ακουστικό πλακίδιο τοποθετείται σε μια κατασκευή (device holder) που από τη μια το κρατάει σε σταθερή θέση, από την άλλη συνδέεται με έναν αναλυτή που μετρά τη φάση και το πλάτος του εξερχόμενου ακουστικού σήματος (Hewlett Packard 4195A network analyzer). Όταν διεξάγεται ένα πείραμα τα δεδομένα συλλέγονται σε τακτό και καθορισμένο χρονικό διάστημα (π.χ. κάθε 43 s), αφού σαρώνεται μια περιοχή από το φάσμα συχνοτήτων, π.χ. 3 MHz. (Εικόνα 2-4 και διάγραμμα 2-2, σελ.21). Τα δεδομένα που λαμβάνοναι και απεικονίζονται στο network analyzer, αποθηκεύονται ταυτόχρονα σε έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή που είναι συνδεδεμένος με το network analyzer. Μέσω του ηλεκτρονικού υπολογιστή και ειδικού προγράμματος που έχει σχεδιαστεί για το σκοπό αυτό, υπάρχει η δυνατότητα για την εν συνεχεία επεξεργασία των δεδομένων και τη μελέτη των μεταβολών των χαρακτηριστικών του ακουστικού κύματος σε σχέση με το χρόνο. Έτσι, σε κάθε περίπτωση μπορεί να μελετηθεί η απόκριση του βιοαισθητήρα στην προσθήκη βιολογικού υλικού. Το δείγμα που περνά από την επιφάνεια της ακουστικής μικροσυσκευής μεταφέρεται μέσω ενός συστήματος συνεχούς ροής (flow cell) με τη βοήθεια μιας περισταλτικής αντλίας (Εικόνα 3-2).



Εικόνα 3-2: Σχηματική παράσταση του συστήματος συνεχόμενης ροής (flow cell) και της κίνησης του δείγματος πάνω στην ακουστική μικροσυσκευή

Εξαιτίας του ότι τα πειράματα με το παραπάνω σύστημα ακουστικών μετρήσεων, ήταν τα πρώτα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Τεχνολογίας Βιοαισθητήρων του Πανεπιστημίου Κρήτης, δοκιμάστηκαν διαφορετικές συνθήκες. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν 3 διαφορετικά device holders καθώς επίσης και διαφορετικά συστήματα συνεχούς ροής (flow cell). Τα συστήματα συνεχούς ροής (A και B) διέφεραν ως προς τη διάμετρο του σωλήνα που σωλήνα που εφάρμοζε πάνω τους. Το σύστημα A έφερε σωλήνα διαμέτρου 0,25 mm ενώ το B είχε σωλήνα διαμέτρου 1 mm. Κάτι τέτοιο είχε ως συνέπεια τη διαφορετική ταχύτητα ροής του δείγματος ανάλογα με το σύστημα ροής που χρησιμοποιήθηκε. Σε όλα τα πειράματα που έγιναν με το σύστημα ροής A η ταχύτητα ροής ήταν 0,054 ml/min (ένδειξη περισταλτικής αντλίας: 350), ενώ με το σύστημα ροής B η ταχύτητα ροής ήταν 0,085 ml/min (ένδειξη περισταλτικής αντλίας: 020)

3.3 Δημιουργία ακουστικού κυματοδηγού

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων εναπόθεσης λιποσωμάτων για το σχηματισμό ΥΛΔ με την ακουστική μικροσυσκευή Love wave, έγινε τροποποίηση της

επιφάνειας. Συγκεκριμένα, πάνω στη μικροσυσκευή αυτή τοποθετήθηκε στρώμα του πολυμερούς PMMA 17 % (poly (methyl methacrylate)) που αποτελεί τον κυματοδηγό με υδρόφιλη επιφάνεια PDMS 1% (poly(dimethylsiloxane)).

Για την προετοιμασία του πολυμερούς PMMA, συγκέντρωσης 17 % (βάρος πολυμερούς/βάρος διαλύτη) απαιτούνται:

- PMMA medium molecular weight σε σκόνη, Aldrich
- 2-ethoxyethyl acetate (2-EEA) ως οργανικός διαλύτης, Sigma
- Φίλτρα με πόρους διαμέτρου 0,2 μm από PTFE μεμβράνη,
 ανθεκτικά σε οργανικούς διαλύτες Acrodisc PALL

Σε μικρό γυάλινο μπουκαλάκι έγινε ανάμιξη του οργανικού διαλύτη με το πολυμερές με χρήση μαγνητικού αναδευτήρα για περισσότερες από 24 ώρες (2 έως 4 ημέρες συνήθως). Έπειτα με μια γυάλινη σύριγγα και χρησιμοποιώντας τα παραπάνω φίλτρα, το διάλυμα φιλτράρεται. Το ΡΜΜΑ φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου για τέσσερις μήνες περίπου.

Το PDMS διατίθεται ως kit Sylgard 182, Dow Corning, το οποίο περιέχει το ελαστομερές και το curing agent. Για την παρασκευή του χρησιμοποιήθηκε ως οργανικός διαλύτης το n-octane 99 %, Sigma και η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής: Σε μικρή κωνική φιάλη βάζουμε 1 ml από το PDMS και 0,1 ml από το curing agent. Προσθέτουμε 9 ml n-octane και με τη χρήση μαγνητικού αναδευτήρα αφήνουμε να γίνει καλή ανάμιξη για πέντε λεπτά περίπου. Στη συνέχεια, από το διάλυμα που έχει προκύψει μεταφέρουμε 0,5 ml σε μικρό γυάλινο ποτηράκι όπου προσθέτουμε 4,5 ml n-octane επιπλέον. Το μίγμα αναδεύεται καλά με μαγνητικό αναδευτήρα και τέλος φιλτράρεται όπως έγινε και με το PMMA.

Για την κάλυψη των επιφανειών με τα πολυμερή χρησιμοποιείται μια συσκευή που κάνει επικάλυψη με φυγοκέντρηση (spincoating). Στο εργαστήριο χρησιμοποιήθηκε ο Spincoater Model P6700 Series, Specialty Coating Systems Inc.

Αρχικά, τοποθετείται το device στην ειδική θέση της συσκευής. Με μια Pasteur πιπέτα εναποθέτουμε 3-5 περίπου σταγόνες PMMA προσεκτικά, ώστε να καλυφθεί όλη η επιφάνεια του πλακιδίου χωρίς όμως να δημιουργηθούν φυσαλίδες. Στη συνέχεια γίνεται η φυγοκέντρηση για 40 δευτερόλεπτα στις 4000 rpm. Έπειτα, τα ακουστικά πλακίδια τοποθετούνται στο φούρνο στους 190°C για 2 ώρες. Κατά τον ίδιο ακριβώς τρόπο γίνεται και η επικάλυψη της επιφάνειας με το PDMS αλλά η επιφάνεια πρέπει να θερμανθεί στους 170°C για 1 ώρα.

Επειδή κατά την προσπάθεια δημιουργίας ΥΛΔ με λιπίδια από Escherichia coli η παραπάνω επιφάνεια δεν ήταν ευνοϊκή (βλ. ενότητα 4.2), στην παραπάνω επιφάνεια προστέθηκε πολυλυσίνη. Η πολυλυσίνη ήταν περιεκτικότητας 0,1 % w/v ως υδατικό διάλυμα, Sigma, μοριακού βάρους 150000-300000. Η πολυλυσίνη προστέθηκε αμέσως μετά η επιφάνεια του PDMS γίνει υδρόφιλη (με χάραξη με χημεία πλάσματος) Για να καλυφθεί η επιφάνεια, 50 μl πολυλυσίνης ήταν αρκετά και παρέμειναν στην επιφάνεια για 3 λεπτά περίπου. Ακολούθησε ξέπλυμα με buffer και διεξαγωγή του πειράματος ακριβώς όπως και στην περίπτωση με τα egg PC λιπίδια.



3.4 Χάραξη με χημεία πλάσματος (plasma etching)

Το PDMS ως πολυμερές είναι εξαιρετικά υδρόφοβο, όμως για το είδος των πειραμάτων που κάνουμε είναι επιθυμητή η υδρόφιλη επιφάνεια. Η χάραξη με χημεία πλάσματος είναι μια τεχνική που κάνει την επιφάνεια υδρόφιλη (βλ. ενότητα 2.6.1). Η διεργασία αυτή γίνεται με το Sputter Coater BAL-TEC SCD 050 με πλάσμα αργού, για 180 s υπό πίεση 0,15 mbar. Αμέσως μετά το τέλος της διεργασίας αυτής, η μικροσυσκευή τοποθετούνταν σε καθαρό νερό, προκειμένου να μη χάσει τον υδρόφιλο χαρακτήρά της.

3.5 Εναιώρημα λιποσωμάτων egg PC και E. coli

Τα λιποσώματα egg PC φτιάχνονται από egg PC λιπίδια, Sigma. Τα egg PC λιπίδια διαλύθηκαν σε χλωροφόρμιο μέχρι τελικής συγκέντρωσης 20 mg/ml και μοιράστηκαν σε γυάλινες μικρές φιάλες. Για κάθε πείραμα που διεξάγεται η τελική συγκέντρωση λιπιδίων που χρησιμοποιείται είναι 0,25 mg/ml. Έτσι, σε 100 μl από το αρχικό διάλυμα των λιπιδίων προστίθεται 1% φθοριζόντων λιπιδίων. Το μίγμα αυτό τοποθετείται σε μικρή γυάλινη φιάλη με στρογγυλό πυθμένα και αφήνεται να ξηρανθεί υπό ρεύμα αερίου αζώτου για μία τουλάχιστον ώρα. Στη συνέχεια προστίθεται 0,8 ml καθαρού νερού, όπου με την

ενυδάτωση των λιπιδίων σχηματίζονται τα λιποσώματα τα οποία στη συνέχεια θα οδηγηθούν στον εξωθητή.

Τα λιποσώματα από το *E.coli* προήλθαν από λιπίδια και συγκεκριμένα από *Escherichia coli* Total Lipid Extract από την Avanti Polar Lipids από το Εργαστήριου του Καθηγητή Οικονόμου, ΙΤΕ. Υδατικό διάλυμα των λιποσωμάτων συγκέντρωσης 20 mg/ml ξηραίνεται υπό ρεύμα αερίου αζώτου τουλάχιστον για 4 ώρες. Στη συνέχεια με εκχύλιση με χλωροφόρμιο λαμβάνονται τα διαλυμένα λιπίδια και αφού προστεθεί 1 % φθοριζόντων λιπιδίων, το μίγμα αυτό τοποθετείται σε μικρή γυάλινη φιάλη με στρογγυλό πυθμένα και αφήνεται να ξηρανθεί υπό ρεύμα αερίου αζώτου για μία τουλάχιστον ώρα. Στη συνέχεια τα διαλυμε την ενυδάτωση των λιπιδίων σχηματίζονται τα λιποσώματα τα οποία στη συνέχεια θα οδηγηθούν στον εξωθητή.

Για τη διαπίστωση επιτυχίας ή αποτυχίας σχηματισμού λιπιδικής διπλοστοιβάδας θα χρησιμοποιηθεί το μικροσκόπιο φθορισμού. Για να είναι εφικτή η παρατήρηση στο μικροσκόπιο φθορισμού, προστέθηκε στο διάλυμα των λιποσωμάτων μικρή ποσότητα φθοριζόντων λιπιδίων. Τα λιπίδια αυτά ήταν phosphocholine συνδεδεμένα με τη φθορίζουσα ομάδα NBD. Συγκεκριμένα ήταν τα 2-(12-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)dodecanoyl-1-hexadecanoylsn-glycero-3-phosphocholine (NBD C₁₂-HPC), Molecular Probes. Τα φθορίζοντα λιπιδια χρησιμοποιήθηκαν στο τελικό μίγμα λιπιδίων σε ποσοστό 1%.

3.5.1 <u>Εξώθηση</u>

Το διάλυμα των λιποσωμάτων που προκύπτει με την διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω είναι αρκετά ανομοιογενές ως προς το μέγεθος των λιποσωμάτων και δεν είναι unilamellar¹. Επειδή είναι επιθυμητό τα λιποσώματα να είναι unilamellar και ομοιόμορφα ως προς το μέγεθος, αυτά υφίστανται εξώθηση με ένα όργανο, τον εξωθητή (Liposofast, Avestin, Inc.), μέσα στον οποίο τοποθετείται μια μεμβράνη polycarbonate με διάμετρο πόρων 50 nm. Έτσι, τα λιποσώματα εξωθούμενα διαμέσου αυτής της μεμβράνης 21 φορές, αποκτούν το μέγεθος των 50 nm περίπου. Έχουν γίνει μετρήσεις με δυναμική σκέδαση φωτός (dynamic light scattering) σε άλλο είδος λιποσωμάτων (POPC) και έχει βρεθεί πως το μέγεθος των λιποσωμάτων που προκύπτει από αυτή τη διαδικασία είναι 90 nm περίπου.

¹ Ο όρος 'unilamellar' χαρακτηρίζει το μέγεθος του λιποσώματος και συγκεκριμένα τον αριθμό των λιπιδικών διπλοστοιβάδων που το συνιστούν. Έτσι, unilamellar λιπόσωμα είναι αυτό που αποτελείται από μία διπλοστοιβάδα, ενώ multilamellar είναι το λιπόσωμα που αποτελείται από περισσότερες διπλοστοιβάδες λιπιδίων.

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων, εκτός από το εναιώρημα των λιποσωμάτων χρησιμοποιούνται και κάποια ρυθμιστικά διαλύματα. Για την παρασκευή των ρυθμιστικών διαλυμάτων (buffers) χρησιμοποιήθηκαν τα εξής χημικά:

- Sodium chloride (NaCl), Merck
- Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, Merck
- Tris(hydroxymethyl)-methylammonium chloride, BDH Chemicals Ltd
- Potassium chloride (KCl), Merck
- Magnesium chloride hexahydrate (MgCl₂. 6H₂O), Merck

Το ρυθμιστικό διάλυμα που παρασκευάζεται όταν διεξάγεται πείραμα με egg PC λιποσώματα είναι το 5 mM pH 8.0 TRIS, 50 mM NaCl, ενώ όταν πρόκειται για λιποσώματα από *E. coli* τότε το διάλυμα που χρησιμοποιούμε είναι 50 mM pH 8.0 TRIS, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂.

3.6 Πρωτεΐνη SecA

Η πρωτεΐνη SecA που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματά μας είναι μεμβρανική βακτηριακή και προέρχεται από το *E.coli*. Εκχυλίστηκε από το βακτήριο και προσφέρθηκε στο εργαστήριο μας από το Εργαστήριο του Καθηγητή Οικονόμου (ITE), σε συγκέντρωση 30 mg/ml. Ακριβώς πριν τη χρησιμοποίησή της στην πειραματική διαδικασία, γινόταν προσθήκη 1 mM DTT.

3.7 Μικροσκόπιο φθορισμού

Το μικροσκόπιο φθορισμού το χρησιμοποιούμε προκειμένου να διαπιστώσουμε αν υπάρχει ανάληψη φθορισμού μετά από φωτολεύκανση, ένα φαινόμενο που χαρακτηρίζει τη λιπιδική διπλοστοιβάδα (βλ. ενότητα 1.1.3). Το μικροσκόπιο που χρησιμοποιήσαμε είναι το NIKON ECLIPSE Ε 800 από το εργαστήριο Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας. Οι φωτογραφίες από τις επιφάνειες που εξετάστηκαν και που παρατίθενται στο Κεφάλαιο 4 ελήφθησαν με μεγεθυντικό φακό 40 Χ.

3.8 Καθαρισμός των μικροσυσκευών μετά το τέλος του πειράματος

Οι ακουστικές μικροσυσκευές Love wave που χρησιμοποίηθηκαν, μετά από κάθε χρήση τους και πριν να ξαναχρησιμοποιηθούν πρέπει να είναι απολύτως καθαρές. Ο λόγος είναι ότι πρέπει να απαλλαχθούν τόσο από το βιολογικό υλικό που έχει εναπομείνει στην επιφάνειά τους, όσο και από τα πολυμερή που έχουν υποστεί τροποποίηση στην επιφάνειά τους, ώστε πριν χρησιμοποιηθούν ξανά, να γίνει εκ νέου δημιουργία του ακουστικού κυματοδηγού με φρέσκα υλικά. Για το λόγο αυτό βάζουμε κάθε device σε διαφορετικό δοκιμαστικό σωλήνα και βάζουμε τόση ακετόνη ή χλωροφόρμιο όσο χρειάζεται ώστε να καλύπτεται η επιφάνειά τους. Αφήνουμε για 10-15 λεπτά. Επαναλαμβάνουμε με φρέσκο διαλύτη. Συνιστάται η μέτρηση του ακουστικού σήματος ώστε να συγκριθεί με την αμέσως προηγούμενη, ως επιβεβαίωση ότι το device λειτουργεί κανονικά στη συνήθη συχνότητα, με τις συνήθεις τιμές πλάτους και φάσης του ακουστικού κύματος.

4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Δημιουργία υποστηριζόμενης λιπιδικής διπλοστοιβάδας (ΥΛΔ) από egg PC λιπίδια

Ο σκοπός αυτών των πειραμάτων είναι να εξεταστεί η δυνατότητα αναπαραγωγής αποτελεσμάτων που έχουν ήδη ληφθεί στο Institute of Biotechnology, στο πανεπιστήμιο του Cambridge πάνω στη δημιουργία ΥΛΔ. Κάτι τέτοιο θα είναι προϋπόθεση και σημείο αναφοράς για την περαιτέρω διεξαγωγή και εγκυρότητα άλλων πειραμάτων με διαφορετικά λιπίδια.

Για τη δημιουργία υποστηριζόμενης λιπιδικής διπλοστοιβάδας από egg PC αλλά και από οποιαδήποτε λιπίδια χρησιμοποιοείται ακουστικός κυματοδηγός (PMMA 17%) με υδρόφιλη επιφάνεια PDMS 1%, με ταυτόχρονη παρακολούθηση του ακουστικού σήματος. Η πειραματική προσέγγιση είναι η εξής:

- Μέσω συστήματος συνεχούς ροής και περισταλτικής αντλίας η ακουστική μικροσυσκευή δέχεται ρυθμιστικό διάλυμα μέχρι το ακουστικό σήμα να εξισορροπήσει.
- Στην επιφάνεια παρέχεται εναιώρημα ομοιόμορφων σε μέγεθος και unilamellar λιποσωμάτων συγκέντρωσης 0,25 mg/ml για 10 λεπτά περίπου.
- Πλύση με ρυθμιστικό διάλυμα για την απομάκρυνση των λιποσωμάτων που είναι σε περίσσεια.
- Καταγραφή της μεταβολής του ακουστικού σήματος (ως αποτέλεσμα σχηματισμού λιπιδικής στοιβάδας στην επιφάνεια της ακουστικής μικροσυσκευής).
- 5. Μετά το πέρας του πειράματος, εξέταση της επιφάνειας της μικροσυσκευής (αφού τοποθετηθεί σε αντικειμενοφόρο πλάκα και η επιφάνειά του καλυφθεί από καλυπτρίδα), ώστε με το μικροσκόπιο φθορισμού να παρατηρηθεί η ανάληψη φθορισμού μετά από φωτολεύκανση κάτι που θα αποδεικνύει ή όχι την ύπαρξη λιπιδικής διπλοστοιβάδας.

Έχει δειχθεί από πειράματα (Shahal T., Gizeli E., unpublished data) πως κατά την εναπόθεση λιποσωμάτων egg PC συγκέντρωσης 0,25 mg/ml σε υδρόφιλη επιφάνεια, σχηματίζεται λιπιδική διπλοστοιβάδα και παρατηρείται απότομα πτώση της φάσης του ακουστικού σήματος κατά 0,8-1,0 deg. Στην

αντίθετη περίπτωση που δε σχηματίζεται διπλοστοιβάδα αλλά τα λιποσώματα συσσωρεύονται στην επιφάνεια, η χαρακτηριστική μεταβολή του ακουστικού σήματος είναι μια σταδιακή πτώση της φάσης μεγάλου μεγέθους που υπερβαίνει τους δύο βαθμούς (Διάγραμμα 4-3).

Πειράματα με λιποσώματα eggPC πραγματοποιήθηκαν και με τα δύο συστήματα συνεχούς ροής που ήταν διαθέσιμα στο εργαστήριο και έδιναν διαφορετικές ταχύτητες ροής. Οι φάσεις των ακουστικών σημάτων καταγράφηκαν και παρουσιάζονται για δύο διαφορετικές ταχύτητες ροής. Στο Διάγραμμα 4-1 φαίνεται η πτώση της φάσης που προκαλείται μετά από προσθήκη 0,25 mg/ml λιποσωμάτων egg PC με τη χρήση του συστήματος ροής Α. Παρατηρείται πως η μεταβολή αυτή είναι της τάξης των 0,6 deg, ενώ όπως φαίνεται από το διάγραμμα η ευαισθησία των ακουστικού βιοαισθητήρα είναι για μεταβολές μεγαλύτερες από 0,1 deg.



Διάγραμμα 4-1: Μεταβολή της φάσης μετά από προσθήκη λιποσωμάτων eggPC με τη χρήση του συστήματος ροής Α

Στο Διάγραμμα 4-2 φαίνεται η πτώση της φάσης που προκαλείται μετά από προσθήκη 0,25 mg/ml λιποσωμάτων egg PC με τη χρήση του συστήματος ροής Β. Παρατηρείται πως η μεταβολή αυτή είναι της τάξης των 0,75 deg.



Διάγραμμα 4-2: Μεταβολή της φάσης μετά από προσθήκη λιποσωμάτων eggPC με τη χρήση του συστήματος ροής Β

Επομένως, η διεξαγωγή πειραμάτων με τα δύο αυτά συστήματα ροής και τις αντίστοιχες ταχύτητες ροής μας δίνουν μεταβολές στα χαρακτηριστικά του ακουστικού σήματος οι οποίες είναι παρόμοιες. Εντούτοις, τα περισσότερα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με το σύστημα ροής Β διότι κατά την αφαίρεσή του μετά το τέλος του πειράματος η ποσότητα του δείγματος που παρέμενε στην επιφάνεια του πλακιδίου ήταν μεγαλύτερη και αυτό διευκόλυνε την εν συνεχεία παρατήρηση στο μικροσκόπιο φθορισμού. Επίσης, από τα δύο παραπάνω διαγράμματα προκύπτει ότι το σήμα ακολουθεί αναμενόμενη κινητική (βλ. ενότητα 2.5 και πειράματα Τ. Shahal). Πράγματι, όταν τα παραπάνω δείγματα παρατηρήθηκαν στη συνέχεια σε μικροσκόπιο φθορισμού διαπιστώθηκε πως έλαβε χώρα ανάληψη φθορισμού μετά τη φωτολεύκανση γεγονός που πιστοποιεί την ύπαρξη λιπιδικής διπλοστοιβάδας. Στην Εικόνα 4-1 φαίνεται από αριστερά προς τα δεξιά αρχικά ένα σημείο της επιφάνειας της ακουστικής μικροσυσκευής με το δείγμα, στη συνέχεια το ίδιο σημείο φωτολευκασμένο και τέλος το ίδιο σημείο μετά την πάροδο δέκα λεπτών όπου το διάφραγμα του μικροσκοπίου έχει παραμείνει κλειστό.



Εικόνα 4-1: Ανάληψη φθορισμού μετά τη φωτολεύκανση που παρατηρήθηκε στην επιφάνεια της ακουστικής μικροσυσκευής με λιπιδική διπλοστοιβάδα

Η πειραματική εμπειρία σε αυτό το κομμάτι έδειξε πως ο σχηματισμός λιπιδικής διπλοστοιβάδας στην επιφάνεια του αισθητήρα κάποιες φορές δεν ήταν εφικτός. Καθοριστικό ρόλο σε αυτό έπαιξαν τα εξής: α) το πόσο υδρόφιλη ή όχι ήταν η επιφάνεια. Παρατηρήθηκε πως όταν η χάραξη με χημεία πλάσματος ήταν ανεπιτυχής ή η επιφάνεια έμενε εκτεθειμένη για κάποιο χρόνο στον αέρα πριν τη χρησιμοποίησή της, τότε δεν ήταν τόσο υδρόφιλη, β) το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από την παρασκευή των λιποσωμάτων σε σχέση με την ημερομηνία διεξαγωγής του πειράματος. Όταν το παραπάνω χρονικό διάστημα υπερέβαινε τις τρεις ημέρες, τότε δε σχηματιζόταν λιπιδική διπλοστοιβάδα αλλά ένα συνεχές στρώμα από λιποσώματα. Σε αυτή την περίπτωση, η μεταβολή της φάσης του ακουστικού σήματος είχε άλλη μορφή και φαίνεται στο Διάγραμμα 4-3. Επιπλέον, στην επιφάνεια δεν παρατηρήθηκε ανάληψη φθορισμού μετά τη φωτολεύκανση που επιβεβαίωνε την απουσία της διπλοστοιβάδας. Παρατηρούμε από το διάγραμμα 4-3 πως η συνολική μεταβολή της φάσης μετά την εναπόθεση των λιποσωμάτων είναι πολύ μεγαλύτερη (3 deg) και συμβαίνει πιο αργά.



Διάγραμμα 4-3: Μεταβολή της φάσης μετά από προσθήκη λιποσωμάτων eggPC κατά τον σχηματισμό στοιβάδας λιποσωμάτων.

4.2 Δημιουργία υποστηριζόμενης λιπιδικής διπλοστοιβάδας από λιπίδια <u>Escherichia coli</u>

Δεδομένου ότι ήταν επιτυχής η προσπάθεια για τη δημιουργία λιπιδικής διπλοστοιβάδας από egg PC λιπίδια πάνω στην επιφάνεια της ακουστικής μικροσυσκευής με ταυτόχρονη παρακολούθηση του ακουστικού σήματος που ερμηνεύει ό,τι συμβαίνει στην επιφάνεια, το επόμενο βήμα ήταν να επιτευχθεί το ίδιο με λιπίδια άλλης προέλευσης. Τα λιπίδια που χρησιμοποιήθηκαν εδώ είναι από μεμβράνη βακτηριακής προέλευσης και συγκεκριμένα από το Escherichia coli. Тα λιπίδια αυτά αποτελούνται συγκεκριμένα από phosphatidylethanolamine 57.5%, phosphatidylglycerol 15.1%, cardiolipin 9.8% και από άλλα 17,6%. Εξαιτίας της σύνθεσης αυτής είναι αρνητικά φορτισμένα με αποτέλεσμα να καθίσταται περισσότερο δύσκολη η εναπόθεσή τους στην επιφάνεια της μικροσυσκευής με PDMS. Έχει αναφερθεί άλλωστε πως τα λιπίδια αυτά δίνουν δυσκολότερα υποστηριζόμενη λιπιδική διπλοστοιβάδα εξαιτίας ηλεκτροστατικών απωστικών δυνάμεων και μόνο με παρουσία δισθενούς κατιόντος (Ca²⁺) το πρόβλημα αυτό αντιμετωπίζεται (Nollert et al., 1995). Για το λόγο αυτό στα πειράματά μας το buffer που χρησιμοποιήθηκε είχε εκτός των άλλων αλάτων και MgCl₂ 5 mM.



Διάγραμμα 4-4: Μεταβολή της φάσης μετά από προσθήκη *Ε. coli* λιποσωμάτων σε επιφάνεια που έχει επικαλυφθεί με PMMA και PDMS. Σχηματισμός στοιβάδας λιποσωμάτων.

Πράγματι, έγινε προσπάθεια για σχηματισμό λιπιδικής διπλοστοιβάδας ακριβώς όπως περιγράψαμε στην περίπτωση των λιπιδίων egg PC (βλ. ενότητα 4-1). Τα αποτελέσματα εντούτοις δεν ήταν ικανοποιητικά διότι: a) σε πολλές περιπτώσεις δε σχηματίστηκε λιπιδική διπλοστοιβάδα και β) μερικές φορές δεν μπορούσε να εξαχθεί συμπέρασμα από το ακουστικό σήμα για το σχηματισμό διπλοστοιβάδας στην επιφάνειά μας. Στο διάγραμμα 4-4 φαίνεται η μεταβολή της φάσης του ακουστικού σήματος όταν στην υδρόφιλη επιφάνεια της μικροσυσυκευής προστέθηκαν λιποσώματα. Όπως προέκυψε από τον έλεγχο της επιφάνειας στο μικροσκόπιο φθορισμού, δεν παρατηρήθηκε ανάληψη μετά τη φωτολεύκανση και επομένως πρόκειται για στοιβάδα λιποσωμάτων.

Ο σχηματισμός στοιβάδας λιποσωμάτων πάνω στην επιφάνεια που δουλεύουμε ενδεχομένως μπορεί να αποδοθεί στο αρνητικό φορτίο των λιποσωμάτων που δρα παρεμποδιστικά στη σύντηξή τους. Δεδομένου ότι και το PDMS μετά τη χημεία πλάσματος που έχει υποστεί είναι μια επιφάνεια αρνητικά φορτισμένη, είναι δύσκολο λόγω ηλεκτροστατικών δυνάμεων να πλησιάσουν μεταξύ τους τα λιποσώματα και να «ανοίξουν» προς σχηματισμό διπλοστοιβάδας, ενώ το MgCl₂ που περιέχει το buffer φαίνεται να μη διευκολύνει προς αυτή την κατεύθυνση.

Για το λόγο αυτό αναζητήθηκαν άλλοι τρόποι που θα προκαλούσαν το σχηματισμό λιπιδικής διπλοστοιβάδας ξεπερνώντας εμπόδιο το των ηλεκτροστατικών απωστικών δυνάμεων. Η πολυλυσίνη είναι ένα κατιονικό πεπτίδιο, που βοηθά στην προσκόλληση βιομορίων και κυττάρων (βλ. σελίδα 35). Επίσης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την προσκόλληση λιπιδικής διπλοστοιβάδας. Πράγματι, έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία ότι η πολυλυσίνη ευνοεί το πλησίασμα και τη σύντηξη μικρών αρνητικά φορτισμένων egg PC λιποσωμάτων τα οποία περιέχουν τουλάχιστον 10% ανιονικά λιπίδια (Walter et al., 1986). Η έκταση της σύντηξης μάλιστα εξαρτάται από την αναλογία της πολυλυσίνης με τα αρνητικά φορτισμένα λιπίδια, ενώ αν η πολυλυσίνη είναι σε υπερβολική ποσότητα τότε ενδεχομένως η σύντηξη να παρεμποδίζεται. Από την άλλη, η πολυλυσίνη παρά τον πολυκατιονικό της χαρακτήρα μπορεί να διαπεράσει τη λιπιδική διπλοστοιβάδα όταν ενωθεί (complexed) με ένα ανιονικό λιπίδιο που βρίσκεται στο τοίχωμα του λιποσώματος (Menger et al., 2003).

Πραγματοποιήθηκαν πολλές πειραματικές δοκιμές με τη χρήση της πολυλυσίνης στην επιφάνεια και με λιποσώματα από *E. coli*, όμως τα αποτελέσματα δεν είναι τόσο ξεκάθαρα όσο αυτά με τα egg PC λιπίδια. Η δημιουργία λιπιδικής διπλοστοιβάδας πάνω στην επιφάνεια του αισθητήρά μας επετεύχθη, εντούτοις το ακουστικό σήμα δεν ήταν πάντα το ίδιο.

Στο Διάγραμμα 4-5 φαίνεται η μεταβολή της φάσης του ακουστικού κύματος όταν στην επιφάνεια του πλακιδίου εναποτεθούν λιποσώματα από *E. coli.* Η ύπαρξη λιπιδικής διπλοστοιβάδας για κάθε περίπτωση διαπιστώθηκε με εξέταση της επιφάνειας στο μικροσκόπιο φθορισμού, για την παρατήρηση ενδεχόμενης ανάληψης φθορισμού μετά τη φωτολεύκανση. Οι περιπτώσεις SLB-1 και SVL ήταν και οι πιο ακραίες με σχηματισμό υποστηριζόμενης λιπιδικής διπλοσομάτων αντίστοιχα.



Διάγραμμα 4-5: Μεταβολή της φάσης του ακουστικού κύματος όταν εναποτίθενται λιποσώματα *Ε. coli* . Οι καμπύλες SLB-1, SLB-2 και SLB-3 αναφέρονται σε σχηματισμό λιπιδικής διπλοστοιβάδας ενώ η καμπύλη SVL στο σχηματισμό μονοστοιβάδας λιποσωμάτων



Εικόνα 4-2: Ανάληψη φθορισμού μετά τη φωτολεύκανση που παρατηρήθηκε στην επιφάνεια SLB-1.

Στην επιφάνεια SLB-1 παρατηρήθηκε πτώση φάσης 0,7 deg περίπου στο ακουστικό σήμα και όπως παρατηρήθηκε στο μικροσκόπιο φθορισμού, η λιπιδική διπλοστοιβάδα ήταν ομοιόμορφα απλωμένη σε όλη την επιφάνεια και είχε την εμφάνιση που φαίνεται στην Εικόνα 4-2. Επίσης, η πλευρική διάχυση (lateral diffusion) ήταν αρκετά έντονη, ώστε λίγα μόλις λεπτά με κλειστό το διάφραγμα του μικροσκοπίου ήταν αρκετά για να έχουμε ανάληψη φθορισμού όπως φαίνεται στην παραπάνω εικόνα.

Όταν η προσπάθεια για σχηματισμό της λιπιδικής διπλοστοιβάδας ήταν ανεπιτυχής, τότε είχαμε απλά συγκέντρωση λιποσωμάτων στην επιφάνεια του πλακιδίου και σχηματισμό στρώσης λιποσωμάτων. Σε αυτή την περίπτωση δεν παρατηρήθηκε ανάληψη φθορισμού (εικόνα 4-3) και η μεταβολή του ακουστικού σήματος παριστάνεται στην καμπύλη SVL του διαγράμματος 4-5. Όπως φαίνεται από την καμπύλη η πτώση της φάσης ήταν πιο αργή και ξεπερνούσε τα 2,0 deg.



Εικόνα 4-3: Μη ανάκτηση φθορισμού μετά τη φωτολεύκανση που παρατηρήθηκε στην επιφάνεια SVL.

Εκτός όμως από τις δύο ακραίες περιπτώσεις που περιγράφηκαν παραπάνω, κάποιες από τις πειραματικές δοκιμές έδειξαν πως υπάρχουν και κάποιες ενδιάμεσες καταστάσεις.

Συγκεκριμένα, λιπιδική διπλοστοιβάδα παρατηρήθηκε και στην περίπτωση που φαίνεται στο διάγραμμα 4-5 ως SLB-2. Η μεταβολή της φάσης του ακουστικού σήματος είναι αρκετά μεγαλύτερη και διαφορετική από το SLB-1. Πράγματι, στο μικροσκόπιο φθορισμού εντοπίστηκαν κάποιες διαφορές οι οποίες είχαν να κάνουν με την ομοιομορφία της επιφάνειας και την ανάληψη του φθορισμού. Η επιφάνεια δεν ήταν ομοιόμορφη σε ότι αφορά την έκταση της λιπιδικής διπλοστοιβάδας και επιπλέον η διάχυση γινόταν πολύ αργά (Εικόνα 4-4). Αυτό ενδεχομένως να σημαίνει ότι μεταξύ των λιποσωμάτων που είχαν συντηχθεί προς σχηματισμό λιπιδικής διπλοστοιβάδας, κάποια λιποσώματα είχαν παραμείνει ως είχαν. Αν παρατηρήσουμε τη μεταβολή του ακουστικού σήματος SLB-2, βλέπουμε πως αυτό είναι ένα ενδιάμεσο πρότυπο μεταξύ του προτύπου μιας καλής, ζωηρής και ομοιόμορφης λιπιδικής διπλοστοιβάδας (SLB-1) και αυτού που αντιστοιχεί σε μονοστοιβάδα λιποσωμάτων (SVL).



Εικόνα 4-4: Ανάληψη φθορισμού μετά τη φωτολεύκανση που παρατηρήθηκε στην επιφάνεια SLB-2.

Κάτι ανάλογο συμβαίνει και στην περίπτωση της καμπύλης SLB-3. Κατά την παρατήρηση της επιφάνειας διαπιστώθηκε αρκετή ανομοιογένεια διότι σε κάποια σημεία της επιφάνειας είχαμε μεν ανάληψη του φθορισμού ενώ σε άλλα σημεία αυτό συνέβαινε μερικώς ή καθόλου. Στην Εικόνα 4-5 φαίνεται ένα δείγμα της επιφάνειας. Η επιφάνεια αυτή παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον διότι έχει χαρακτηριστική ανομοιομορφία με έντονες φωτεινές κηλίδες, εντούτοις όμως πρόκειται για λιπιδική διπλοστοιβάδα αφού όπως φαίνεται και από την παρακάτω εικόνα παρατηρείται ανάληψη φθορισμού. Οι κηλίδες αυτές ενδεχομένως να είναι κάποια λιποσώματα τα οποία δεν έχουν συντηχθεί και τα οποία έχουν παραμείνει στην επιφάνεια της διπλοστοιβάδας αδιάρρηκτα.



Εικόνα 4-5: Ανάληψη φθορισμού μετά τη φωτολεύκανση που παρατηρήθηκε στην επιφάνεια SLB-3.

Όμως, το γεγονός ότι ο φθορισμός ανακτάται μετά τη φωτολεύκανση δε συνάδει με την εξήγηση αυτή. Έτσι, η επόμενη σκέψη είναι ότι αυτές οι κηλίδες μπορεί να προέρχονται από την επιφάνεια που βρίσκεται κάτω από τη λιπιδική διπλοστοιβάδα. Για το λόγο αυτό, φωτογραφήθηκαν περιοχές της ακουστικής μικροσυσκευής κάτω από το μικροσκόπιο φθορισμού, όταν στην επιφάνεια υπήρχε μόνο ο κυματοδηγός (το πολυμερές PMMA) και όταν ήταν επιστρωμένο με PMMA και PDMS (Εικόνες 4-6 και 4-7 αντίστοιχα). Στις επιφάνειες αυτές δεν έχει γίνει καμία άλλη διεργασία πλην της επίστρωσής τους με τα πολυμερή.



Εικόνα 4-6: Επιφάνεια πλακιδίου επικαλυμμένη με ΡΜΜΑ 17%



Εικόνα 4-7: Επιφάνεια πλακιδίου επικαλυμμένη με PMMA 17% και PDMS 1%

Όπως φαίνεται από τις παραπάνω εικόνες, ενώ η επιφάνεια είναι αρκετά λεία, εντούτοις σε κάποια σημεία φαίνονται κάποιες φωτεινές κηλίδες που είναι παρόμοιες σε ένταση και μέγεθος με αυτές που παρατηρήθηκαν στην επιφάνεια της Εικόνας 4-5. Επομένως, το πιο πιθανόν είναι ότι στο πείραμα SLB-3 η ύπαρξη φωτεινών κηλίδων αποδίδεται στα πολυμερή και σε κάποιες ατέλειες που συνέβησαν κατά την επίστρωσή τους.

Προκειμένου να έχουμε μια συνολική εικόνα της επιφάνειας των ακουστικών μικροσυσκευών με τα πολυμερή, εξετάστηκε η τραχύτητα της επιφάνειας με Atomic Force Microscopy (AFM). Αυτό έγινε για να έχουμε συν τοις άλλοις μια συγκριτική εικόνα της επιφάνειας πριν και μετά τη χάραξη με χημεία πλάσματος. Αρχικά, μετρήθηκε η τραχύτητα σε μια γυάλινη επιφάνεια επικαλυμμένη με τα πολυμερή που χρησιμοποιούμε στα ακουστικά πλακίδια (PMMA 17% και PDMS 1%). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 4-8, η επιφάνεια είναι λεία και ομοιόμορφη με ενεργό τιμή της τραχύτητας (Root mean square, RMS) 0,280 nm.



Εικόνα 4-8: AFM σε γυάλινη επιφάνεια επικαλυμμένη με PMMA 17% και PDMS 1%

Στη συνέχεια, στην παραπάνω επιφάνεια έγινε χάραξη με χημεία πλάσματος στις ίδιες συνθήκες με αυτές που εφαρμόζονται στις ακουστικές μικροσυσκευές (πλάσμα με αργό για 180 s υπό πίεση στα 0,15 mbar) και εξετάστηκε σε AFM. Από την Εικόνα 4-9 φαίνεται εύκολα πως η επιφάνεια έχει γίνει περισσότερο τραχιά σε όλη την έκτασή της εξαιτίας της χημείας πλάσματος και πιο συγκεκριμένα η ενεργός τιμή της τραχύτητας έχει σχεδόν τριπλασιαστεί (0,697 nm). Η υπερβολική χάραξη της επιφάνειας είναι ανεπιθύμητη διότι από τη μία μπορεί να οδηγήσει σε αφαίρεση του στρώματος PDMS που έτσι κι αλλιώς είναι αρκετά λεπτό, ή από την άλλη η υψηλή τραχύτητα καθιστά την επιφάνεια ακατάλληλη για σχηματισμό λιπιδικής διπλοστοιβάδας.



Εικόνα 4-9: AFM σε γυάλινη επιφάνεια επικαλυμμένη με PMMA 17% και PDMS 1% μετά τη χάραξη με χημεία πλάσματος.

Γενικά, όπως φαίνεται από το διάγραμμα 4-5 οι προσπάθειες για σχηματισμό λιπιδικής διπλοστοιβάδας από λιπίδια *E. coli* εμφάνισαν κάποιες δυσκολίες που δεν αντιμετωπίσαμε όταν κάναμε το ίδιο με τα egg PC λιπίδια. Αυτές έχουν να κάνουν κυρίως με την επαναληψιμότητα των πειραμάτων, σε ότι αφορά το σχηματισμό της λιπιδικής διπλοστοιβάδας όπως εξετάστηκε από το πρότυπο του ακουστικού σήματος και όπως επιβεβαιώθηκε από την ανάληψη του φθορισμού μετά από φωτολεύκσνση. Κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων, εντοπίστηκαν κάποιοι παράγοντες που επηρέασαν αρνητικά την επαναληψιμότητα των πειραμάτων.

Η προετοιμασία της επιφάνειας της ακουστικής μικροσυσκευής είναι μια διαδικασία πολλών σταδίων (καθαρισμός, επίστρωση με τα πολυμερή PMMA και PDMS, χάραξη με χημεία πλάσματος και πολυλυσίνη) και η οποία συμβαίνει κάθε φορά πριν τη διεξαγωγή πειράματος. Μπορεί μεν ο τρόπος δημιουργίας της επιφάνειας να είναι κάθε φορά απαράλλαχτος αλλά είναι πιθανό να υπάρξουν σφάλματα στα επιμέρους στάδια της διαδικασίας που έχουν να κάνουν είτε με τις περιβαλλοντικές συνθήκες, είτε με τον τρόπο παρασκευής του διαλύματος του πολυμερούς ή κάποιο άλλο μη ελεγχόμενο παράγοντα. Αυτό επισημαίνεται διότι παρατηρήθηκαν μικροδιαφορές στην τελική επιφάνεια κατά την επίστρωση της ακουστικής μικροσυσκευής με τα πολυμερή. Έπειτα, κατά τη χάραξη με χημεία πλάσματος παρατηρήθηκε ορισμένες φορές κάποια αστάθεια της πίεσης του συστήματος η οποία όμως δεν ήταν δυνατό να ελεγχθεί από το χρήστη. Σε αυτή την περίπτωση τα χαρακτηριστικά της επιφάνειας, όπως για παράδειγμα η γωνία επαφής ή η τραχύτητα εμφάνιζαν κάποιες διαφορές. Αυτό αποτελεί άλλον έναν παράγοντα που μπορεί να έχει παίξει ρόλο στην επαναληψιμότητα των πειραμάτων, δεδομένου ότι η τελική επιφάνεια πριν την εναπόθεση των λιποσωμάτων σε αυτή, ενδεχομένως να είχε κάθε φορά διαφορετική εικόνα. Οι μικροδιαφορές στην επιφάνεια, μπορεί να μην είναι καθοριστικές για το οχηματισμό της λιπιδικής διπλοστοιβάδας, όμως μπορεί να ευθύνονται για την έλλειψη ομοιομορφίας του και για τις διαφορές που παρουσιάζονται στο ακουστικό σήμα το οποίο χαρακτηρίζεται από υψηλή ευαισθησία (Διάγραμμα 4-5, Εικόνα 4-2, 4-4 και 4-5).

Σε κάθε περίπτωση, ακόμα και όταν η επιφάνεια με την ΥΛΔ δεν είχε την επιθυμητή ομοιμορφία, μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για περαιτέρω πειράματα με πρωτεΐνη. Έτσι, πάνω στη διπλοστοιβάδα θα γίνει προσπάθεια για προσκόλληση της βακτηριακής μεμβρανικής πρωτεΐνης Sec A.

4.3 Δέσιμο της πρωτεΐνης SecA στην υποστηριζόμενη λιπιδική διπλοστοιβάδα από Ε. coli λιπίδια

Στην παρούσα μελέτη, έγινε προσπάθεια ώστε η πρωτεΐνη SecA να προσδεθεί στην ΥΛΔ από *E. coli* λιπίδια που δημιουργούμε πάνω στην ακουστική μικροσυσκευή και να δούμε τη μεταβολή του ακουστικού σήματος σε αυτή την περίπτωση.

Η δυσκολία που είχε αυτή η προσπάθεια συνίσταται κυρίως στο γεγονός ότι με τις συνθήκες που έχουν περιγραφεί στις προηγούμενες ενότητες, πρέπει να εξασφαλιστεί ο σχηματισμός λιπιδικής διπλοστοιβάδας, να χρησιμοποιηθεί η κατάλληλη συγκέντρωση πρωτεΐνης για να δούμε αλληλεπίδραση και αυτή να καταγραφεί ως μεταβολή του ακουστικού σήματος. Πραγματοποιήθηκαν κάποια πειράματα χρησιμοποιώντας χαμηλές συγκεντρώσεις της SecA (5 και 10 μg/ml), όμως δεν παρατηρήθηκε κάποια μεταβολή που να υποδηλώνει δέσιμο της πρωτεΐνης στη λιπιδική διπλοστοιβάδα. Αντίθετα, όταν η πρωτεΐνη που προστέθηκε ήταν σε συγκέντρωση 20 μg/ml, τότε παρατηρήθηκε δέσιμο στη

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

λιπιδική διπλοστοιβάδα το οποίο απεικονίστηκε ως μεταβολή στο ακουστικό σήμα. Στο Διάγραμμα 4-6 φαίνεται η μεταβολή της φάσης του ακουστικού κύματος κατά τη διάρκεια αυτού του πειράματος. Με την προσθήκη των λιποσωμάτων, παρατηρήθηκε πτώση 0,5 deg στη φάση του ακουστικού κύματος. Αυτό το πρότυπο συνοδευόμενο και από μια τέτοια πτώση είναι χαρακτηριστικό σχηματισμού λιπιδικής διπλοστοιβάδας όπως είδαμε στην ενότητα 4.2 και επομένως είναι σκόπιμη η προσθήκη της πρωτεΐνης SecA. Πράγματι, όταν προστεθεί η SecA σε συγκέντρωση 20 μg/ml παρατηρείται πτώση της φάσης του ακουστικού σήματος 0,4 deg. Η πτώση αυτή σημαίνει πως κάποια ποσότητα πρωτεΐνης έχει παραμείνει στην επιφάνειά μας, δηλαδή έχει ενωθεί με τη λιπιδική διπλοστοιβάδα.

Εξετάζοντας στη συνέχεια την επιφάνεια στο μικροσκόπιο φθορισμού παρατηρούμε σε ορισμένα σημεία της επιφάνειας κάποια μαύρα στίγματα τα οποία ενδεχομένως να είναι η πρωτεΐνη (Εικόνα 4-10).



Εικόνα 4-10: Τμήμα της επιφάνειας μετά την εναπόθεση της πρωτεΐνης στη λιπιδική διπλοστοιβάδα



Διάγραμμα 4-6: Μεταβολή της φάσης του ακουστικού κύματος όταν εναποτίθενται λιποσώματα Ε. coli και στη συνέχεια η πρωτεΐνη SecA



Εικόνα 4-11: Ανάληψη φθορισμού μετά τη φωτολεύκανση που παρατηρήθηκε στην επιφάνεια

Επιπλέον, παρατηρείται ανάληψη φθορισμού μετά τη φωτολεύκανση η οποία όμως δεν είναι πλήρης όπως φαίνεται και στην Εικόνα 4-11. Το γεγονός αυτό μάλλον είναι αναμενόμενο δεδομένου ότι πάνω στην ΥΛΔ υπάρχει κάποια επιπλέον μάζα, η οποία καθιστά την κινητικότητα μειωμένη και επομένως η πλευρική διάχυση της λιπιδικής διπλοστοιβάδας συμβαίνει με πολύ πιο βραδύ ρυθμό.

Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα των πειραμάτων με τη χρήση της πρωτεΐνης SecA, ο ακουστικός βιοαισθητήρας Love wave και η μελέτη της φάσης του ακουστικού κύματος δίνει πληροφορία για την πρόσδεση της πρωτεΐνης στη λιπιδική διπλοστοιβάδα.

5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η δημιουργία ΥΛΔ από *E. coli* λιπίδια στην επιφάνεια του ακουστικού βιοαισθητήρα Love wave, η πρόσδεση σε αυτήν της πρωτεΐνης SecA ώστε να αποτελέσει μια μεμβράνη μοντέλο και η μελέτη της απόκρισης του βιοαισθητήρα στις αντιδράσεις που συμβαίνουν στην επιφάνειά του. Από την πειραματική προσέγγιση που έγινε στο θέμα αυτό και περιγράφηκε αναλυτικά στο προηγούμενο κεφάλαιο, προκύπτουν τα παρακάτω συμπεράσματα:

- Σε τροποποιημένη επιφάνεια του ακουστικού αισθητήρα μπορεί να επιτευχθεί σχηματισμός ΥΛΔ από λιπίδια egg PC.
- 2. Η μεταβολή της φάσης του ακουστικού κύματος και το πρότυπο που δίνει σε συνάρτηση με το χρόνο δίνει ξεκάθαρη και αξιόπιστη πληροφορία για το σχηματισμό του ΥΛΔ. Σε περίπτωση που δε γίνει σχηματισμός ΥΛΔ το πρότυπο που προκύπτει είναι εντελώς διαφορετικό.
- Για το σχηματισμό της ΥΛΔ απαραίτητες προϋποθέσεις είναι η επιφάνεια της ακουστικής μικροσυσκευής να είναι υδρόφιλη και τα χρησιμοποιούμενα λιποσώματα φρέσκα.
- Ο σχηματισμός ΥΛΔ από *E. coli* λιπίδια απαιτεί μια επιπλέον τροποποίηση της επιφάνειας που εδώ ήταν η προσθήκη πολυλυσίνης.
- 5. Το πρότυπο της μεταβολής της φάσης σε σχέση με το χρόνο κατά το σχηματισμό ΥΛΔ από *E. coli* λιπίδια διέφερε σε σχέση με αυτό που παρατηρήθηκε κατά το σχηματισμό ΥΛΔ από λιπίδια egg PC. Η πτώση της φάσης δεν ήταν το ίδιο απότομη και δεν ξεπέρασε τα 0,7 deg. Όταν όμως δεν είχαμε σχηματισμό ΥΛΔ αλλά στοιβάδας λιποσωμάτων τότε το πρότυπο ξεπερνούσε τα 2 deg και έμοιαζε με το αντίστοιχο από λιποσώματα egg PC.
- 6. Στα πειράματα με E. coli λιπίδια εκτός από τις δύο ακραίες καταστάσεις (σχηματισμού ΥΛΔ και μονοστοιβάδας λιποσωμάτων) παρατηρήθηκαν και κάποιες ενδιάμεσες. Σε αυτές τις περιπτώσεις, τόσο το πρότυπο της φάσης του κύματος που προέκυπτε ήταν κάτι ενδιάμεσο όσο και η εικόνα της επιφάνειας όπως φαινόταν από το μικροσκόπιο φθορισμού. Αυτό συνέβαινε, είτε διότι στην επιφάνεια είχαν παραμείνει κάποια λιποσώματα τα οποία δεν είχαν συντηχθεί, είτε γιατί η επιφάνεια είχε από την αρχή κάποιες ατέλειες κατά την επίστρωση με τα πολυμερή.

- 7. Η επαναληψιμότητα των πειραμάτων με *E. coli* λιπίδια δεν ήταν τόσο καλή όσο με τα egg PC λιπίδια. Πιθανές αιτίες μπορεί να είναι κάποια σφάλματα στα επιμέρους στάδια της διαδικασίας προετοιμασίας της επιφάνειας της μικροσυσκευής και η αστάθεια του συστήματος χάραξης με χημεία πλάσματος που παρουσιάστηκε για κάποια περίοδο.
- 8. Στην ΥΛΔ που προκύπτει γίνεται πρόσδεση της πρωτεΐνης SecA συγκέντρωσης 20 mg/ml. Αυτό προκύπτει τόσο από τη μεταβολή της φάσης του ακουστικού σήματος όσο και από την ανάληψη φθορισμού μετά τη φωτολεύκανση.

Από όλα τα παραπάνω φαίνεται πως ο ακουστικός βιοαισθητήρας Love wave μπορεί να χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για την ανάπτυξη μεμβρανικών μοντέλων και τη μελέτη μεμβρανικών αλληλεπιδράσεων. Οι μεταβολές στη φάση του ακουστικού κύματος δίνουν αξιόπιστη πληροφορία για τις αντιδράσεις που συμβαίνουν στην επιφάνεια και επομένως αξίζει η περαιτέρω μελέτη σε αυτό το θέμα. Βελτιώσεις σε επιμέρους διαδικασίες αναμφισβήτητα μπορούν να γίνουν, κυρίως σε ότι αφορά την προετοιμασία και την τροποποίηση της επιφάνειας ώστε να καταστεί ιδανική για την εναπόθεση ΥΛΔ από *E. coli* λιπίδια.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. 'Molecular Biology of the Cell', 4th Edition, 2002, Garland Science, pp. 583-593
- 2. Boxer S., 2000. Molecular transport and organization in supported lipid membranes. *Current Opinion in Chemical Biology* 4(6):704-709.
- 3. Cremer P.S. and Boxer S.G., 1999. Formation and spreading of lipid bilayers on planar glass supports. *Journal of Physical Chemistry*, 103:2554-2559
- 4. Economou, 2002. Bacterial secretome: the assembly manual and operating instructions. *Molecular Membrane Biology*, 19:159-169
- 5. Fisher M., Tjarnhage T., 2000. Structure and activity of lipid membrane biosensor surfaces studied with atomic force microscopy and a resonant mirror. *Biosensors and Bioelectronics*, 15:463-471.
- Giffard C.J., Ladha S., Mackie A.R., Clark D.C., Sanders D., 1996. Interaction of nisin with planar lipid bilayers monitored by fluorescence recovery after photobleaching. *Journal of Membrane Biology* 151, 293-300.
- Gizeli E., Liley M., Lowe C., Vogel H., 1997. Antibody binding to a functionalized supported lipid layer: A direct acoustic immunosensor. *Analytical Chemistry*, 69:4808-4813.
- Gizeli E., Bender F., Rasmusson A., Saha K., Josse F., Cernosek R., 2003. Sensitivity of the acoustic waveguide biosensor to protein binding as a function of the waveguide properties. *Biosensors and Bioelectronics*, 18:1399-1406.

- E. Gizeli "Acoustic transducers", Biomolecular Sensors, Eds. E. Gizeli & C.R. Lowe, 2002, Taylor & Francis, UK.
- 10.Graneli A., Rydstrom J., Kasemo B., Hook F., 2003. Formation of supported lipid bilayer membranes on SiO₂ from proteoliposomes containing transmembrane proteins. *Langmuir*, 19:842-850.
- 11. Groves JT., Dustin ML., 2003. Supported planar bilayers in studies on immune cell adhesion and communication. *Journal of Immunological Methods*, 278: 19-32.
- Kane R., Takayama S., Ostuni E., Ingber D., Whitesides G., 1999.
 Patterning proteins and cells using soft lithography. *Biomaterials*, 20: 2363-2376.
- 13.Keller CA and Kasemo B., 1998. Surface specific kinetic of lipid vesicle adsorption measured with a quartz crystal microbalance. *Biophysical Journal* 75:1397-1402.
- 14. Keller CA, Glasmaster K, Ahdanov VP, Kasemo B., 2000. The formation of supported membranes from vesicles. *Phys Rev Letts*, 84:5443-5446
- 15. Melzak K. and Gizeli E., 2002. A silicate gel for promoting deposition of lipid bilayers. *Journal of Colloid and Interface Science*, 246:21-28.
- 16. Melzak K., Ellar D., Gizeli E., 2004. Interaction of cytolytic toxin CytB with a supported lipid bilayer: Study using an acoustic wave device. *Langmuir* 20(4):1386-1392.
- Menger F., Seredyuk V., Kitaeva M., Yaroslavov A., Melik-Nubarov N., 2003. Migration of Poly-L-lysine through a lipid bilayer. J. Am. Chem. Soc, 125: 2846-2847.
- 18. Mueller H., Butt H-J., Bamberg E., 1999. Force measurements on myelin basic protein adsorbed to mica and lipid bilayer surfaces done with the atomic force microscope. *Biophysical Journal* 76:1072-1079.

- 19.Nollert P., Kiefer H., Jahnig F, 1995. Lipid vesicle adsorption versus formation of planar bilayers on solid surfaces. *Biophysical Journal*. 69:1447-1455.
- 20. Reviakine I. and Brisson A., 2000. Formation of supported phospholipid bilayers unilamellar vesicles investigated by atomic force microscopy. *Langmuir* 16:1806-1815.
- 21.Salamon Z., Lindblom G., Rilfors L., Linde K., Tollin G., 2000. Interaction of phosphatidylserine synthase from *E.coli* with lipid bilayers: Coupled plasmon-waveguide resonance spectroscopy studies. *Biophysical Journal* 78:1400-1412.
- 22. Struyer Lubert, 1997. ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ, Α' ΤΟΜΟΣ, Τρίτη έκδοση, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, σελ: 296-308.
- 23. Tozeren A., Sung K., Sung L., Dustin M., Chan P., Springer T., Chien S., 1992. Micromanipulation of adhesion of a jurkat cell to a planar bilayer containing lymphocyte function-associated antigen 3 molecules. *Journal of Cell Biology*, 116: 997-1006.
- 24. Tserepi A., Cordoyannis G., Patsis G.P., Constantoudis V., Gogolides E., Valamontes E.S., Eon D., Peignon C., Cartry G., Cardinaud C., Turban G., 2003. Etching behavior of Si-containing polymers as resist materials for bilayer lithography: The case of poly-dimethyl siloxane. J. Vac. Sci. Technol. B, 21(1):174-182.
- 25.Tullier M., 2004. Acoustic sensors. http://audfs.eng.auburn.edu/docs/bkgrnd-sensors.pdf 20-12-2004.
- 26. Ulbrandt N., London E., Oliver D., 1992. Deep penetration of a portion of *Escherichia coli* SecA protein into model membranes is promoted by anionic phospholipids and by partial unfolding. *Journal of Biological Chemistry*, 267(21): 15184-15192.

- 27. Walter A, Steer CJ, Blumenthal R., 1986. Polylysine induces pHdependent fusion of acidic phospholipid vesicles: a model for polycation-induced fusion. *Biochim Biophys Acta*. 861(2): 319-30.
- 28. Watts T.H., Gaub H.E., McConnell H.M., 1986. T-cell-mediated association of peptide antigen and major histocompatibility complex protein detected by energy transfer in an evanescent wave-field. *Nature*, 320:179-181.