

**ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΤΗΣ
ΤΣΑΝΑΚΑ ΧΡΥΣΟΥΛΑΣ**

*“Μελέτη πρόσδεσης της πρωτεΐνης IgG σε τροποποιημένη με
νουτραβιδίνη επιφάνεια ακουστικής μικροσυσκευής”*

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΓΚΙΖΕΛΗ ΗΛΕΚΤΡΑ

**ΗΡΑΚΛΕΙΟ
2005**

Στους γονείς μου

Ευχαριστίες

Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε εξ ολοκλήρου στο Εργαστήριο Ακουστικών Βιοαισθητήρων, υπό την επίβλεψη της καθηγήτριας Ηλέκτρας Γκιζελή, με την οποία είχαμε άψογη συνεργασία καθόλη τη διάρκεια της εκπόνησης της και την οποία θα ήθελα να την ευχαριστήσω ιδιαίτερα για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθώς και για τις ευκαιρίες που μου έδωσε σε επιστημονικό και ερευνητικό επίπεδο.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την Kathryn Melzak και τον Γιώργο Παπαδάκη και για τη βοήθεια και τη στήριξη που μου προσέφεραν τόσο σε επιστημονικό όσο και σε προσωπικό επίπεδο. Ευχαριστώ επίσης τη Δώρα Αυχούδια για την βοήθεια και την φιλία που μου πρόσφερε. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Jana Masarova, Tamar Shahal, Mike Schulte, Σαιτάκη Μιγάλη, Στάλω Παπαχαλαράμπους και Αλέξανδρο Παναταζή για τις ευχάριστες στιγμές στον εργασιακό χώρο.

Ευχαριστίες οφείλω και στην Κούλα ...

Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον Παναγιώτη όχι μόνο για την αμέριστη αγάπη, φιλία και τη συμπαράστασή του αλλά και για τις στιγμές χαράς που μου πρόσφερε.

Τέλος ένα μεγάλο ευχαριστώ για την πραγματικά ανιδιοτελή στήριξη και αγάπη της οικογένειάς μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Abstract	I
Περίληψη	II
<u>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</u>	1
<u>1.1.Κατηγορίες Βιοαισθητήρων</u>	5
1.1.1.Ηλεκτροχημικοί	5
1.1.2.Οπτικοί	5
<u>1.2.Ακουστικοί Βιοαισθητήρες</u>	7
<u>1.3.Ακουστικός Βιοαισθητήρας κύματος Love</u>	8
1.3.1.Ακουστική μικροσυσκευή SAW	8
1.3.2.Προσθήκη κυματοδηγού	10
1.3.3.Ιδιότητες ακουστικού κύματος και μετρήσεις με τον ακουστικό βιοαισθητήρα	11
<u>1.4.Διαμοριακές αλληλεπιδράσεις και βιοτεχνολογία</u>	13
<u>1.5.Ακινητοποίηση μορίων σε επιφάνειες βιοαισθητήρων</u>	15
<u>1.6.Σύστημα αβιδίνης - βιοτίνης</u>	16
1.6.1.Γενικά	16
1.6.2.Σταθερότητα του συστήματος αβιδίνης – βιοτίνης	18
1.6.3.Αβιδίνη – Στρεπταβιδίνη – Νουτραβιδίνη	18
1.6.4.Εφαρμογές του συστήματος αβιδίνης – βιοτίνης στον τομέα των βιοαισθητήρων	19
<u>1.7.Πρωτεΐνη IgG και τεχνολογία βιοαισθητήρων</u>	20
<u>2.Σκοπός της παρούσας εργασίας</u>	23
<u>3. Υλικά και Μέθοδοι</u>	24
<u>3.1 Μικροσυσκευή ακουστικού βιοαισθητήρα SAW</u>	25
<u>3.2.Βιοαισθητήρας Love</u>	25
3.2.1.Προετοιμασία βιοαισθητήρα	25
3.2.2.Εναπόθεση χρυσού και χάραξη με χημεία πλάσματος	26

<u>3.3. Πειραματική διάταξη</u>	27
<u>3.4. Ακουστικά πειράματα με πρωτεΐνες</u>	28
<u>3.5. Επιφανειακός Συντονισμός Πλάσματος</u>	28
<u>3.6. Μικροζυγός Κρυσταλλικού Χαλαζία (Q-Sense)</u>	29
<u>3.7. Παρασκευή νιτρο-αβιδίνης</u>	30
<u>3.7.1. Χρωματογραφία συγγένειας</u>	30
<u>3.7.2 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών :</u>	31
3.7.2Α. Σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης	32
3.7.2Β. Σε native πήκτωμα πολυακρυλαμίδης	32
3.7.2Γ. Χρόση του πηκτώματος με κυανό του Coomassie και αποχρωματισμός	33
<u>3.8. Μικροσκοπία Ατομικών Δυνάμεων (AFM)</u>	33
<u>4.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ</u>	34
<u>4.1. Ευαισθησία ακουστικού σήματος, ως προς τη διάταξη του κυματοδηγού</u>	35
<u>4.2.Βαθμονόμηση (calibration) και χαρακτηρισμός των μικροσυσκευών 110MHz και 155MHz του ακουστικού βιοαισθητήρα Love.</u>	38
4.2.1Βαθμονόμηση των μικροσυσκευών 110MHz και 155MHz του ακουστικού βιοαισθητήρα Love.	38
4.2.2. Χαρακτηρισμός της επιφάνειας, των μικροσυσκευών 110MHz και 155MHz του ακουστικού βιοαισθητήρα Love.	39
<u>4.3.Συσχέτιση της ευαισθησίας της ακουστικής μοκροσυσκευής με την συχνότητα λειτουργίας της και το πάχος του κυματοδηγού (PMMA).</u>	41
4.3.1.Πειράματα με μικροσυσκευή 110MHz, PMMA πάχους 2.45μm και 20nm Au	41
4.3.2.Πειράματα με μικροσυσκευή 110MHz, PMMA πάχους 1μm και 20nm Au	44
4.3.2.Πειράματα με μικροσυσκευή 155MHz, PMMA πάχους 0.4μm, 20nm Au και σύγκριση με την μικροσυσκευή 110MHz	49
<u>4.4.Ακουστικά πειράματα με βιοτινυλιωμένο αντι-αντίσωμα IgG σε ακουστικό βιοαισθητήρα Q-sense.</u>	54

<u>4.5.Παρασκευή τροποποιημένης αβιδίνης (νιτρο-αβιδίνης), με σκοπό την αναγέννηση της επιφάνειας</u>	58
<u>5. Συμπεράσματα και Προοπτικές</u>	62
<u>6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</u>	65

Abstract

The aim of this work is to use an acoustic wave sensor to detect the viscoelastic and mass changes on a solid / liquid interface when various concentrations of IgG and BSA are bound to the device surface. Devices which use shear-horizontal surface acoustic waves propagating in a wave guide configuration at 110MHz and 155MHz were, firstly, calibrated and characterized, and then used for the detection of specific binding and adsorption of biotinylated anti-human IgG (150kD) and biotinylated BSA (66kD) to neutravidin-modified surfaces. The detection of the biotinylated protein was in the concentration range of 9nM to 667nM.

In order to calculate the mass of the protein bound to the neutravidin layer, same experiments took place on Qsense instrument, which also tracks mass changes on a piezoelectric surface. Results clearly indicate that the velocity of the acoustic wave (measured as phase) is sensitive to the mass of the bound analyte while the acoustic energy (measured as amplitude) is sensitive to the viscoelasticity of the bound layer, which is related to the shape of the molecules.

Finally, experiments for the regeneration of the neutravidin layer took place.

Περίληψη

Ο στόχος αυτής της εργασίας είναι να χρησιμοποιηθεί ένας βιοαισθητήρας ακουστικών κυμάτων, για την ανίχνευση αλλαγών στην μάζα και τις ιξωδοελαστικές ιδιότητες σε μια μεσεπιφάνεια υγρού-στερεού, όταν σε αυτόν δεσμεύονται διάφορες συγκεντρώσεις IgG και BSA. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε αρχικά βαθμονόμηση και χαρακτηρισμός των ακουστικών μικροσυσκευών 110 και 155MHz, στις οποίες στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανίχνευση των πρωτεϊνών anti-IgG (150kD) και BSA (66kD) σε τροποποιημένες με νουτραβιδίνη επιφάνειες. Για την ανίχνευση των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις από 9nM έως 667nM.

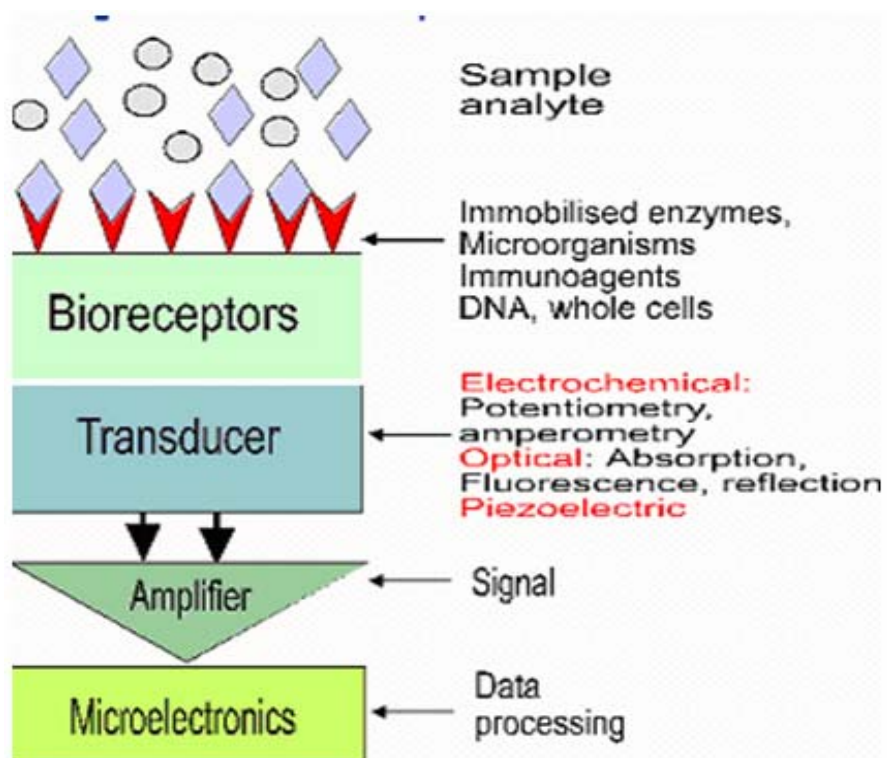
Προκειμένου να υπολογιστεί η μάζα που δεσμεύεται στο στρώμα, της νουτραβιδίνης, τα ίδια πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο όργανο Qsense, το οποίο ακολουθεί επίσης τις αλλαγές της μάζας στις πιεζοηλεκτρικές επιφάνειες. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η ταχύτητα του ακουστικού κύματος (που μετριέται ως φάση) είναι ευαίσθητη στη μάζα του δεσμευμένου στο στρώμα νουτραβιδίνης μορίου, ενώ η ακουστική ενέργεια (που μετριέται ως πλάτος) είναι ευαίσθητη σε αλλαγές των ιξωδοελαστικών ιδιοτήτων του δεσμευμένου βιομορίου, που συσχετίζεται με τη μορφή του μορίου.

Τέλος πραγματοποιήθηκαν πειράματα αναγέννησης της επιφάνειας της νουτραβιδίνης, με σκοπό τη δημιουργία μιας άμεσα επαναχρησιμοποιήσιμης επιφάνειας αβιδίνης, για την εναπόθεση βιοτινυλιωμένων βιολογικών μορίων και την περαιτέρω μελέτη τους.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο βιοαισθητήρας είναι μια αναλυτική συσκευή που μπορεί να μετατρέψει μια βιολογική απόκριση σε ηλεκτρικό σήμα. Χαρακτηρίζεται από τρία τμήματα: 1. το μεταγωγέα (transducer) που μετράει την φυσικοχημική μεταβολή, 2. το ακινητοποιημένο, στην επιφάνεια της μικροσυσκευής, υλικό του αισθητήρα (υποδοχέας) και τέλος 3. το ηλεκτρονικό τμήμα που καταγράφει και εκφράζει (μετρήσεις) το σήμα του μεταγωγέα. Όταν ο αναλύτης για τον οποίο ο υποδοχέας είναι ειδικός βρίσκεται στο διάλυμα, συμβαίνει αλληλεπίδραση μεταξύ τους. Η αλληλεπίδραση αυτή προκαλεί την παραγωγή ενός φυσικοχημικού σήματος που μετατρέπεται μέσω του μεταγωγέα σε ηλεκτρικό σήμα. Το ηλεκτρονικό κομμάτι του βιοαισθητήρα ανιχνεύει το σήμα αυτό (Εικόνα 1).



Εικόνα 1: Αρχή λειτουργίας του βιοαισθητήρα. Ο αναλύτης δεσμεύεται ειδικά με τον υποδοχέα (ακινητοποιημένα ένζυμα, μικροοργανισμοί κ.α). Η σύνδεση αυτή προκαλεί την παραγωγή ενός φυσικοχημικού σήματος που μέσω του μεταγωγέα μετατρέπεται σε ηλεκτρικό.

Πιο συγκεκριμένα οι βιοαισθητήρες ανήκουν σε μια κατηγορία αναλυτικών μικροσυσκευών που ενσωματώνουν βιολογικά μόρια όπως πρωτεΐνες (αντισώματα, ένζυμα), DNA, κύτταρα κ.α, (Turner, A.P.F. et al., 1987) και στην συνέχεια τα συνδέουν με ένα φυσικοχημικό μεταγωγέα. Χαρακτηριστικοί μεταγωγείς είναι οι οπτικοί, οι ακουστικοί, οι ηλεκτροχημικοί, οι καλοριμετρικοί και άλλοι. Το γεγονός ότι την τελευταία δεκαετία έχουν πραγματοποιηθεί μεγάλα βήματα στον χώρο της πληροφορικής που επιτρέπουν την γρήγορη, σωστή και οικονομική μεταφορά πληροφορίας, βοήθησε στην ανάπτυξη των αισθητήρων (Ballantine, D.S., 1997) και την αύξηση του εύρους των εφαρμογών τους (Πίνακας 1).

Εφαρμογές Βιοαισθητήρων	
<u>Εφαρμογές</u>	<u>Παραδείγματα</u>
Ιn vitro διαγνωστικά	Έλεγχος γλυκόζης στο αίμα
Ιn vivo διαγνωστικά	Έλεγχος νεφρικής ανεπάρκειας
Περιβαλλοντικός έλεγχος	Βιοχημικός ανάγκη οξυγόνωσης (Biochemical Oxygen Demand : BOD)
Βιομηχανία Τροφίμων και Ποτών	Σύνθεση & ανάλυση τροφίμων, ανίχνευση παθογόνων οργανισμών
Έλεγχος κατά την επεξεργασία βιολογικού υλικού	Παρακολούθηση και έλεγχος κατά τη ζύμωση
Γεωργία	Συγκομιδή, ασθένειες, θρεπτικές ουσίες και φυτοφάρμακα
Έρευνα & ανάπτυξη	Βιομοριακές αλληλεπιδράσεις
Στρατιωτικές	Ανίχνευση παραγόντων βιολογικών και χημικών όπλων

Πίνακας 1: Παραδείγματα εφαρμογών των βιοαισθητήρων (ιατρική, βιοτεχνολογία, βιομηχανία τροφίμων κ.α.)

Η ανάγκη για άμεση παρατήρηση των αλληλεπιδράσεων βιολογικών μακρομορίων, όπως πρωτεϊνών μεταξύ τους για παράδειγμα η αντίδραση αντιγόνου – αντισώματος (Minunni, M., 1994) ή η υβριδοποίηση DNA (Minunni, M. et al., 2003) είχε ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη της τεχνολογίας των αισθητήρων, που είναι σε θέση να μελετήσουν αντιδράσεις με ένα πιο εξελιγμένο τρόπο και να δώσουν στοιχεία π.χ φυσικοχημικά, για τα βιομόρια που να είναι χαρακτηριστικά της

λειτουργίας τους. Πιο συγκεκριμένα οι βιοαισθητήρες που έχουν αναπτυχθεί κυρίως τα τελευταία πενήντα χρόνια, έχουν προσφέρει σημαντικά στην γρήγορη αλλά και άμεση μελέτη βιοχημικών αντιδράσεων εμφανίζοντας ταυτόχρονα πολλές εμπορικές εφαρμογές (Πίνακας 2).

<u>Ιστορία των βιοαισθητήρων</u>	
1956	Εφεύρεση ηλεκτροδίου του οξυγόνου (από Leland Clark)
1962	Πρώτη περιγραφή βιοαισθητήρα: Αμπερομετρικό ενζυμικό ηλεκτρόδιο για τη γλυκόζη
1969	Ποτενσιομετρικός βιοαισθητήρας : ακινητοποίηση ένζυμου σε ηλεκτρόδιο αμμωνίας για την ανίχνευση ουρίας
1970	Εφεύρεση Ion-Selective Field-Effect Transistor (ISFET)
1972/1975	Εμπορικός βιοαισθητήρας (Yellow Spring Instruments): Βιοαισθητήρας Γλυκόζης
1975	Βιοαισθητήρες ανοσολογικοί και μικροβιακοί: οωαλβουμίνη σε μια εφεύρεση καλωδίων λευκόχρυσου pO ₂ / pCO ₂ optode
1986	Τεχνητό πάγκρεας (Miles)
1980	Αισθητήρας pH για in vivo μετρήσεις αέριων αίματος
1982	Βιοαισθητήρας γλυκόζης (με οπτικές ίνες)
1983	(Surface Plasmon Resonance : SPR)
1984	Αμπερομετρικός βιοαισθητήρας : οξειδάση γλυκόζης & φεροσίνη για την ανίχνευση της γλυκόζης
1987	MediSense ExacTech : βιοαισθητήρας ανίχνευσης γλυκόζης αίματος
1990	Pharmacia Biacore SPR βιοαισθητήρας : εμπορικά διαθέσιμος
1992	ISTAT φορητός αναλυτής αίματος
1998	Βιοαισθητήρας γλυκόζης αίματος FastTake (LifeScan)

Πίνακας 2: Η ιστορία των βιοαισθητήρων από το 1956

1.1.Κατηγορίες Βιοαισθητήρων

1.1.1.Ηλεκτροχημικοί

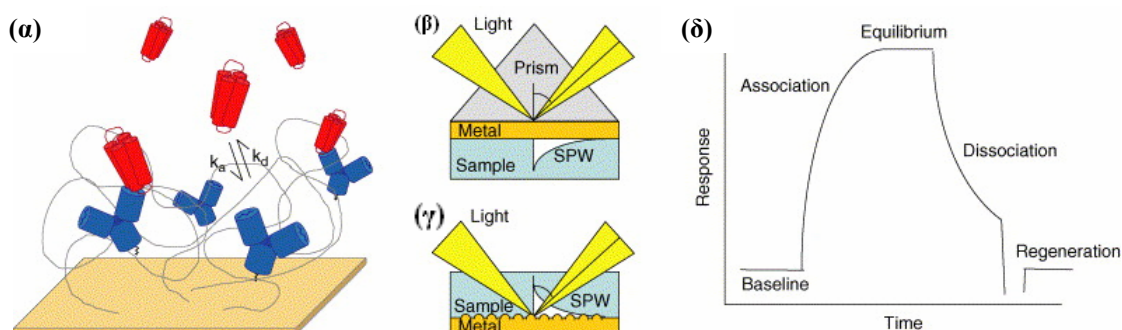
Οι ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες διαχωρίζονται στους ποτενσιομετρικούς και τους αμπερομετρικούς. Οι πρώτοι εκπροσωπούνται συνήθως από επιλεκτικά ηλεκτρόδια ιόντων (ISEs: Ion-Selective Electrodes) και συνιστούν συσκευές, που υπολογίζουν την μεταβολή στην συγκέντρωση ιόντων, μέσω της καταγραφής του δυναμικού, κατά την διάρκεια μιας χημικής αντίδρασης. Υπάρχουν τρεις διαφορετικοί τύποι ηλεκτροδίων που χρησιμοποιούνται γυάλινα pH ηλεκτρόδια, γυάλινα pH ηλεκτρόδια επικαλυμμένα με ειδική διαπερατή μεμβράνη και στερεά ηλεκτρόδια αποτελούμενα από αγώγιμες λεπτές μεμβράνες. Οι ποτενσιομετρικοί βιοαισθητήρες έχουν διάφορες εφαρμογές ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα, είναι η χρήση τους για βακτηριακές αναλύσεις, όπως για την ανίχνευση μολυσματικών παραγόντων (βακτήρια) στο γάλα, με την χρήση του βιοαισθητήρα L-lactase (Skládal, P. et al., 1993).

Οι αμπερομετρικοί βιοαισθητήρες βασίζονται στην χρήση ηλεκτροδίου στο οποίο εφαρμόζεται δυναμικό και το παραγόμενο ρεύμα είναι εκείνο που παρέχει τις πληροφορίες για την σύσταση του δείγματος. Οι βιοαισθητήρες αυτοί έχουν χρησιμοποιηθεί για παράδειγμα για την ανίχνευση *E.coli* στο νερό (Mittelmann, A.S. et al., 2002), για τον προσδιορισμό του φωσφόρου σε συνθετικά απόβλητα (Kwan, R.C. et al., 2005) κ.α.

1.1.2.Οπτικοί

Η αρχή λειτουργίας των οπτικών βιοαισθητήρων βασίζεται είτε στην χρήση οπτικών ινών είτε στην τεχνολογία του επιφανειακού συντονισμού πλάσματος (Surface Plasmon Resonance SPR). Ένα από τα κυριότερα πλεονεκτήματα των οπτικών βιοαισθητήρων είναι η ικανότητα τους για γρήγορη και εξειδικευμένη παρατήρηση, ενώ ένα από τα σημαντικότερα μειονεκτήματα είναι το κόστος τους. Ο επιφανειακός συντονισμός πλάσματος (SPR) είναι μια τεχνολογία που χρησιμοποιείται τα τελευταία 15 χρόνια (Liedberg, et. al. 1983) και παρέχει πληροφορίες που αφορούν την αλληλεπίδραση μεταξύ οποιονδήποτε βιολογικών

μορίων σε πραγματικό χρόνο (real time) π.χ πρόσδεση υποκαταστάτη στον υποδοχέα του (Εικόνα 2).



Εικόνα 2 : Σχηματική απεικόνιση λειτουργίας SPR (Biacore) (Rich R.L. et al., 2004)

(α) : Ακίνητοποίηση υποκατάστατη (αντίσωμα) στη επιφάνεια του βιοαισθητήρα (biosensor chip) και προσθήκη αναλυτή (αντιγόνο),

(β) : SPR βιοαισθητήρας

(γ) : Σύστημα παρακολούθησης και μέτρησης αλληλεπιδράσεων (Affinity Chip Analyzer)

(δ) : Τυπικό διάγραμμα αλληλεπίδρασης : 1. Τυπική απόκριση σταθερότητας οργάνου (baseline),

2. Αλληλεπίδραση υποκατάστατη-αναλυτή (association), 3. Ισορροπία (equilibrium),

4. Αποσύνδεση (dissociation), 5. Καθαρισμός της επιφάνειας με επιθυμητό διάλυμα (regeneration).

Κατά την λειτουργία του οπτικού βιοαισθητήρα, πραγματοποιείται σε πραγματικό χρόνο καταγραφή της αλλαγής του δείκτη διάθλασης που εντοπίζεται στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα, κατά την αλληλεπίδραση βιολογικών μορίων. Επιπρόσθετα στοιχεία για την κινητική της υπό μελέτη αντίδρασης μπορούν να υπολογιστούν όπως σταθερές πρόσδεσης, ισορροπίας κ.α. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν η δημιουργία οπτικού βιοαισθητήρα για την παρακολούθηση της ενεργότητας των φαγοκυττάρων του αίματος (Magrisso, M. et al., 2005) καθώς και της δημιουργίας συστοιχιών τροποποιημένων βακτηριακών κυττάρων (cell array fiber-optic biosensor) μέσω παρακολούθησης έκφρασης μιας σειράς γονιδιακών μαρτύρων τους (Biran, I. et al., 2003).

1.2.Ακουστικοί Βιοαισθητήρες

Οι ακουστικές μικροσυσκευές χρησιμοποιούνται τα τελευταία 60 χρόνια από τις εταιρίες τηλεπικοινωνιών και εμφανίστηκαν ευρέως να χρησιμοποιούνται την τελευταία δεκαετία στην κατασκευή κινητών τηλεφώνων. Οι μικροσυσκευές αυτές είναι ευαίσθητες σε αλλαγές στη μάζα, την πυκνότητα και το ιξώδες. Καθώς το ακουστικό κύμα διαδίδεται είτε στην επιφάνεια της συσκευής (device) είτε σε όλο τον όγκο της, η ταχύτητα, το πλάτος και η συχνότητα του κύματος αλλάζουν. Οι αλλαγές αυτές καταγράφονται σε πραγματικό χρόνο και στην συνέχεια σχετίζονται με κάποια από τις φυσικοχημικές ιδιότητες (μάζα, πυκνότητα ή ιξώδες) του μελετώμενου μορίου.

Οι ακουστικές συσκευές λειτουργούν βασισμένες στην αρχή ότι ένα ακουστικό κύμα που διαδίδεται σε ένα στερεό μέσο προκαλεί την παραμόρφωση του υλικού διάδοσης (Morgan, D.P., 1985). Η παραμόρφωση αυτή πραγματοποιείται όταν οι κινήσεις των ατόμων του υλικού είναι τέτοιες που οι αποστάσεις μεταξύ τους αλλάζουν, γεγονός που συνοδεύεται από δυνάμεις επαναφοράς (αυτές που τείνουν να επαναφέρουν τα άτομα στις αρχικές τους θέσεις). Εάν η παραμόρφωση ενός υλικού είναι χρονικά εξαρτώμενη, η κίνηση κάθε ατόμου του υλικού καθορίζεται αποκλειστικά από τις δυνάμεις επαναφοράς, οι οποίες δημιουργούν μια κυματική κίνηση καθώς το κάθε άτομο ταλαντώνεται γύρω από μια θέση ισορροπίας. Στα περισσότερα υλικά οι δυνάμεις επαναφοράς είναι αναλογικές της παραμόρφωσης, οπότε και αυτά χαρακτηρίζονται ως ελαστικά και τα κύματα που διαδίδονται σε αυτά καλούνται ελαστικά ή ακουστικά κύματα (Serway, R.A., 1990).

Βασική αρχή για την λειτουργία των ακουστικών βιοαισθητήρων είναι η χρήση πιεζοηλεκτρικών υλικών, για την δημιουργία ακουστικών κυμάτων. Η πιεζοηλεκτρικότητα αναφέρεται στη μετατροπή ηλεκτρικής ενέργειας, σε ένα κρύσταλλο, σε μηχανική και αντίστροφα. Η τεχνολογία των ακουστικών βιοαισθητήρων χρησιμοποιεί ένα εναλλασσόμενο ηλεκτρικό πεδίο για την δημιουργία του ακουστικού (μηχανικού) κύματος, το οποίο διαδίδεται στο υπόστρωμα και μετατρέπεται σε ηλεκτρικό, προς μέτρηση, σήμα. Τα πιεζοηλεκτρικά υλικά που χρησιμοποιούνται είναι κυρίως ο χαλαζίας (SiO_2), το οξειδίο λιθίου-τανταλίου (LiTaO_3) και το οξειδίο λιθίου-νιοβίου (LiNbO_3).

Οι ακουστικές μικροσυσκευές κατηγοριοποιούνται με βάση τον τρόπο διάδοσης του ακουστικού κύματος. Όταν η διάδοση του ακουστικού κύματος

πραγματοποιείται σε όλο τον όγκο του υλικού της μικροσυσκευής τότε πρόκειται για το ακουστικό κύμα όγκου (Bulk Acoustic Wave - BAW), (Cady, 1924) σε αυτή την κατηγορία μικροσυσκευών ανήκει και ο μικροζυγός κρυσταλλικού χαλαζία (Quartz Crystal Microbalance - QCM). Όταν η διάδοση του ακουστικού κύματος περιορίζεται στην επιφάνεια του υποστρώματος τότε δημιουργείται το ακουστικό κύμα επιφάνειας (Surface Acoustic Wave - SAW), (Dieulesaint and Royer, 1980).

Εν κατακλείδι θα μπορούσαμε να αναφέρουμε ότι οι ακουστικές μικροσυσκευές SAW εμφανίζονται περισσότερο ευαίσθητες σε αντιδράσεις που πραγματοποιούνται στην επιφάνεια του αισθητήρα σε σχέση με τις BAW καθώς και γιατί χρησιμοποιούν ακουστικά κύματα υψηλότερης συχνότητας (110MHz και 155MHz) (Gizeli, E., et al., 1992) από ότι οι BAW (5MHz έως 35MHz) (www.qsense.com). Επιπρόσθετα η κατασκευή των SAW από χαλαζία τους καταστά αρκετά οικονομικούς, καθώς το υλικό αυτό δεν βρίσκεται μόνο σε μεγάλες ποσότητες στην φύση αλλά ταυτόχρονα η συνθετική παρασκευή του είναι ιδιαίτερα υψηλής ποιότητας σε συνδυασμό με χαμηλό κόστος. Στις περιπτώσεις που για την κατασκευή της μικροσυσκευής δεν χρησιμοποιείται χαλαζία, αλλά οξείδιο λιθίου-τανταλίου (LiTaO_3) ή το οξείδιο λιθίου-νιοβίου (LiNbO_3) η ευαισθησία είναι υψηλότερη σε σχέση με τον χαλαζία, αλλά το κόστος είναι αρκετά υψηλό.

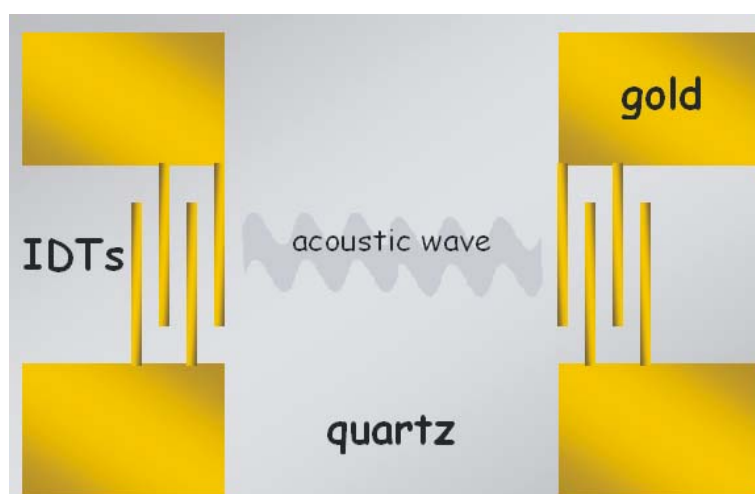
1.3.Ακουστικός Βιοαισθητήρας κύματος Love

1.3.1Ακουστική μικροσυσκευή SAW

Οι μικροσυσκευές κύματος Love, βασίζονται στο κύμα Love (Love, A.E.H., 1911), που περιορίζεται στην επιφάνεια του αισθητήρα (White, R.M, 1970) και καταγράφουν σε πραγματικό χρόνο φυσικοχημικές αλλαγές που πραγματοποιούνται, κατά την διάρκεια χημικών αντιδράσεων (ανίχνευση αλληλεπίδρασης βιολογικών μορίων).

Ο ακουστικός βιοαισθητήρας SAW είναι μια μικροσυσκευή αποτελούμενη από ένα κομμάτι χαλαζία πάνω στο οποίο εναποτίθενται ηλεκτρόδια από χρυσό. Κάθε ηλεκτρόδιο αποτελείται από ένα σύμπλεγμα δύο πανομοιότυπων σχηματομορφών και κάθε σχηματομορφή περιλαμβάνει μία πλάκα χρυσού από την οποία ξεκινούν ράβδοι χρυσού σε καθορισμένη απόσταση μεταξύ τους και σχηματίζουν ένα πλέγμα με τις ράβδους από την απέναντι σχηματομορφή (Εικόνα 3). Τα ηλεκτρόδια αυτά

ονομάζονται αλληλοδιαπλεκόμενοι μεταγωγείς (Interdigitated Transducers - IDTs). Η εφαρμογή διαφοράς δυναμικού ανάμεσα στα άκρα των IDTs έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία εναλλασσόμενου ρεύματος με επακόλουθη την δημιουργία ακουστικού κύματος επιφάνειας (SAW), εξαιτίας του πιεζοηλεκτρικού φαινομένου. Πιο συγκεκριμένα το ακουστικό κύμα SAW είναι ένα εγκάρσιο κύμα (SH - SAW) το οποίο διαδίδεται στην επιφάνεια της συσκευής και κάθετα στην διεύθυνση διάδοσης δηλαδή, κάθετα στην διεύθυνση της ταχύτητας του κύματος. Το ακουστικό κύμα στη συνέχεια διαδίδεται κατά μήκος του αισθητήρα και φτάνοντας στο άλλο άκρο του μετριέται ως ηλεκτρικό σήμα. Το μήκος του ακουστικού κύματος λ , καθορίζεται από την απόσταση μεταξύ των αλληλοδιαπλεκόμενων μεταγωγέων (IDTs) και η συχνότητα λειτουργίας της συσκευής καθορίζεται τόσο από την εγκάρσια ταχύτητα διάδοσης του κύματος όσο και από το μήκος κύματος. Αυξανόμενη της συχνότητας λειτουργίας του βιοαισθητήρα πραγματοποιείται και αύξηση της ευαισθησίας του, καθώς σε υψηλότερες συχνότητες το ακουστικό κύμα καθοδηγείται πλησιέστερα προς την επιφάνεια (Gizeli, E. et al., 2003) .



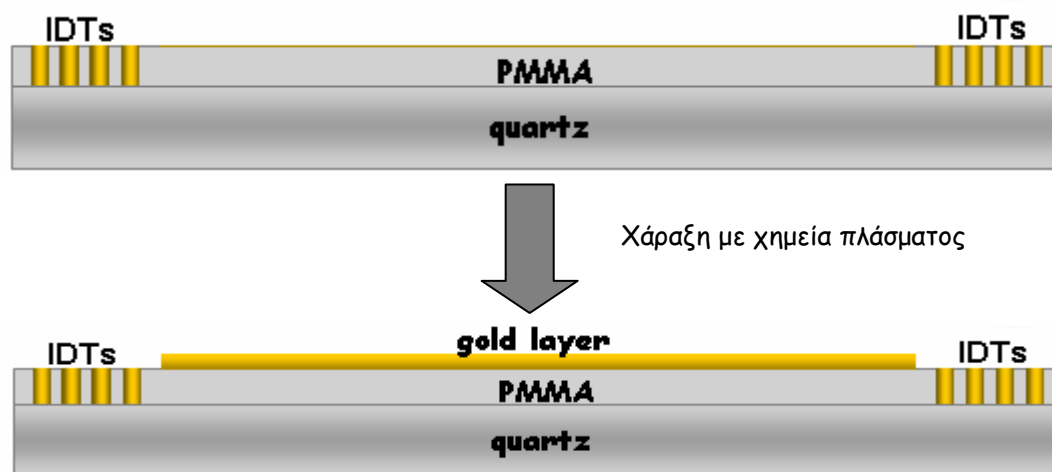
Εικόνα 3: Σχηματική απεικόνιση ακουστικού βιοαισθητήρα κύματος Love . Πάνω στο χαλαζία τοποθετούνται αλληλοδιαπλεκόμενοι μεταγωγείς (IDTs) στους οποίους εφαρμόζεται διαφορά δυναμικού, με αποτέλεσμα την δημιουργία ηλεκτρικού πεδίου και την επακόλουθη παραγωγή ακουστικού κύματος.

1.3.2. Προσθήκη κυματοδηγού

Κατά την διάδοση ενός εγκάρσιου ακουστικού κύματος, κατά μήκος του πιεζοηλεκτρικού υλικού μιας μικροσυσκευής SAW, μέρος της ενέργειας χάνεται με την μορφή BAW, με αποτέλεσμα το κύμα να μην είναι απόλυτα οριζόντιο. Η προσθήκη στην επιφάνεια της μικροσυσκευής, ακουστικού κυματοδηγού (waveguide), συνήθως κάποιου πολυμερούς, που χαρακτηρίζεται από μικρότερη ταχύτητα διάδοσης του ακουστικού κύματος από αυτή του υποστρώματος καθώς και από υψηλή διηλεκτρική σταθερά, έχει ως αποτέλεσμα την παγίδευση της ενέργειας στην επιφάνεια της μικροσυσκευής. Το γεγονός αυτό καθιστά τον αισθητήρα ιδιαίτερα ευαίσθητο κατά την διάρκεια της μελέτης μιας βιολογικής αντίδρασης που πραγματοποιείται στην επιφάνεια του αισθητήρα. Μετά την προσθήκη του κυματοδηγού το παραγόμενο κύμα εξακολουθεί να είναι ένα εγκάρσιο επιφανειακό κύμα κάθετο στη διεύθυνση διάδοσης.

Το πάχος του στρώματος του κυματοδηγού είναι σημαντικό μιας και καθορίζει την ευαισθησία του βιοαισθητήρα. Πιο συγκεκριμένα αν η ταχύτητα διάδοσης στον κυματοδηγό είναι χαμηλή και το πάχος του κυματοδηγού λεπτό παρατηρείται υψηλή ταχύτητα διάδοσης, που πλησιάζει αυτή του υποστρώματος, με αποτέλεσμα τη μικρή μεταβολή της συχνότητας και την υψηλή ευαισθησία ως προς την ανίχνευση της προσροφώμενης, στην επιφάνεια της μικροσυσκευής, μάζας (Gizeli, E. et al., 2003).

Αναλυτικότερα πάνω στο στρώμα του κυματοδηγού (PMMA), τοποθετήθηκε ένα στρώμα χρυσού, για την προσρόφηση των επιθυμητών βιομορίων (Ebersole, R.C. et al., 1990) όπως φαίνεται χαρακτηριστικά και στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 4).



Εικόνα 4: Χαρακτηριστικά στρώματα του ακουστικού βιοαισθητήρα. Πάνω από το χαλαζία και τα IDTs τοποθετείται το στρώμα του κυματοδηγού (PMMA) και στην συνέχεια ένα στρώμα χρυσού, για την προσρόφηση βιομορίων.

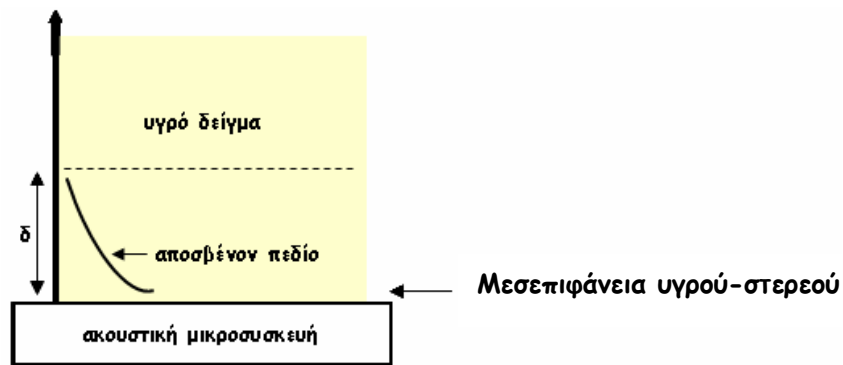
1.3.3.Ιδιότητες ακουστικού κύματος και μετρήσεις με τον ακουστικό βιοαισθητήρα

Η λειτουργία των ακουστικών βιοαισθητήρων βασίζεται στην αρχή του ότι η μάζα που εναποτίθεται στην επιφάνεια της μικροσυσκευής θα ταλαντώνεται ταυτόχρονα με την επιφάνεια της, με την εφαρμογή του ακουστικού κύματος, γεγονός που θα οδηγήσει σε αλλαγή του σήματος του κύματος αυτού. Απαραίτητη προϋπόθεση για την δημιουργία ενός κύματος Love είναι η εγκάρσια ταχύτητα της επιφάνειας του βιοαισθητήρα να είναι μικρότερη από ότι την εγκάρσια ταχύτητα του ελαστικού μέσου. Καθώς το κύμα διαδίδεται στην επιφάνεια, η ενέργεια του εντοπίζεται στην επιφάνεια της συσκευής και μάλιστα στο τμήμα του υποστρώματος που βρίσκεται πλησιέστερα στη μεσεπιφάνεια.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω το εναλλασσόμενο ρεύμα εφαρμόζεται στους αλληλοδιαπλεκόμενους μεταγωγείς (IDTs) του ενός άκρου της μικροσυσκευής, οπότε και παράγεται ένα οριζόντιο ακουστικό κύμα στην επιφάνεια, λόγω του πιεζοηλεκτρικού φαινομένου το οποίο καταγράφεται από το δεύτερο IDT στο άλλο άκρο της μικροσυσκευής. Το ακουστικό κύμα που διαδίδεται στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα, όταν έρχεται σε επαφή με το υγρό στη μεσεπιφάνεια υγρού – στερεού, προκαλεί την ταλάντωση στο σώμα του υγρού. Έτσι, δημιουργείται ένα αποσβένον πεδίο (evanescent acoustic field). Το αποσβένον πεδίο εξαρτάται κυρίως από το ιξώδες, την πυκνότητα του διαλύματος αλλά και από την συχνότητα του ακουστικού κύματος. Το βάθος διείσδυσης του ακουστικού κύματος δ (penetration depth) δίνεται από τον παρακάτω τύπο :

$$\delta = \sqrt{\frac{2\eta}{2\pi\rho f}} \quad \text{ή} \quad \boxed{\text{όπου } \omega=2\pi f} \quad \delta = \sqrt{\frac{2\eta}{\rho\omega}}$$

όπου η και ρ είναι το ιξώδες και η πυκνότητα του διαλύματος, f η συχνότητα του ακουστικού κύματος με το οποίο ταλαντώνεται το υγρό δείγμα στην επιφάνεια της μικροσυσκευής και ω η γωνιακή ταχύτητα (Εικόνα 5).



Εικόνα 5: Σχηματική αναπαράσταση της μεσεπιφάνειας υγρού – στερεού, του βάθους διείσδυσης του ακουστικού κύματος δ και του αποσβένοντος ακουστικού πεδίου.

Αλλαγές στις ιδιότητες του υγρού που έρχεται σε επαφή με την επιφάνεια του αισθητήρα, μέσα στο αποσβένον πεδίο, προκαλούν μεταβολή σε μια σειρά χαρακτηριστικών διάδοσης του κύματος. Οι αλλαγές των ιδιοτήτων του υγρού αφορούν την μάζα που εναποτίθεται στην επιφάνεια, το ιξώδες και την πυκνότητα του διαλύματος και τις ηλεκτρικές ιδιότητες της επιφάνειας (Gizeli, E. and Lowe, C., 2002). Αναφορικά με τις ηλεκτρικές ιδιότητες της επιφάνειας, πιθανά να επηρεάζονται από ιόντα και δίπολα μόρια του υγρού δείγματος.

Από τον παραπάνω τύπο γίνεται εμφανές ότι οι αλλαγές στην συχνότητα του ακουστικού κύματος επηρεάζουν το βάθος διείσδυσης δ του κύματος άρα και την ευαισθησία της μικροσυσκευής. Χαρακτηριστικό γνώρισμα όλων των ακουστικών αισθητήρων είναι ότι με την αύξηση της συχνότητας λειτουργίας της μικροσυσκευής παρατηρείται και αύξηση του ακουστικού σήματος. Αναλυτικότερα αύξηση της συχνότητας οδηγεί σε ελάττωση του βάθους διείσδυσης του κύματος, γεγονός που ισοδυναμεί σε αύξηση της ευαισθησίας της μικροσυσκευής. Για τον παραπάνω λόγο μια μικροσυσκευή SAW με συχνότητα λειτουργίας 155MHz είναι πιο ευαίσθητη από μια με συχνότητα λειτουργίας 110 MHz καθώς το βάθος διείσδυσης του κύματος είναι μικρότερο και το κύμα διαδίδεται περισσότερο στην επιφάνεια του αισθητήρα.

Ο ακουστικός βιοαισθητήρας συνδέεται με έναν αναλυτή δικτύου (network analyzer, (Εικόνα 6) με τον οποίο εφαρμόζεται εναλλασσόμενη τάση στη μικροσυσκευή και συλλέγονται οι μετρήσεις των ιδιοτήτων του ακουστικού κύματος. Οι μετρήσεις αυτές σχετίζονται με την ταχύτητα διάδοσης του κύματος αλλά και την ενέργεια του. Οι αλλαγές στην ταχύτητα διάδοσης του κύματος καταγράφονται ως αλλαγές στη φάση του κύματος που μετρούνται σε degrees. Πιο συγκεκριμένα η φάση είναι ευαίσθητη σε μεταβολές κυρίως της μάζας αλλά και της

ιξωδοελαστικότητα και των ηλεκτρικών ιδιοτήτων της μεσεπιφάνειας υγρού-στερεού. Όσον αφορά τις μεταβολές στην ενέργεια του κύματος καταγράφονται ως μεταβολές στο πλάτος του κύματος, που μετρούνται σε dB. Το πλάτος του κύματος είναι ευαίσθητο σε μεταβολές της ιξωδοελαστικότητας και των ηλεκτρικών ιδιοτήτων της μεσεπιφάνειας υγρού-στερεού.

Εικόνα 6: Αναλυτής δικτύου (network analyzer) Agilent Technologies E5061A



Ο αναλυτής δικτύου είναι συνδεδεμένος εκτός από την μικροσυσκευή και με ένα ηλεκτρονικό υπολογιστή όπου πραγματοποιείται η καταγραφή των μεταβολών στην φάση και το πλάτος του κύματος.

1.4. Διαμοριακές αλληλεπιδράσεις και βιοτεχνολογία

Ένα πολύ σημαντικό κομμάτι στον τομέα της Βιοτεχνολογίας αποτελεί η μελέτη των διαμοριακών επαφών, έτσι ώστε να ανακαλυφθεί πια μόρια αλληλεπιδρούν, πως αλληλεπιδρούν (πιο τμήμα των μορίων συμμετέχει στην αλληλεπίδραση και πια είναι η βιοφυσική της) και τέλος ποιες είναι οι λειτουργικές επιπτώσεις αυτών των αλληλεπιδράσεων. Η επιστήμη της Βιολογίας έχει αναπτύξει διάφορα εργαλεία για την μελέτη τέτοιων αλληλεπιδράσεων.

Αναλυτικότερα στον τομέα της γενετικής δύο χαρακτηριστικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται είναι το σύστημα δύο υβριδίων (yeast 2-hybrid) που είναι ένα εργαλείο που χρησιμοποιεί την μεταγραφική ενεργότητα ως μέτρο για την μελέτη πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων και το phage display (Phizcky, E.M., 1995). Πιο συγκεκριμένα η λειτουργία του συστήματος των δύο υβριδίων βασίζεται στη φύση εξειδικευμένων μεταγραφικών ενεργοποιητών που διαθέτουν μια περιοχή πρόσδεσης στο DNA, που συντήκεται με μία εκ των δύο προς μελέτη πρωτεϊνών και μια περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης, με την οποία συντήκεται η άλλη πρωτεΐνη. Τα δύο παραπάνω υβρίδια εκφράζονται σε κύτταρα που διαθέτουν γονίδια αναφοράς και στην περίπτωση που οι χιμαιρικές πρωτεΐνες αλληλεπιδράσουν, δημιουργώντας ένα

λειτουργικό μεταγραφικό ενεργοποιητή, αυτό ανιχνεύεται μέσω της έκφρασης των γονιδίων αναφοράς. Αναφορικά με το phage display πρόκειται για μια τεχνική κατά την οποία φάγοι εκφράζουν χμιαϊκές πρωτεΐνες με ξένα πεπτίδια στην επιφάνεια τους. Τα πεπτίδια αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την μελέτη αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών ή μεταξύ πρωτεϊνών και πεπτιδίων π.χ πεπτιδίων και αντισωμάτων (Smith, G.P., 1985). Στον τομέα της βιοχημείας οι διαμοριακές αλληλεπιδράσεις μπορεί να παρατηρηθούν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα native, όπου είναι δυνατός ο εντοπισμός πρωτεϊνικών ετέρων-συμπλόκων καθώς οι συνθήκες του πηκτώματος δεν είναι αποδιατακτικές (Peris, M. et al., 1997) αλλά και με ενζυμικές δοκιμές π.χ. η μέθοδος ELISA, όπου η αλληλεπίδραση μεταξύ πρωτεϊνών έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή έγχρωμου προϊόντος (Immunology, 2002).

Τέλος στον τομέα της βιοφυσικής οι βιοαισθητήρες είναι μια τεχνολογία που έχει χρησιμοποιηθεί για την μελέτη διαμοριακών αλληλεπιδράσεων, καθώς διαθέτει δύο βασικά χαρακτηριστικά που την διαφοροποιούν από τις τεχνικές που αναφέρθηκαν παραπάνω, δεν απαιτεί σήμανση των βιομορίων (label free) και οι αλληλεπιδράσεις παρατηρούνται σε πραγματικό χρόνο (real time). Οι βιοαισθητήρες έχουν χρησιμοποιηθεί για την μελέτη αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνικών μορίων σε τροποποιημένες επιφάνειες (με πολυμερή, χρυσό κ.α.) χαλαζία, και ανήκουν στην κατηγορία των ακουστικών βιοαισθητήρων (Gizeli, E., 1997) για την μελέτη πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων αλλά και αλληλεπιδράσεων DNA-πρωτεϊνών με επιφανειακό συντονισμό πλάσματος (Mernagh, D.R. et al., 1998, Sota, H. et al., 1998) κ.α. Οι πληροφορίες από την χρήση τέτοιων τεχνολογιών έχουν διάφορες εφαρμογές, χαρακτηριστικό παράδειγμα η ανάπτυξη αισθητήρων για την δημιουργία συστοιχιών αντισωμάτων (antibody arrays), (Egelhofer, 2004, www.gla.ac.uk).

1.5.Ακίνητοποίηση μορίων σε επιφάνειες βιοαισθητήρων

Υπάρχουν πέντε τουλάχιστον τρόποι ακίνητοποίησης βιολογικών μορίων πάνω σε επιφάνειες βιοαισθητήρων :

1. Η προσρόφηση, κατά την οποία τα μόρια προσροφώνται στην επιφάνεια με τυχαίο προσανατολισμό. Η μελέτη του τρόπου προσρόφησης βιολογικών μορίων π.χ, DNA και πρωτεϊνών έχει γίνει αντικείμενο έντονης μελέτης τις τελευταίες δεκαετίες. Σύμφωνα με τους Sandwick, R.K., και Schray, K.J., (1988), σε αρκετά συστήματα έχει παρατηρηθεί πως η δομή της προσροφημένης, σε μια επιφάνεια, πρωτεΐνης διατηρείται σημαντικά. Οι παραπάνω αναφέρουν ως παράδειγμα την ενζυμική δραστικότητα πρωτεϊνικών μορίων που φαίνεται να διατηρείται και να εξαρτάται άμεσα από την φύση του ενζύμου αλλά και από τη συγκέντρωση με την οποία αυτό φορτώνεται στην επιφάνεια. Σε μια άλλη μέθοδο, οι πρωτεΐνες σημαίνονται με ραδιενεργά ισότοπα και χρησιμοποιούνται για τον ποσοτικό προσδιορισμό της προσρόφησης πρωτεϊνών σε μια επιφάνεια (απαραίτητη προϋπόθεση η σήμανση να μην επηρεάζει την προσρόφηση στην επιφάνεια). Για την ανίχνευση των προσροφημένων πρωτεϊνών χρησιμοποιείται αυτόραδιογραφία (Lin, et. al. 1992). Έχουν αναπτυχθεί διάφορες τεχνικές για την μελέτη προσρόφησης βιολογικών μορίων σε επιφάνειες όπως η ελιψομετρία (Wahlren, M., et al., 1995; Lee, S.-W., and Laibinis, P.E., 1998), η μικροσκοπία ατομικών δυνάμεων (Sagvolden, S., et al., 1998; Dupont-Gillain C.C., and Rouxhet, R.G., 2001) και ο κυκλικός διχρωσμός (CD) (Tanaka, M. et al. 2000).
2. Η σύνδεση μέσω σταυροειδούς πλέγματος (cross-linking), όπου τα μόρια συνδέονται μεταξύ τους μέσω χημικών δεσμών.
3. Η παγίδευση, όπου τα μόρια προσδέονται σε ένα εξειδικευμένο δίκτυο (gel network). Η παγίδευση του κυτοχρώματος c (cyt c) σε gel οξειδίου του πυριτίου (silica gel matrix) (Dane, et al., 1997) και η ακίνητοποίηση της λυσοζύμης, α-λακταλβουμίνης και άλλων

πρωτεϊνών για την μελέτη της σταθερότητας τους σε gel οξειδίου του πυριτίου (Eggers, et al., 2001) αποτελούν τέτοια παραδείγματα.

4. Η ομοιοπολική δέσμευση, μεταξύ της επιφάνειας και των βιολογικών μορίων. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η ομοιοπολική σύνδεση αντισωμάτων μέσω ακινητοποιημένων και ενεργοποιημένων ομάδων βρωμιούχου κυανίου (CNBr) για την δημιουργία ενός βιοαισθητήρα οξειδάσης της γλυκόζης (Wessa, T. et al., 1998).
5. Η σύνδεση μέσω του δεσμού αβιδίνης – βιοτίνης. Η αβιδίνη είναι μια θετικά φορτισμένη πρωτεΐνη, η οποία διαθέτει τέσσερις θέσεις πρόσδεσης, κάθε μια για ένα μόριο της βιταμίνης βιοτίνης. Η δεσμοί μεταξύ βιοτίνης – αβιδίνης, παρότι δεν είναι ομοιοπολικοί, είναι ισχυροί και μη αναστρέψιμοι ($k_a = 10^{15} \text{ M}^{-1}$).

1.6.Σύστημα αβιδίνης - βιοτίνης

1.6.1.Γενικά

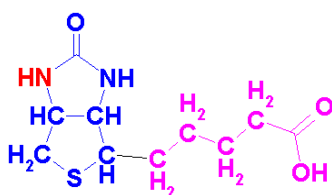
Το σύστημα αβιδίνης - βιοτίνης ξεκίνησε να μελετάται το 1927, προσανατολισμένο κυρίως στη λειτουργία της βιοτίνης, οπότε και παρατηρήθηκε ότι αρουραίοι που σιτίζονταν με μεγάλη ποσότητα ωλευκοματίνης εμφάνιζαν δερματίτιδα, γεγονός που υποδήλωνε υποσιτισμό (Boas, M.A., 1927). Περίπου δύο δεκαετίες μετά η βιταμίνη **H** αναγνωρίστηκε ως βιοτίνη (Vigneaud et al., 1940), οπότε η παρουσία της δερματίτιδας αποδόθηκε στην έλλειψη της. Από την άλλη η αβιδίνη, μια πρωτεΐνη που εντοπίστηκε στην ωλευκοματίνη και εμφάνιζε υψηλή συγγένεια για την βιοτίνη (Gyorgy, P. et al., 1941) εμπλεκόταν στις διατροφικές διαταραχές που αναφέρθηκαν παραπάνω, ενώ λίγο αργότερα η κρυσταλλική δομή της αβιδίνης ερχόταν να επιβεβαιώσει την υψηλή χημική της συγγένεια με την βιοτίνη (Pennington, P. et al., 1942).

Η παρατήρηση της σύνθεσης βιοτίνης έδωσε την δυνατότητα στο σύστημα αβιδίνης – βιοτίνης να χρησιμοποιηθεί ως ερευνητικό εργαλείο (Eakin R.E. et al., 1941). Από τότε και μετά πραγματοποιήθηκαν μια σειρά από ερευνητικές και πειραματικές μελέτες βασισμένες στο σύστημα αυτό, όπως η δημιουργία

βιοτινιλιωμένων βακτηριοφάγων για διαγνωστικούς σκοπούς (Becker, J.M. et al., 1972), η ειδική χρώση βιολογικών μεμβρανών, όπου το σύστημα χρησιμοποιήθηκε ως ανιχνευτής για την μελέτη βιολογικών μεμβρανών με την χρήση της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας (Heitzmann, H. and Richards F.M., 1974), για την απομόνωση μεγάλου μήκους dsDNA με κωδικές αλληλουχίες (Pellegrini, M., et al., 1977) κ.α.

Αναλυτικότερα όσον αφορά την αβιδίνη, πρόκειται για μια τετραμερή γλυκοπρωτεΐνη με τέσσερις πανομοιότυπες υπομονάδες και με μοριακό βάρος 67.000Daltons. Το ισοηλεκτρικό της σημείο είναι το 10 (pI= 10) και κρυσταλλώνεται σε διαλύματα με υψηλή περιεκτικότητα σε άλατα και τιμές του pH μεταξύ 5 και 7. Η γλυκοπρωτεΐνη αυτή είναι διαλυτή σε υδατικά διαλύματα, παραμένει σταθερή κάτω από μια σειρά διαφορετικών συνθηκών pH και θερμοκρασίας (Green, N.M., 1975) και διαθέτει μια δισουλφιδική γέφυρα ανά υπομονάδα η οποία δεν εμφανίζεται να παίζει σημαντικό ρόλο στον δεσμό της με την βιοτίνη. Εκτός από την γλυκοζυλιωμένη μορφή της αβιδίνης έχει αναγνωριστεί και η απογλυκοζυλιωμένη, η οποία διαχωρίζεται από την προηγούμενη με απόδιατακτικό gel πολυακρυλαμίδης, δίνοντας δύο μπάντες με αντίστοιχα μοριακά βάρη 18KD και 15KD (Hiller et al., 1987). Και οι δύο αυτές μορφές αβιδίνης εμφανίζουν την ίδια ενεργότητα, ως προς την ικανότητα τους να αλληλεπιδρούν με την βιοτίνη .

Η βιοτίνη απ' την άλλη, όπως ήδη αναφέρθηκε παραπάνω, είναι μια φυσική βιταμίνη που εντοπίζεται σε κάθε κύτταρο, καθώς είναι απαραίτητη για το μεταβολισμό των λιπιδίων και των υδατανθράκων λειτουργώντας ως συνένζυμο στη λιπογένεση, τη γλυκονεογένεση και τον καταβολισμό των διακλαδισμένων αμινοξέων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι οι αρκετοί ιστοί θηλαστικών οι οποίοι εμφανίζουν μεγάλη περιεκτικότητα σε βιοτίνη όπως το ήπαρ, το πάγκρεας και τα νεφρά. Πρόκειται για μια χημική ένωση με μοριακό τύπο $C_{10}H_{16}N_2O_3S$, μοριακό βάρος 244.31 Daltons και ισοηλεκτρικό σημείο 3.5 (Σχήμα 1).



Σχήμα 1: Ο συντακτικός τύπος της βιοτίνης.

1.6.2. Σταθερότητα του συστήματος αβιδίνης – βιοτίνης

Το σύστημα αβιδίνης - βιοτίνης έχει αποδειχθεί ως ένα από τα σημαντικότερα εργαλεία στις βιολογικές επιστήμες. Ο κύριος λόγος που το σύστημα αυτό εμφανίζεται να είναι πολύ ενδιαφέρον αφορά κατά πρώτον την υψηλή τους συγγένεια, που χαρακτηρίζεται με μια σταθερά $K_a = 10^{15} \text{ M}^{-1}$, που είναι και η πιο υψηλή που εμφανίζεται μεταξύ μιας πρωτεΐνης και του συνδέτη της και κατά δεύτερον το ότι το σύστημα αυτό έχει γίνει καθολικό εργαλείο σε πολλές βιοτεχνολογικές εφαρμογές.

Ο δεσμός αβιδίνης - βιοτίνης χαρακτηρίζεται από υψηλή ταχύτητα σχηματισμού και το σχηματιζόμενο σύμπλοκο πρωτεΐνης – βιταμίνης παραμένει σταθερό κάτω από μια σειρά δυσμενών συνθηκών. Οι συνθήκες αυτές σχετίζονται με την παρουσία οργανικών διαλυτών, αποδιατακτικών παραγόντων, μεταβολών της θερμοκρασίας και του pH αλλά και την παρουσία πρωτεολυτικών ενζύμων (Ross, S.E. et al., 1986, Green, N.M., 1975). Ενώ η ελεύθερη βιοτίνη απενεργοποιείται στους 85°C , το σύμπλοκο αβιδίνης – βιοτίνης απενεργοποιείται στους 132°C γεγονός που φανερώνει την ανθεκτικότητα του σε υψηλές θερμοκρασίες. Ταυτόχρονα όπως έχει αναφερθεί, το σύμπλοκο εμφανίζει ιδιαίτερη σταθερότητα σε αλλαγές του pH, αξιοπρόσεχτο είναι ότι ο δεσμός αβιδίνης – βιοτίνης δεν επηρεάζεται σημαντικά όταν οι τιμές του pH κυμαίνονται μεταξύ 2 και 13. Έξω από αυτά τα όρια παρατηρείται απελευθέρωση της βιοτίνης λόγω αποδιάταξης της αβιδίνης.

1.6.3. Αβιδίνη – Στρεπταβιδίνη – Νουτραβιδίνη

Εκτός από την αβιδίνη χρησιμοποιούνται άλλα δύο πρωτεϊνικά μόρια για την δημιουργία συμπλόκου με την βιοτίνη, η στρεπταβιδίνη (streptavidin) και η νουτραβιδίνη (neutravidin). Η στρεπταβιδίνη είναι μια πρωτεΐνη που δεσμεύει τη βιοτίνη και απομονώθηκε από καλλιέργειες του μύκητα *Streptomyces avidinii*, αποτελείται από τέσσερις υπομονάδες, έχει μοριακό βάρος 75,000 Daltons και pI = 5.5. Η σύγκριση στρεπταβιδίνης και αβιδίνης σε αμινοξικό επίπεδο έδειξε ότι, και οι δύο εμφανίζουν υψηλή συγγένεια για την βιοτίνη καθώς διαθέτουν συντηρημένες αλληλουχίες τρυπτοφάνης – λυσίνης, που παίζουν σημαντικό ρόλο στην δημιουργία του συμπλόκου πρωτεΐνης – βιοτίνης (Gitlin, G. et al., 1988) αλλά διαφέρουν στην

υπόλοιπη αλληλουχία τους. Άλλες διαφορές μεταξύ των δύο μορίων εντοπίζονται στο μοριακό τους βάρος, το ισοηλεκτρικό σημείο, την παρουσία στην αβιδίνη και απουσία στην στρεπταβιδίνη υδατάνθρακα κ.α.

Αναφορικά με την νουτραβιδίνη, η οποία χρησιμοποιήθηκε για την διεκπεραίωση της παρούσας εργασίας, είναι μια πρωτεΐνη που σχηματίζει, όπως και οι παραπάνω, δεσμό με την βιοτίνη με την οποία εμφανίζει συγγένεια όμοια με εκείνη που παρατηρείται για την αβιδίνη. Το βασικότερο πλεονέκτημα της είναι η ελαχιστοποίηση των μη ειδικών αλληλεπιδράσεων, όποτε και αποτελεί την πιο κατάλληλη επιλογή σε σύγκριση με την αβιδίνη και την στρεπταβιδίνη. Πρόκειται για ένα τροποποιημένο μόριο αβιδίνης το οποίο δεν διαθέτει, όπως και η στρεπταβιδίνη, υδατάνθρακα, είναι απογλυκοζυλιωμένη, με $pI = 6.3 \pm 0.3$, και εμφανίζει υψηλή σταθερότητα.

1.6.4.Εφαρμογές του συστήματος αβιδίνης – βιοτίνης στον τομέα των βιοαισθητήρων

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω το σύστημα αβιδίνης – βιοτίνης έχει αναχθεί σε ένα καθολικό εργαλείο, το οποίο έχει πλέον ευρείες εφαρμογές σε πολλούς ερευνητικούς τομείς, μεταξύ των οποίων και αυτός των βιοαισθητήρων.

Το σύστημα αβιδίνης - βιοτίνης έχει χρησιμοποιηθεί κατά κόρον σε όλα τα είδη των βιοαισθητήρων, γεγονός που γίνεται αντιληπτό από τα παραδείγματα που παρατίθενται στην συνέχεια. Αναλυτικότερα, το σύστημα έχει χρησιμοποιηθεί στους ηλεκτροχημικούς βιοαισθητήρες και πιο συγκεκριμένα στους αμπερομετρικούς βιοαισθητήρες της ακετυλοχολίνης, όπου συνέβαλε στην δημιουργία και βελτιστοποίηση των συνθηκών λειτουργίας τους, μέσω της ακινητοποίησης των βιοτινυλιωμένων ενζύμων εστεράση και οξειδάση της χολίνης σε επιφάνειες αβιδίνης (Chen, Q. et al., 1997, Garguilo, G., et al., 1993) αλλά και στην ανίχνευση DNA αλληλουχιών παθογόνων βακτηρίων, μέσω υβριδοποίησης με βιοτινυλιωμένες συμπληρωματικές αλληλουχίες (Ikebukuro, K. et al., 2002). Επιπλέον το σύστημα στρεπταβιδίνης – βιοτίνης έχει χρησιμοποιηθεί για την ακινητοποίηση βιοτινυλιωμένων αντισωμάτων σε επιφάνειες χρυσού, οδηγώντας στον ηλεκτροχημικό εντοπισμό τους (Kossek, S. et al., 1996).

Το σύστημα βρίσκει εφαρμογές και στους οπτικούς βιοαισθητήρες, όπου για παράδειγμα με την χρήση του επιφανειακού συντονισμού πλάσματος (SPR), έχει

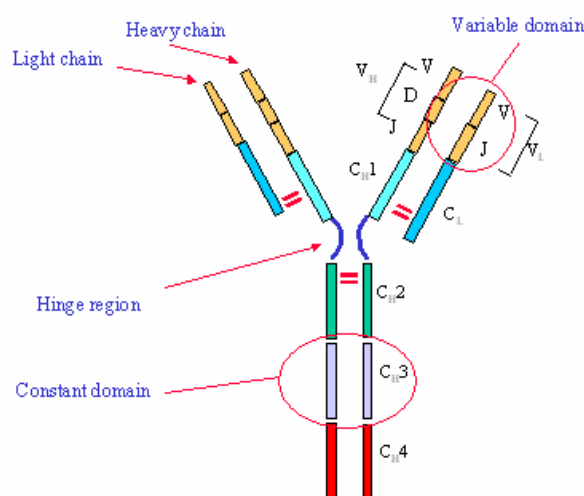
εντοπιστεί το μονοκλωνικό αντίσωμα της αποκαρβοξυλάσης του γλουταμινικού οξέος (anti-GAD), που παίζει σημαντικό ρόλο στην πρόγνωση, διάγνωση και παρακολούθηση του σακχαρώδη διαβήτη τύπου I (Choi, S.H., 2005). Όσον αφορά την κατηγορία των ακουστικών βιοαισθητήρων, έχουν πραγματοποιηθεί πειράματα με τον μικροζυγό κρυσταλλικού χαλαζία (Quartz Crystal Microbalance - QCM). Στα πειράματα αυτά το σύμπλοκο αβιδίνης - βιοτίνης χρησιμοποιήθηκε για την ακινητοποίηση μονόκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων σε τροποποιημένες επιφάνειες χρυσού και στην συνέχεια για την άμεση παρακολούθηση της υβριδοποίησής τους. Επιπρόσθετα σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν με τον μικροζυγό κρυσταλλικού χαλαζία και τον επιφανειακό συντονισμό πλάσματος, με το σύστημα βιοτίνης - αβιδίνης, μελετήθηκε η πρόσδεση βιοτινιωμένων μορίων DNA σε τροποποιημένες επιφάνειες στρεπταβιδίνης και η επακόλουθη υβριδοποίηση τους με μονόκλιωνα συμπληρωματικά μόρια (Su, X. et al., 2005). Η προσρόφηση σε επιφάνειες χρυσού αβιδίνης και νουτραβιδίνης και ο τρόπος με τον οποίο αλληλεπιδρούν με βιοτινιωμένα μόρια έχει μελετηθεί με την βοήθεια της τεχνολογίας των ακουστικών βιοαισθητήρων (Ghafour, S. and Thompson, M., 1999).

Τέλος πολλά από τα χρησιμοποιούμενα βιομόρια είναι πλέον εμπορικά διαθέσιμα σε βιοτινιωμένη μορφή ή δίνεται η δυνατότητα να σημανθούν μέσω ειδικών kit βιοτινύλιωσης που διατίθενται από διάφορες εταιρίες (www.probes.com, www.sigmaaldrich.com).

1.7.Πρωτεΐνη IgG και τεχνολογία βιοαισθητήρων

Η ανοσοσφαιρίνη G (immunoglobulin G, IgG) είναι ένα αντίσωμα (Ab), που χαρακτηρίζεται όπως όλα τα αντισώματα, από την ικανότητα του κατά πρώτον να αναγνωρίζει και να προσδέεται ειδικά σε μόρια αντιγόνου (Ag) που προσβάλουν ένα οργανισμό και κατά δεύτερον να ενεργοποιεί μια σειρά βιολογικών μορίων και κυττάρων που έχουν σκοπό την απομάκρυνση του αντιγόνου από τον οργανισμό. Πιο αναλυτικά το IgG είναι μια πρωτεΐνη με μοριακό βάρος ~ 150kD, που αποτελείται από δύο βαριές (heavy chains) με μοριακό βάρος η κάθε μια 50kD και δύο ελαφριές πολυπεπτιδικές αλυσίδες (light chains) με μοριακό βάρος η κάθε μια 25kD. Οι δύο βαριές αλυσίδες ενώνονται μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς και κάθε μια από τις βαριές αλυσίδες ενώνεται με τις ελαφριές μέσω ενός δισουλφιδικού δεσμού

(Σχήμα 2). Το πρωτεϊνικό αυτό μόριο εμφανίζει άξονα συμμετρίας καθώς οι δύο βαριές, όσο και οι δύο ελαφριές αλυσίδες είναι μεταξύ τους πανομοιότυπες.



Σχήμα 2: Η δομή της ανοσοσφαιρίνης G.

Η σπουδαιότητα της πρωτεΐνης IgG είναι συνυφασμένη με την ικανότητα της να απαντά άμεσα μετά την έκκριση της, σε προσβολές του οργανισμού από μια σειρά μολυσματικών παραγόντων. Αυτό πραγματοποιείται μέσω με της αλληλεπίδρασης της IgG με αντιγόνα της επιφάνειας των μολυσματικών παραγόντων. Αναλυτικότερα, τόσο οι βαριές όσο και οι ελαφριές αλυσίδες εμφανίζονται οργανωμένες σε δύο επικράτειες, τη μεταβλητή (variable) και τη σταθερή (constant). Οι μεταβλητές περιοχές από κάθε αλυσίδα σχηματίζουν την περιοχή αναγνώρισης και πρόσδεσης του αντιγόνου.

Όπως όλα τα μόρια που εκκρίνονται από το ανοσοποιητικό έτσι και η IgG μελετήθηκε εκτενώς από διάφορους κλάδους της βιολογίας που εξήγησαν την πολυμορφία των ανοσοσφαιρινών (Hozumi, N. and Tonegawa S., 2004), την δομή και την λειτουργία τους. Η τεχνολογία των βιοαισθητήρων χρησιμοποίησε τα μόρια των ανοσοσφαιρινών για την δημιουργία άνοσο-βιοαισθητήρων με ποικίλες εφαρμογές. Μια από αυτές είναι η δημιουργία αμπερομετρικών άνοσο-αισθητήρων για την ακινητοποίηση της βιοτινυλιωμένης ανοσοσφαιρίνης G από κουνέλι (rabbit IgG) σε τροποποιημένες επιφάνειες αβιδίνης (Darain, F. et al., 2003) αλλά και την ανίχνευση rabbit IgG από anti-IgG (Gooding, J.J. et al., 2004). Πολλές πιεζοηλεκτρικές συσκευές έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί, για την παρακολούθηση σε πραγματικό χρόνο της αντίδρασης μεταξύ αντιγόνου αντισώματος (Minunni, M. et

al., 1994) και για την εύρεση κατάλληλων συνθηκών ακινητοποίησης βιολογικών μορίων, όπως το αντι-αντίσωμα IgG και η πρωτεΐνη BSA, πάνω σε επιφάνειες χρυσού και την μελέτη της αλληλεπίδρασης τους με το αντίσωμα IgG και το αντι-BSA αντίστοιχα (Storri, S. et al., 1998). Ακουστικοί βιοαισθητήρες κύματος Love με βάση την αντίδραση αντισώματος και αντι- αντισώματος (IgG και anti-IgG), κατέγραψαν την μεταβολή της συχνότητας του ακουστικού κύματος σε σχέση με τον χρόνο αντίδρασης για διάφορες συγκεντρώσεις του αντισώματος, πραγματοποιώντας βαθμονόμηση του ακουστικού βιοαισθητήρα και παρέχοντας πληροφορίες για την κινητική της αντίδρασης (Harding, G.L. et al., 1997).

Μια εξίσου αξιόλογη εφαρμογή ήταν ο σχεδιασμός ακουστικού ανοσο-αισθητήρα σε μικροσυσκευή, στην επιφάνεια της οποίας εναποτέθηκαν βιοτινυλιωμένα κυστίδια που σχημάτισαν λιπιδική διπλοστοιβάδα που συνδεθήκαν με μόρια στρεπταβιδίνης και ακολούθησε προσθήκη βιοτινυλιωμένων μορίων IgG. Η λειτουργία του συστήματος επαληθεύτηκε και με πειράματα που έγιναν με οπτικό βιοαισθητήρα (SPR). Το αποτέλεσμα ήταν η δημιουργία μιας εξειδικευμένης επιφάνειας αναγνώρισης υψηλής ευαισθησίας για συγκεκριμένο αντιγόνο (Gizeli, E. et al., 1997). Επιπρόσθετα μετρήθηκαν οι σταθερές πρόσδεσης της πρωτεΐνης IgG σε τροποποιημένες επιφάνειες (ακινητοποιημένα μόρια πρωτεΐνης A και ακινητοποιημένα μόρια πρωτεΐνης G) ακουστικών μικροσυσκευών. Η μελέτη τέτοιων αλληλεπιδράσεων είναι σημαντική, καθότι οι πρωτεΐνες A και G συναντώνται στα τοιχώματα παθογόνων βακτηριακών κυττάρων που προσβάλλουν τους οργανισμούς (Saha, K. et al., 2003).

Η επιστημονική κοινότητα έχει στρέψει το ενδιαφέρον της στους βιοαισθητήρες, και ειδικά στους ανοσο-αισθητήρες, οι οποίοι προσφέρουν γρήγορη και εξειδικευμένη πληροφορία που βασίζεται στην άμεση και σε πραγματικό χρόνο συλλογή αποτελεσμάτων. Η δημιουργία συστημάτων όπως αυτό της ανοσο-ανίχνευσης ήταν και είναι καθοριστικής σημασίας για την ταχύτατη και επανάληψιμη μελέτη του τρόπου αλληλεπίδρασης βιολογικών μορίων με σημαντικές εφαρμογές στη βιοτεχνολογία.

2.Σκοπός της παρούσας εργασίας

Με τον ακουστικό βιοαισθητήρα μπορούμε να παρακολουθήσουμε αλλαγές στη μάζα και την ιξωδοελαστικότητα πάνω στην επιφάνεια που διαδίδεται το ακουστικό κύμα. Οι μετρήσεις των τιμών της φάσης δίνουν πληροφορίες σχετικές με τη μάζα των μορίων που προσδένονται, ενώ οι μετρήσεις των τιμών του πλάτους είναι ενδεικτικές των ιδιοτήτων που σχετίζονται με την διαμόρφωση των μορίων, που λαμβάνουν χώρα στη μεσεπιφάνεια υγρού – στερεού, λόγω της πρόσδεσης μορίων στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα. Για να μπορέσουμε να παρακολουθήσουμε τις αλλαγές αυτές είναι απαραίτητο να δημιουργήσουμε τις κατάλληλες συνθήκες στην επιφάνεια της μικροσυσκευής.

Στην παρούσα εργασία σκοπός μας ήταν αρχικά η μελέτη της ευαισθησίας της συσκευής ως προς το πάχος του πολυμερικού κυματοδηγού και ως προς το πάχος και την ποιότητα της επιφάνειας χρυσού. Έχοντας βρει τις βέλτιστες συνθήκες του Love wave device, στόχος μας ήταν η παρατήρηση και σύγκριση της απόκρισης του αισθητήρα (μεταβολές στη φάση και το πλάτος του ακουστικού κύματος) κατά την προσθήκη διαφορετικών πρωτεϊνών ως προς δομή και το μοριακό βάρος τους αλλά και ο υπολογισμός της μάζας τους που εναποτίθεται στην επιφάνεια του αισθητήρα. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές πρωτεΐνες (anti-IgG και BSA). Τέλος μελετήθηκε η δυνατότητα δημιουργίας μιας άμεσα αναγεννήσιμης επιφάνειας τροποποιημένης αβιδίνης, για την εναπόθεση βιοτινυλιωμένων βιολογικών μορίων και την περαιτέρω μελέτη τους.

**ΥΛΙΚΑ
ΚΑΙ
ΜΕΘΟΔΟΙ**

3. Υλικά και Μέθοδοι

3.1 Μικροσυσκευή ακουστικού βιοαισθητήρα SAW

Η συσκευή του βιοαισθητήρα κατασκευάστηκε σε πλάκα χαλαζία πάχους 0,5mm που είχε κοπεί κατά τον άξονα y $42,5^\circ$. Η διάδοση του κύματος είναι κάθετη στον άξονα x . Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στους βιοαισθητήρες των 110MHz και των 155MHz, όπου οι αλληλοδιαπλεκόμενοι μεταγωγείς (IDTs) αποτελούνται από 80 ζεύγη ηλεκτροδίων και 92 ζεύγη ηλεκτροδίων αντίστοιχα. Αναλυτικότερα στον βιοαισθητήρα των 110MHz τα ζεύγη των ηλεκτροδίων απέχουν 45 μ m, το καθένα αποτελείται από Cr/Au (10/200nm) και έχει πάχος 210nm. Αναφορικά με την μικροσυσκευή των 155MHz, στα IDTs τα ζεύγη ηλεκτροδίων απέχουν 32nm, το καθένα αποτελείται από Cr/Au (20/100nm) και έχει πάχος 120nm.

3.2.Βιοαισθητήρας Love

3.2.1.Προετοιμασία βιοαισθητήρα

Στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα, στην περιοχή διάδοσης του ακουστικού κύματος, προστίθεται στρώμα του πολυμερούς PMMA. Οι συγκεντρώσεις του πολυμερούς που χρησιμοποιήθηκαν για την διεκπεραίωση των πειραμάτων ήταν 17% και 22% για τον βιοαισθητήρα 110MHz και 8% για αυτόν των 155MHz. Επίσης σε πειράματα με σκοπό την μέτρηση του πάχους του στρώματος του πολυμερούς χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις 10%, 15%, 22%, 25% και 30%. Αναλυτικότερα διαλύματα διαφορετικών συγκεντρώσεων του πολυμερούς, χρησιμοποιήθηκαν για την επικάλυψη κρυστάλλων χαλαζία στους οποίους και μετρήθηκε το πάχος του στρώματος του PMMA (Πίνακας 3).

10%PMMA	15%PMMA	22%PMMA	25%PMMA	30%PMMA
0.45μm	0.6μm	2.45μm	2.85μm	3.15μm

Πίνακας 3: Το πάχος του στρώματος του PMMA που μετρήθηκε για αυξανόμενες συγκεντρώσεις του πολυμερούς.

Όπως φαίνεται και στον πίνακα για πιο πυκνά διαλύματα το στρώμα του πολυμερούς είναι πιο παχύ.

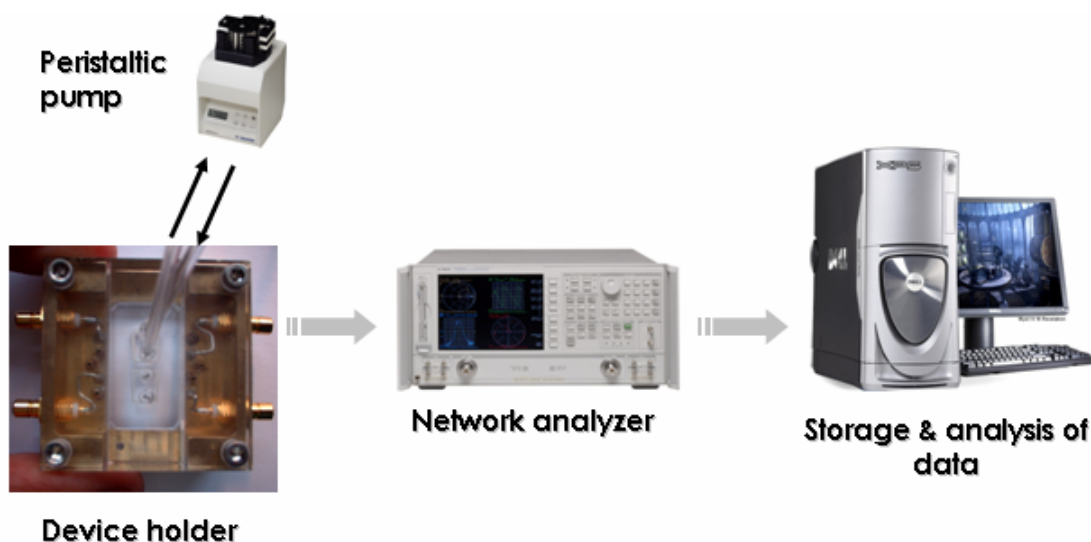
Τέλος οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την μέτρηση της τραχύτητας της επιφάνειας του πολυμερούς ήταν 17%, 22% και 23%. Το στρώμα του PMMA δημιουργείται με επικάλυψη της επιφάνειας έπειτα από φυγοκέντρηση στη συσκευή Spincoater Model P6700 Series (Specialty Coating Systems Inc.) αφού τοποθετηθούν στην επιφάνεια της ακουστικής συσκευής λίγες σταγόνες (2-4) διαλύματος PMMA. Η φυγοκέντρηση πραγματοποιείται στις 4000rpm για 40sec. Οι μικροσυσκευές στην συνέχεια τοποθετούνται σε κλίβανο όπου και επωάζονται σε θερμοκρασία 190°C για χρονικό διάστημα 2h, έτσι ώστε να στερεοποιηθεί το στρώμα του PMMA.

3.2.2.Εναπόθεση χρυσού και χάραξη με χημεία πλάσματος

Με τη συσκευή Sputter Coater BAL-TEC SCD 050, γίνεται εναπόθεση στρώματος χρυσού (sputtering) για 40sec πάνω στον κυματοδηγό της συσκευής του ακουστικού βιοαισθητήρα 110MHz και 155MHz, που σημαίνει δημιουργία στρώματος χρυσού 20nm. Για την επαναχρησιμοποίηση του βιοαισθητήρα μετά από κάθε πείραμα η επιφάνεια χρυσού υφίσταται χάραξη με χημεία πλάσματος (etching) για 60sec, και κατόπιν εναποτίθεται φρέσκο στρώμα χρυσού μετά από sputtering για 3sec και τελικό etching για 180sec. Το Sputter Coater λειτουργεί με Ar, το οποίο διασπάται ως πλάσμα σε χημικά ενεργές ρίζες που απορροφώνται από την επιφάνεια και αντιδρούν με αυτή.

3.3. Πειραματική διάταξη

Η μικροσυσκευή του βιοαισθητήρα τοποθετείται σε μία ειδική θήκη, το device holder, που αποτελείται από δύο πλάκες χρυσού. Πάνω από το device holder εφαρμόζεται η κυψελίδα συνεχούς ροής, η οποία εφαρμόζει στην ελεύθερη επιφάνεια της συσκευής μεταξύ των IDTs. Ο ρόλος της κυψελίδας, είναι η διατήρηση της ροής του διαλύματος με μια σταθερή ταχύτητα (55μl/min) με την βοήθεια μιας περισταλτικής αντλίας (Gilson, France). Στις πλάκες χρυσού του device holder, εφαρμόζονται ηλεκτρόδια που συνδέονται με τον αναλυτή δικτύου. Οι αναλυτές δικτύου που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι Hewlett Packard 4195A και Agilent Technologies E5061A. Οι μετρήσεις που λαμβάνονται καταγράφονται σε ένα ηλεκτρονικό υπολογιστή από όπου και παρακολουθείται, σε πραγματικό χρόνο, η πρόοδος του πειράματος. Το device holder, η περισταλτική αντλία, ο αναλυτής δικτύου και ο ηλεκτρονικός υπολογιστής συναποτελούν την πειραματική διάταξη όπως αυτή παρατίθεται στην συνέχεια (Εικόνα 7).



Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση της χρησιμοποιούμενης πειραματικής διάταξης. Αρχικά η μικροσυσκευή τοποθετείται στο device holder, το επιθυμητό διάλυμα έρχεται σε επαφή με την επιφάνεια της συσκευής μέσω περισταλτικής αντλίας ελεγχόμενης ροής και οι μετρήσεις λαμβάνονται με τον αναλυτή δικτύου. Ο τελευταίος συνδέεται με υπολογιστή στον οποίο αποθηκεύονται και επεξεργάζονται τα δεδομένα.

Σε κάθε πείραμα που πραγματοποιήθηκε, οι μεταβολές των χαρακτηριστικών του κύματος (φάση και πλάτος) μεταφέρονται από τον αναλυτή δικτύου στον υπολογιστή. Αρχικά εφαρμόζεται διάλυμα PBS pH 7.4 (SIGMA), μέσω της κυψελίδας και της περισταλτικής, με σκοπό την εξισορρόπηση του σήματος. Κατόπιν και αφού το σήμα φτάσει σε πλατό, προστίθεται διάλυμα νουτραβιδίνης (Pierce, UK) σε συγκέντρωση 250μg/ml.

3.4. Ακουστικά πειράματα με πρωτεΐνες

Για την διεξαγωγή των πειραμάτων στον ακουστικό βιοαισθητήρα χρησιμοποιήθηκαν οι εξής πρωτεΐνες : νουτραβιδίνη, νιτρο-αβιδίνη, βιοτινυλιωμένο – anti-IgG (Vector Laboratories) και βιοτινυλιωμένη-BSA (Sigma). Η συγκέντρωση της νουτραβιδίνης και νιτρο-αβιδίνης που χρησιμοποιήθηκε ήταν 250μg/ml και 100 μg/ml αντίστοιχα των βιοτινυλιωμένων – πρωτεϊνών ήταν 2μg/ml, 5μg/ml, 10μg/ml, 25μg/ml, 50μg/ml, 75μg/ml, 100μg/ml και 150μg/ml. Οι παραπάνω πρωτεΐνες αραιώνονται από stock δείγματα σε διάλυμα PBS pH 7.4 (0.01M διάλυμα φωσφορικού, 0.0027M KCl και 0.137 NaCl), ώστε να πάρουμε τις παραπάνω συγκεντρώσεις. Αφού έχει πραγματοποιηθεί η εξισορρόπηση με το διάλυμα PBS προστίθεται αρχικά ή νουτραβιδίνη, στην συνέχεια ακολουθεί νέα εξισορρόπηση με το διάλυμα PBS και τελικά προστίθενται τα δείγματα των βιοτινυλιωμένων πρωτεϊνών.

3.5. Επιφανειακός Συντονισμός Πλάσματος

Όπως ήδη έχει αναφερθεί στο προηγούμενο κεφάλαιο μία από τις πιο γνωστές κατηγορίες βιοαισθητήρων είναι οι οπτικοί. Η αρχή λειτουργίας τους βασίζεται στην ανίχνευση της μεταβολής του δείκτη διάθλασης μιας μεσεπιφάνειας υγρού-στερεού σαν αποτέλεσμα μιας βιολογικής αλληλεπίδρασης. Στην παρούσα εργασία το SPR (IBIS II, www.xantec.com) χρησιμοποιήθηκε για την μελέτη της ικανότητας, της νίτρο – αβιδίνης να αλληλεπιδρά με βιοτινυλιωμένα μόρια. Στην αρχή έγινε εξισορρόπηση του βιοαισθητήρα με διάλυμα PBS pH 7.4 (0.027M KCl και 0.137 NaCl) και στην συνέχεια τα υγρά δείγματα, αρχικά νίτρο-αβιδίνη σε συγκέντρωση

100 μ g/ml και στην συνέχεια βιοτινυλιωμένη anti-IgG σε συγκεντρώσεις 10 μ g/ml και 100 μ g/ml φορτώθηκαν στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα.

3.6. Μικροζυγός Κρυσταλλικού Χαλαζία (Q-Sense)

Ο μικροζυγός κρυσταλλικού χαλαζία (QCM), υπάγεται στην κατηγορία των βιοαισθητήρων BAW. Ο QCM είναι μια τεχνολογία που χρησιμοποιείται στην μελέτη σχηματισμού λεπτών στοιβάδων πρωτεϊνών (Hook, F., 1998), κυττάρων και πολυμερών. Καθώς ο κρύσταλλος χαλαζία ταλαντώνεται και η διάδοση του ακουστικού κύματος πραγματοποιείται σε όλο τον όγκο του υλικού της μικροσυσκευής, παρακολουθούνται οι μεταβολές στην απόσβεση (ΔD) και την συχνότητα (Δf) της ταλάντωσης (www.q-sense.com).

Ο μικροζυγός κρυσταλλικού χαλαζία που χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό των τιμών μάζας ανά επιφάνεια για κάθε βιοτινυλιωμένο μόριο, ήταν ο Q-Sense AB (Sweden). Πρόκειται για ένα ακουστικό βιοαισθητήρα αποτελούμενο από μια μικροσυσκευή που εφαρμόζει μέσα σε αεροστεγή θήκη. Με την βοήθεια μιας περισταλτικής αντλίας συνεχούς ροής τα υγρά δείγματα, αρχικά νουτραβιδίνη σε συγκέντρωση 250 μ g/ml και στην συνέχεια βιοτινυλιωμένη anti-IgG σε συγκεντρώσεις από 10 μ g/ml έως 150 μ g/ml φορτώθηκαν στην συσκευή και οι μετρήσεις καταγράφηκαν σε ηλεκτρονικό υπολογιστή από όπου σε πραγματικό χρόνο, παρακολουθήθηκε η πρόοδος του πειράματος (Εικόνα 8). Το διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε για την διεξαγωγή των πειραμάτων ήταν PBS pH 7.4 (0.027M KCl και 0.137 NaCl).

Εικόνα 8: Ο Q-Sense AB (Sweden).



3.7. Παρασκευή νίτρο-αβιδίνης

Πρόκειται για ένα πρωτόκολλο παρασκευής τροποποιημένης αβιδίνης, με την δυνατότητα κάτω από ορισμένες συνθήκες να μπορεί να αποδεσμεύσει βιοτινυλιωμένα μόρια με τα οποία αλληλεπιδρά. Σε 1ml διαλύματος 50mM Tris pH 8 διαλυτοποιήθηκαν 5mg αβιδίνης (Sigma) και στη συνέχεια προστέθηκαν 2μl τετρα-νίτρο-μεθανίου (TNM, Sigma). Το διάλυμα αβιδίνης επώαστηκε για 30min στους 23⁰C και ακολούθησε μια σειρά από ολονύχτιες διαπηδήσεις (dialysis) στους 4⁰C, με ειδικές μεμβράνες (Brand Spectra/POR4, Dialysis Membrane, MWCO: 12-14kD). Η πρώτη πραγματοποιήθηκε σε 4L διαλύματος 1M NaCl, ενώ οι επόμενες δύο σε 4L ddH₂O. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκαν τρεις τελευταίες διαπηδήσεις με την ακόλουθη σειρά: 1. σε 4L διαλύματος 50mM KH₂PO₄ (Sigma) και 0.6mM βιοτίνης (Sigma), 2. σε 4L 50mM Na₂CO₃ pH 10 (Merck) και 3. σε 4L 50mM KH₂PO₄ (Cass, T. and Ligler, F.S., 1998, Morag, E. et al., 1996).

3.7.1. Χρωματογραφία συγγένειας

Με σκοπό τον έλεγχο της λειτουργικότητας της νίτρο-αβιδίνης πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία συγγένειας (Morag, E. et al., 1996, Junowicz, E., 1976) και ακολουθήθηκε το παρακάτω πρωτόκολλο:

- Καθαρισμός της ρητίνης (Sephacrose 4B resin) με ddH₂O, για την απομάκρυνση της αιθανόλης στην οποία διατηρείται.
- Προσθήκη 10ml αποστειρωμένου ddH₂O σε 5ml ρητίνης και συνέχεια 5ml διαλύματος 25mM NaOI₄ (Sigma). Ακολουθεί ήπια ανάδευση στο σκοτάδι για 1h, στους 4⁰C.
- Προσθήκη 0.5ml Ethylene glycol (Sigma) και ήπια ανάδευση στο σκοτάδι για 30min, στους 4⁰C.
- Καθαρισμός της ρητίνης με ddH₂O και στη συνέχεια με PBS στους 4⁰C.
- Στα 5ml ρητίνης προσθέτουμε, 10ml PBS pH 7.4, 0.1ml νίτρο-αβιδίνης (stock 5mg/ml) και 0.1ml NaCNBH₃ (stock 10mg/ml, Fluka).

Η αντίδραση πραγματοποιείται κατά την διάρκεια της νύχτας στο σκοτάδι, υπό ήπια ανάδευση και στους 4°C.

- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 400rpm, για 8min στους 4°C και απομάκρυνση του υπερκειμένου.
- Καθαρισμός της ρητίνης με ddH₂O και φυγοκέντρηση στις 400rpm, για 8min στους 4°C για την απομάκρυνση του υπερκειμένου.
- Τοποθέτηση της ρητίνης (χρωματογραφικό υλικό) σε στήλη. Ξέπλυμα του χρωματογραφικού υλικού με 20ml (2x) PBS pH 7.4 και στην συνέχεια με 20ml (2x) PBS pH 4.
- Φορτώνονται στη στήλη 0.5ml 0.6mM βιοτίνης (biotin, Sigma) pH 4.
- Ακολουθεί ξέπλυμα της στήλης: 1. με 20ml (2x) PBS pH 4, 2. 20ml (2x) Na₂CO₃ pH 10, και 3. 20ml (2x) PBS pH 4.
- Στην στήλη φορτώνονται 0.5ml βιοτινυλιωμένη – BSA (Sigma).
- Τέλος, πραγματοποιείται η έκλουση με 20ml (2x) Na₂CO₃ pH 10.

3.7.2 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών :

3.7.2.A. Σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης

Τα κλάσματα που συλλέχθηκαν κατά την διάρκεια της χρωματογραφίας διαχωρίστηκαν σε 12% αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Η ηλεκτροφόρηση είναι μια τεχνική κατά την οποία φορτισμένα μόρια κινούνται σε ηλεκτρικά πεδία και η κινητικότητα του κάθε μορίου είναι ανάλογη της εφαρμοζόμενης τάσης επί το καθαρό φορτίο του μορίου δια την τριβή που εμφανίζεται λόγω του σχήματος και του μεγέθους του. Στην ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης, οι πρωτεΐνες τρέχουν ως αποδιαταγμένα μονομερή. Αρχικά για το παρασκεύασμα του δείγματος χρησιμοποιείται διαλυτή θειόλη για την αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών ενώ το απορρυπαντικό δωδεκανοθειικό νάτριο (SDS, Merck) δεσμεύεται σε όλες τις περιοχές της πρωτεΐνης, προσδίνοντας σταθερό λόγο ανιονικού φορτίου προς μάζα.

Τα προς ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνικά δείγματα αναμειγνύονται 1:1 με το διάλυμα φόρτωσης (100mM Tris-HCl pH6.8, 4% SDS, 20% glycerol, 0.2%

Bromophenol blue, 200mM DTT) και ακολουθεί βρασμός 5min των δειγμάτων και γρήγορη φυγοκέντρηση τους πριν την φόρτωση. Η κατασκευή του πήκτωμας ήταν κατά Laemmli (Laemmli, UK., 1970). Αναλυτικότερα παρασκευάστηκε το πήκτωμα διαχωρισμού [10% μείγματος ακρυλαμίδης (29% ακρυλαμίδη, 1% N,N'-μεθυλενοδισακρυλαμίδη), 0.375M Tris-HCl (Merck) pH 8.8, 0.2% SDS, 0.2% APS (Merck) και Temed (Merck)] που τοποθετήθηκε αρχικά στην συσκευή ηλεκτροφόρησης και αφέθηκε να πολυμεριστεί και ακολούθως το πήκτωμα συσώρευσης (5% μείγματος ακρυλαμίδης, 0.125M Tris-HCl pH 6.8, 0.1% SDS, 0.1% APS και Temed). Το διάλυμα ηλεκτροφόρησης αποτελείται από 25mM Tris-base, 192mM Glycine pH 8.3 και 0.1% SDS. Μετά το φόρτωμα των δειγμάτων το πήκτωμα ηλεκτροφορείται σε τάση 100V αρχικά και αφού τα δείγματα εισέλθουν στο πήκτωμα διαχωρισμού αυξάνεται σε 120V.

3.7.2B. Σε native πήκτωμα πολυακρυλαμίδης

Στην native ηλεκτροφόρηση οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται βάσει του φορτίου τους, της δομής και του μοριακού τους βάρους. Τα native πήκτωματα δεν είναι πληροφοριακά ως προς το είδος και το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης που ηλεκτροφορείται σε σχέση με την ηλεκτροφόρηση SDS, αλλά μπορούν να δώσουν στοιχεία για την κατάσταση και τη συμπεριφορά των φυσικών πληθυσμών της πρωτεΐνης [αν η πρωτεΐνη απεικονίζεται μετά από τη χρώση της ως μια συμπαγής μπάνα (έναν ή λίγους διακριτούς φυσικούς πληθυσμούς μορίων) ή ως ένα νέφος (smear)]. Σαφώς ο τύπος αυτός της ηλεκτροφόρησης είναι ένας τρόπος διαχωρισμού πρωτεϊνικών μορίων, όπου είναι επιθυμητό να διατηρήσουν την στερεοδιαμόρφωσή τους για να πραγματοποιηθούν πειράματα που απαιτούν κάτι τέτοιο όπως είναι τα πειράματα με τον ακουστικό βιοαισθητήρα. Το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης, το διάλυμα ηλεκτροφόρησης και φόρτωσης στην προετοιμασία των δειγμάτων δεν περιέχουν SDS ούτε αναγωγικούς παράγοντες, και τα πρωτεϊνικά δείγματα δεν θερμαίνονται πριν την φόρτωση τους στο πήκτωμα. Το πήκτωμα διαχωρισμού έχει pH 8 αντί για pH 8.8 που έχει στην SDS εκδοχή του, ενώ η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στους 4⁰C.

3.7.2Γ. Χρώση του πηκτώματος με κινανό του Coomassie και αποχρωματισμός

Για να γίνουν ορατές οι πρωτεϊνικές ζώνες μετά την ηλεκτροφόρηση ακολουθεί η διαδικασία χρώσης τους, κατά την οποία το πήκτωμα τοποθετείται εντός του διαλύματος χρώσης [45% μεθανόλη (Merck), 10% οξικό οξύ (Merck) και 2.5% w/v Coomassie blue] όπου και αφήνεται σε ήπια ανάδευση για 40min. Στην συνέχεια τοποθετείται σε διάλυμα αποχρωματισμού (30% μεθανόλη, 10% οξικό οξύ) για 1h σε ήπια ανάδευση. Οι ζώνες εμφανίζονται στην πηκτή καθώς η χρωστική δεσμεύεται στα βασικά κατάλοιπα των πρωτεϊνών (κυρίως αργινίνης και αρωματικών αμινοξέων).

3.8. Μικροσκοπία Ατομικών Δυνάμεων (AFM)

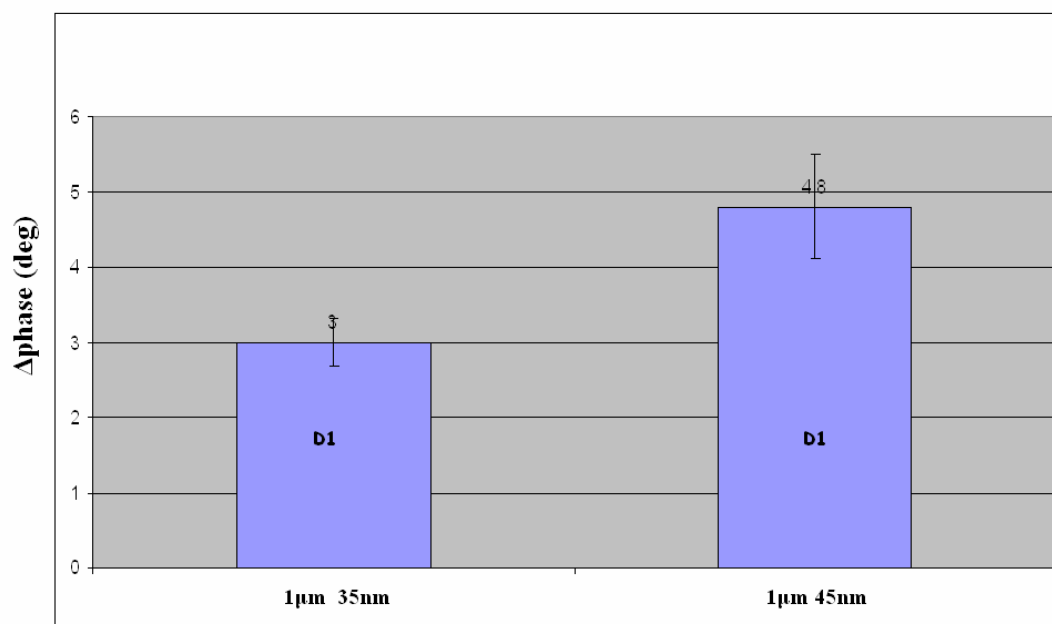
Για την εύρεση της τραχύτητας των επιφανειών PMMA (17%, 22% και 23%) χρησιμοποιήθηκε το μικροσκόπιο ατομικών δυνάμεων (Atomic Force Microscope, Digital Instruments NanoScope IIIa). Το AFM (Binnig, G. et al., 1986) ανήκει στην ευρύτερη οικογένεια των Μικροσκοπίων Σάρωσης και η αρχή λειτουργίας του στηρίζεται στη μηχανική σάρωση μιας επιφάνειας από μια λεπτή και μυτερή ακίδα. Το AFM αποτελείται από ένα εύκαμπτο έλασμα (cantilever) στην άκρη του οποίου υπάρχει μια λεπτή και μυτερή ακίδα (tip) και μια διάταξη που αντιλαμβάνεται τις αποκλίσεις του ελάσματος με αποτέλεσμα να αντιλαμβάνεται και τις δυνάμεις αλληλεπίδρασης. Η διάταξη αυτή αποτελείται από ένα laser και μια διαχωρισμένη φωτο-δίοδο, ένα μηχανικό σύστημα σάρωσης (πιεζοηλεκτρικό) το οποίο μετακινεί το δείγμα σε σχέση με τη βελόνα. Συνδεδεμένος με το μικροσκόπιο είναι ένας υπολογιστής, με τον οποίο γίνεται εφικτή η μέτρηση των τιμών των παραμέτρων, οι οποίες διατηρούνται σταθερές κατά τη διάρκεια της σάρωσης, και ένας μετατροπέας που μετατρέπει το αναλογικό σήμα σε ψηφιακό έτσι ώστε να μπορεί να το επεξεργαστεί ο υπολογιστής και το αντίστροφο.

**ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ
ΚΑΙ
ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

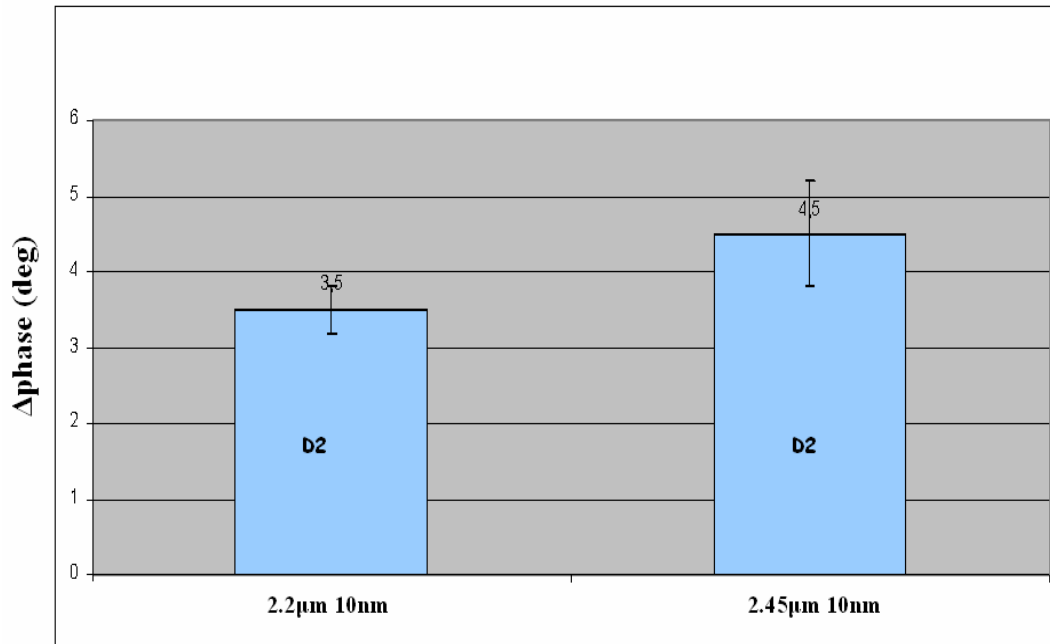
4.1. Ευαισθησία ακουστικού σήματος, ως προς τη διάταξη του κυματοδηγού

Με σκοπό τη συσχέτιση του πάχους του κυματοδηγού (PMMA) και του πάχους χρυσού (Au) με την ευαισθησία του ακουστικού σήματος, πραγματοποιήθηκαν πειράματα εναπόθεσης της πρωτεΐνης BSA σε συγκέντρωση 1mg/ml, σε διαφορετικά τροποποιημένες επιφάνειες μικροσυσκευών των 110MHz. Αναλυτικότερα χρησιμοποιήθηκαν τρεις (D1, D2 και D3) ακουστικές μικροσυσκευές (devices), επικαλυμμένες με στρώμα PMMA διαφορετικού πάχους (1μm έως 2.45μm) και στη συνέχεια με στρώμα χρυσού διαφορετικού πάχους (5nm, 10nm, 15nm, 35nm και 45nm) (Gizeli et al., 1992). Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών παρατίθενται παρακάτω (Εικόνα 9.1-3).

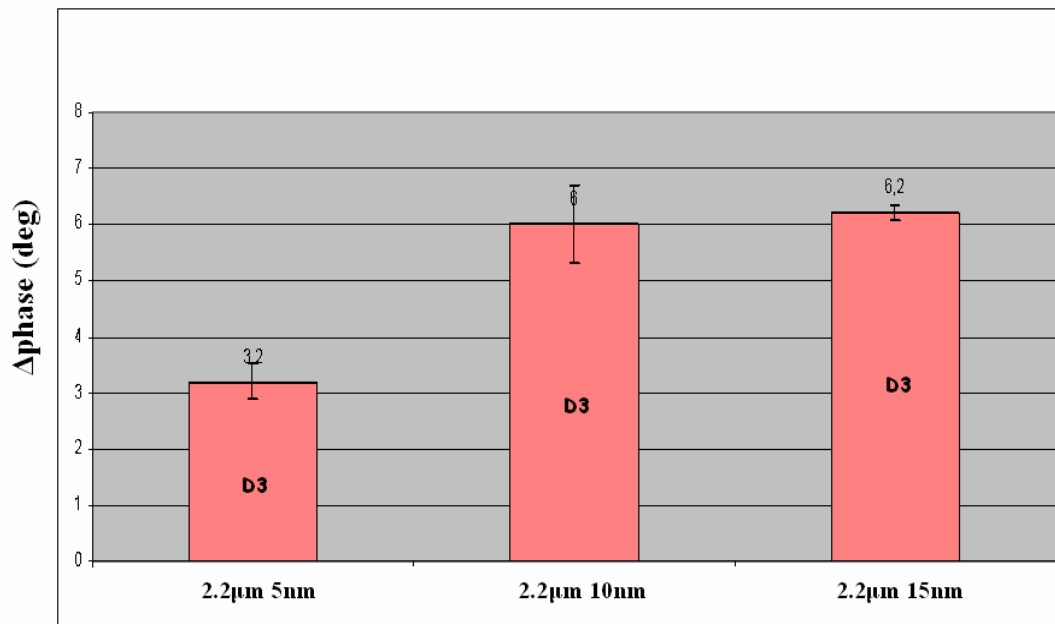


9.1

πάχος PMMA & Au



9.2 πάχος PMMA & Au



9.3 πάχος PMMA & Au

Εικόνες 9.1-3: Μεταβολή της φάσης του ακουστικού κύματος κατά την εναπόθεση της πρωτεΐνης BSA σε διαφορετικές επιφάνειες (πάχος PMMA και πάχος Au) μικροσυσκευών 110MHz.

Στις παραπάνω εικόνες παρατίθενται, οι μέσοι όροι των τιμών της πτώσης της φάσης ($\Delta\phi$) του ακουστικού σήματος για την πρωτεΐνη BSA, που καταγράφηκαν καθώς και οι τυπικές τους αποκλίσεις. Παρατηρήθηκε ότι η αύξηση του πάχους του χρυσού, οδηγεί σε αύξηση της ευαισθησίας ($\Delta\phi$), γεγονός που αποδεικνύεται και από τον παραπάνω πίνακα (Εικόνα 9.1) καθώς η συσκευή D1 (1 μ m PMMA, 35nm Au) είναι λιγότερο ευαίσθητη από ότι η D1 (1 μ m PMMA, 45nm Au) έχοντας το ίδιο πάχος κυματοδηγού. Επίσης το ίδιο ισχύει και για τις μικροσυσκευές D3 (Εικόνα 9.3), όπου ότι για το ίδιο πάχος PMMA και αυξανόμενο πάχος χρυσού εμφανίζεται αύξηση της ευαισθησίας της συσκευής. Επιπρόσθετα συγκρίνοντας την πτώση στη φάση, για τις μικροσυσκευές D2 (Εικόνα 9.2) παρατηρήθηκε ότι αύξηση του πάχους του PMMA, οδηγεί σε αύξηση της ευαισθησίας της συσκευής. Χαρακτηριστικό ήταν το στρώμα των 5nm χρυσού, αποδείχθηκε ακατάλληλο για την διεξαγωγή πειραμάτων, καθώς η επιφάνεια του καταστρεφόταν πολύ εύκολα, γεγονός που οδήγησε στο συμπέρασμα ότι κατάλληλες επιφάνειες χρυσού ήταν αυτές που υπερέβαιναν σε πάχος τα 10nm Au.

Με βάση τις παραπάνω παρατηρήσεις, αύξηση της ευαισθησίας του ακουστικού βιοαισθητήρα παρατηρείται, στις μικροσυσκευές που διαθέτουν το ίδιο πάχος χρυσού και αυξανόμενο πάχος κυματοδηγού, καθώς και για αυτές που έχουν το ίδιο πάχος PMMA και αυξανόμενο πάχος χρυσού. Τα αποτελέσματα ήταν αρκετά σημαντικά, καθώς ξεκαθάρισαν ότι η αύξηση της ευαισθησίας της μικροσυσκευής θα επιτυγχανόταν με αύξηση τόσο του πάχους του κυματοδηγού, όσο και του στρώματος του χρυσού. Επίσης κατάλληλες επιφάνειες χρυσού για την διεκπεραίωση ακουστικών πειραμάτων, ήταν αυτές που υπερέβαιναν σε πάχος τα 10nm Au.

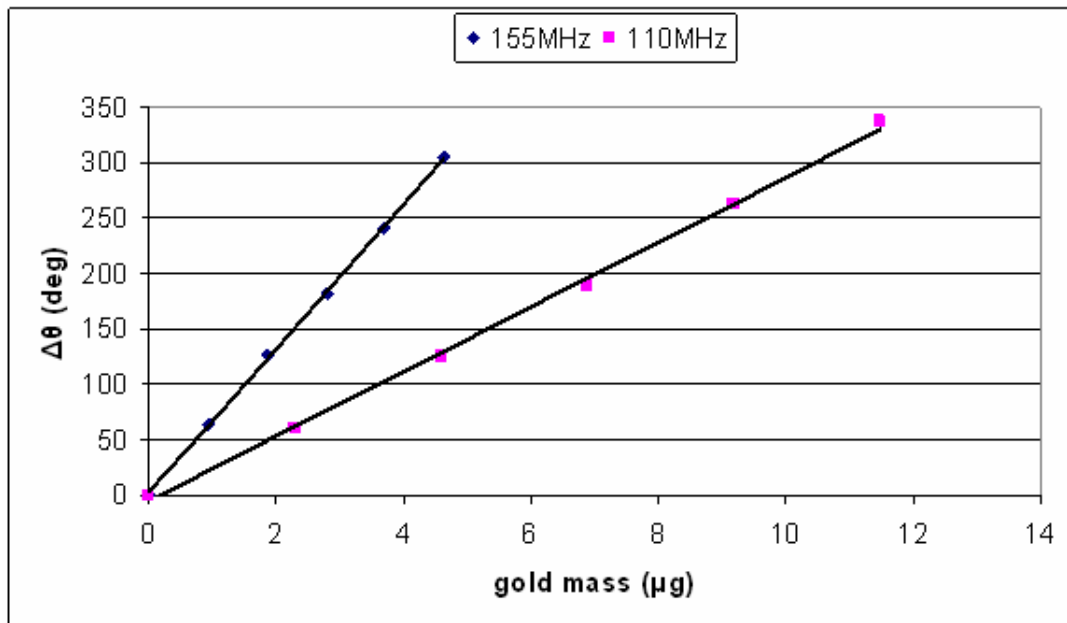
Τα πειράματα αυτά ήταν ενδεικτικά της ανάγκης για βελτιστοποίηση των πειραματικών συνθηκών, καθώς ήταν εμφανείς οι διαφοροποιήσεις στα αποτελέσματα, ανάμεσα σε διαφορετικές μικροσυσκευές παρόλο που η επιφάνεια τους ήταν ίδια. Έτσι έπρεπε να δημιουργηθεί ένα σύστημα βαθμονόμησης, για τον έλεγχο της ευαισθησίας της μικροσυσκευής. Το πρόβλημα εντοπίστηκε επίσης στην διαδικασία αναγέννησης της επιφάνειας, που πραγματοποιήθηκε με χάραξη με χημεία πλάσματος, όπου ενώ ήταν δυνατός ο έλεγχος του πάχους του χρυσού που εναποτίθενται στην επιφάνεια της συσκευής, δεν ήταν δυνατός ο έλεγχος της ποσότητας του χρυσού που απομακρυνόταν από αυτήν κατά τον καθαρισμό για την επαναχρησιμοποίηση της.

4.2.Βαθμονόμηση (calibration) και χαρακτηρισμός των μικροσυσκευών 110MHz και 155MHz του ακουστικού βιοαισθητήρα Love.

4.2.1.Βαθμονόμηση των μικροσυσκευών 110MHz και 155MHz του ακουστικού βιοαισθητήρα Love.

Οι διακυμάνσεις που παρατηρήθηκαν μεταξύ των διαφορετικών ακουστικών μικροσυσκευών παρόλο που η επιφάνεια τους ήταν ίδια, έδειξε την ανάγκη για χρήση της ίδιας μικροσυσκευής για την βαθμονόμηση ως προς την εναπόθεση του χρυσού στην επιφάνεια, αλλά και για την μέτρηση της ευαισθησίας της συσκευής. Επίσης η έλλειψη επαναληψιμότητας που παρατηρήθηκε στα προηγούμενα πειράματα, οδήγησε στη δημιουργία ενός τρόπου εξέτασης της επιφάνειας της ακουστικής μικροσυσκευής, με σκοπό την αναγέννηση της, έτσι ώστε κάθε φορά να είναι γνωστό το ακριβές πάχος του χρυσού που έχει εναποτεθεί σε αυτή.

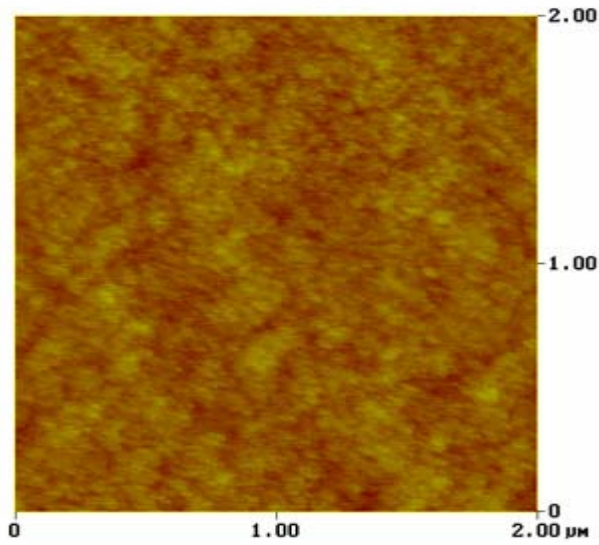
Βασιζόμενοι στο γεγονός ότι οι μεταβολές στη φάση του ακουστικού κύματος είναι ανάλογες με την μάζα που εναποτίθεται στην επιφάνεια της συσκευής (Gizeli, E. And Lowe, C.R, 2002), πραγματοποιήθηκαν πειράματα με σκοπό τη συσχέτιση της παρατηρούμενης πτώσης στην φάση με την ποσότητα του χρυσού που εναποτίθονταν ή αφαιρούνταν από την επιφάνεια. Τα πειράματα βασίστηκαν αρχικά στην εναπόθεση ενός στρώματος χρυσού γνωστού πάχους, στην επιφάνεια και στην συνέχεια στον υπολογισμό της ποσότητας του χρυσού που αφαιρούνταν, για συγκεκριμένο χρόνο, μετά από χάραξη με χημεία πλάσματος (plasma etching) για συγκεκριμένα σημεία μάρτυρα (markers) της φάσης του ακουστικού σήματος στον αέρα. Επίσης έγινε σταδιακή εναπόθεση μάζας χρυσού (4nm κάθε φορά) και υπολογίστηκε, η πτώση στη φάση κατά την διάρκεια της, με όμοιο με τον παραπάνω τρόπο. Στην συνέχεια συσχετισθήκαν οι μεταβολές, στην φάση του ακουστικού κύματος με την μάζα χρυσού που εναποτίθεται ή αφαιρείται από την επιφάνεια και έτσι δημιουργήθηκε μια εξίσωση με βάση την οποία, κάθε φορά ξέροντας την τιμή της φάσης, υπολογιζόταν η ακριβής ποσότητα χρυσού και το πάχος του. Η ευαισθησία των μικροσυσκευών 110MHz και 155MHz ήταν αντίστοιχα 29.2deg/μg Au και 65.0deg/ μg Au (Εικόνα 10).



Εικόνα 10: Η μεταβολή στη φάση που παρατηρείται κατά την εναπόθεση χρυσού (sputtering) με χημεία πλάσματος σε επιφάνειες των μικροσυσκευών 110MHz (17% PMMA, 20nmAu) και 155MHz (8% PMMA, 20nm Au).

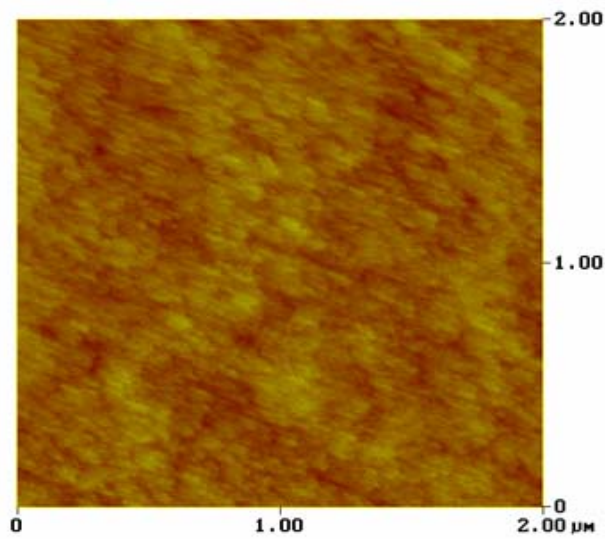
4.2.2. Χαρακτηρισμός της επιφάνειας, των μικροσυσκευών 110MHz και 155MHz του ακουστικού βιοαισθητήρα Love.

Προκειμένου να υπάρξει μια συνολική εικόνα της επιφάνειας των ακουστικών μικροσυσκευών με τα πολυμερή, εξετάστηκε η τραχύτητα της επιφάνειας. Για τον λόγο αυτό κρύσταλλοι χαλαζία (quartz crystals) επικαλύφθηκαν με PMMA πάχους 1μm, 2.45μm και 2.65μm αντίστοιχα, με τρόπο πανομοιότυπο όπως και οι χρησιμοποιούμενες μικροσυσκευές. Η παρατήρηση των επιφανειών και οι μετρήσεις των τραχυτήτων τους πραγματοποιήθηκαν με την βοήθεια του Μικροσκοπίου Ατομικών Δυνάμεων (AFM). Όπως φαίνεται στις Εικόνες 11,12,13 οι επιφάνειες ήταν λείες και ομοιόμορφες με ενεργό τιμή της τραχύτητας (Root mean square, RMS) $0,304 \pm 0.026\text{nm}$.



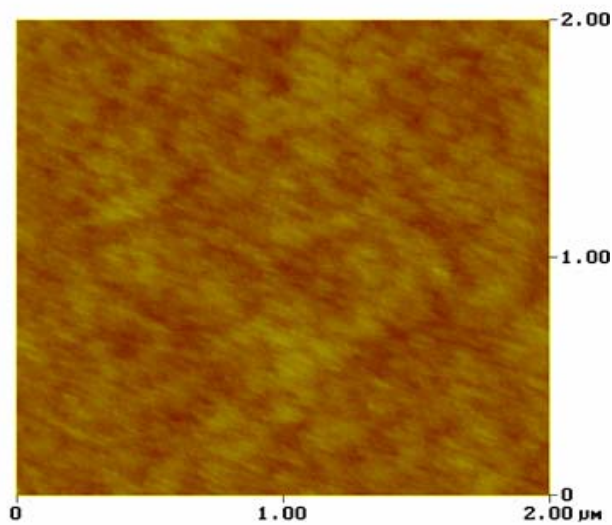
Εικόνα 11: AFM σε επιφάνεια χαλαζία, επικαλυμμένη με PMMA πάχους 1μm.

RMS: 0.314 nm



Εικόνα 12: AFM σε επιφάνεια χαλαζία, επικαλυμμένη με PMMA πάχους 2.45μm.

RMS: 0.324 nm



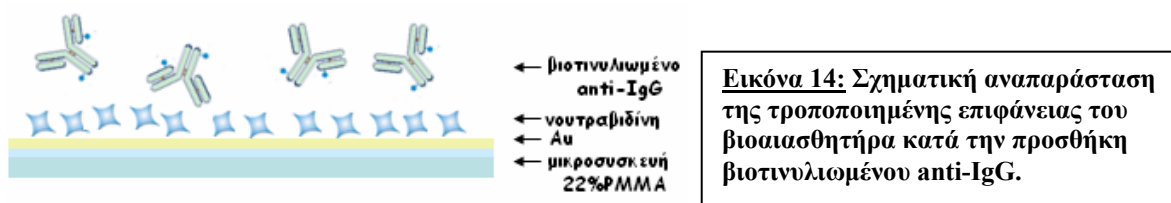
Εικόνα 13: AFM σε επιφάνεια χαλαζία, επικαλυμμένη με PMMA πάχους 2.65μm.

RMS: 0.274 nm

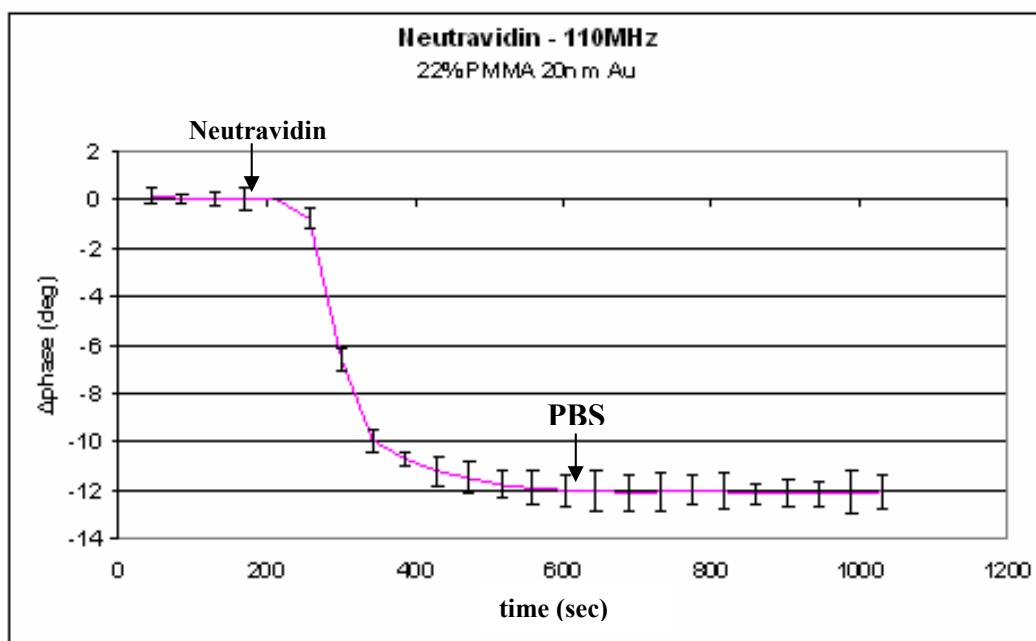
4.3.Συσγέτιση της ευαισθησίας της ακουστικής μικροσυσκευής με την συχνότητα λειτουργίας της και το πάχος του κυματοδηγού (PMMA).

4.3.1.Πειράματα με μικροσυσκευή 110MHz , PMMA πάχους 2.45μm και 20nm Au

Πραγματοποιήθηκαν πειράματα με τον ακουστικό βιοαισθητήρα των 110MHz, όπου η μικροσυσκευή επικαλύφθηκε με PMMA πάχους 2.45μm και 20nm χρυσού. Αρχικά προσροφήθηκε ένα στρώμα νουτραβιδίνης (66kD), στο στρώμα χρυσού και κατόπιν προστέθηκε το βιοτινυλιωμένο μόριο (πρωτεΐνη anti-IgG, 150kD) (Εικόνα 14).

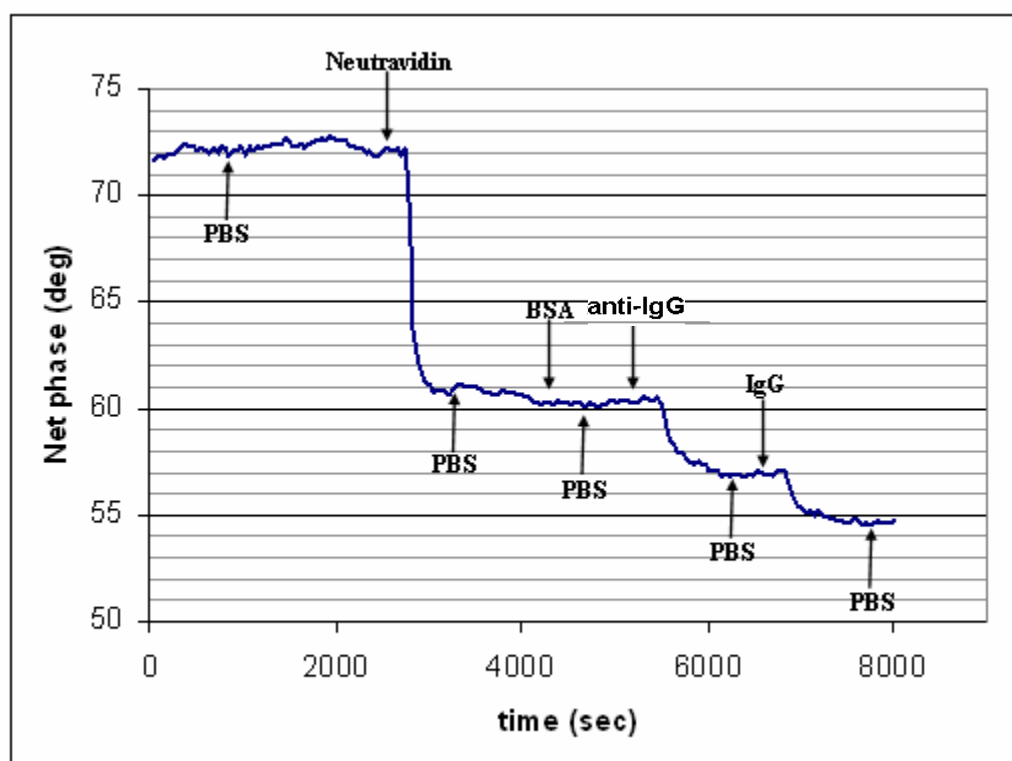


Σε όλα τα πειράματα, που πραγματοποιήθηκαν κάτω από αυτές τις συνθήκες, παρατηρήθηκε καλή επαναληψιμότητα στην πτώση της φάσης με την προσθήκη της νουτραβιδίνης, η οποία ήταν $12.15 \pm 1,12 \text{deg}$ όπως φαίνεται από το παρακάτω διάγραμμα (Εικόνα 15).

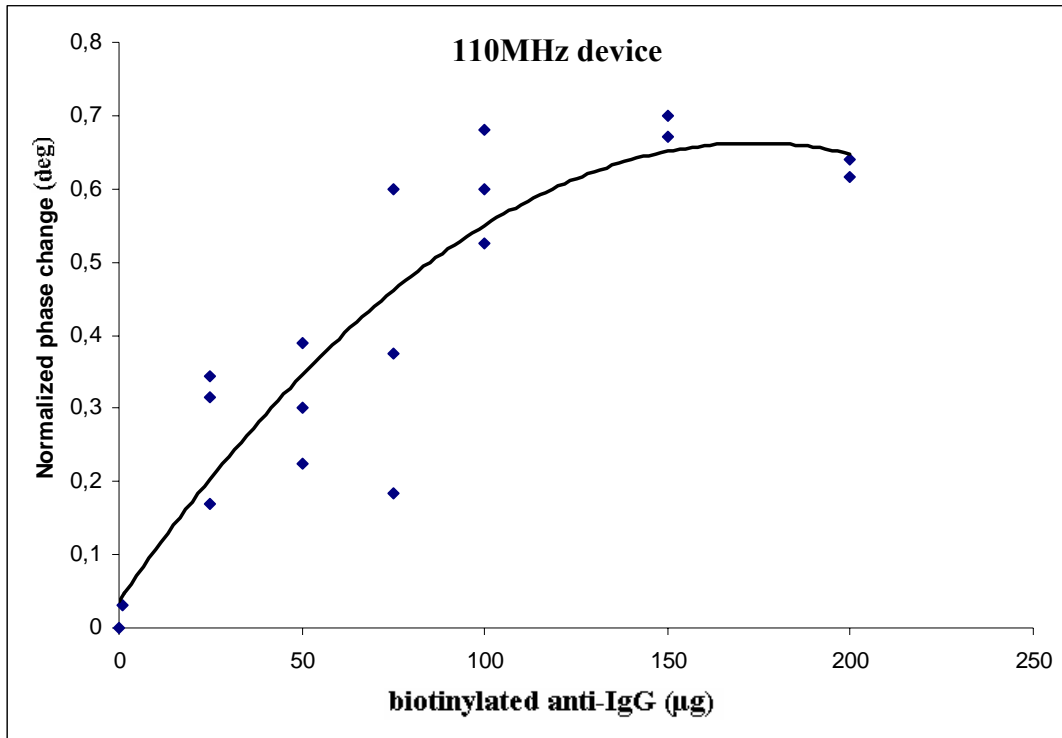


Εικόνα 15: Η μέση πτώση της φάσης του ακουστικού κύματος κατά τη προσθήκη νουτραβιδίνης στον ακουστικό βιοαισθητήρα 110MHz (22% PMMA, 20nmAu).

Πάνω στο στρώμα της νουτραβιδίνης, προστέθηκαν μια σειρά από διαφορετικές συγκεντρώσεις του βιοτυλιωμένου μορίου 1μg/ml, 25μg/ml, 50μg/ml, 75μg/ml, 100μg/ml, 150μg/ml και 200μg/ml. Η ειδική πρόσδεση της νουτραβιδίνης με την βιοτυλιωμένη πρωτεΐνη (που βασίζεται στο σύστημα αναγνώρισης αβιδίνης - βιοτίνης), εξακριβώνεται με την προσθήκη της πρωτεΐνης BSA, η οποία δεν είναι βιοτυλιωμένη και δεν προκαλεί πτώση στη φάση. Η πρόσδεση του βιοτυλιωμένου αντι-αντισώματος IgG (anti-IgG) στην νουτραβιδίνη, επαληθεύτηκε με πειράματα κατά τα οποία, μετά την προσθήκη της βιοτυλιωμένης πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε προσθήκη του αντισώματος IgG το οποίο και προσδέθηκε στο αντι-αντίσωμα. Η πρόσδεση αυτή είχε ως αποτέλεσμα την πτώση στην φάση του ακουστικού κύματος (Εικόνα 16). Τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν με τις παραπάνω συνθήκες φαίνονται στο παρακάτω διάγραμμα (Εικόνα 17).



Εικόνα 16: Αρχικά πραγματοποιείται εξισορρόπηση με διάλυμα PBS, όπως και μετά από την προσθήκη του κάθε δείγματος. Η μεταβολή στη φάση κατά την προσθήκη νουτραβιδίνης, BSA, anti-IgG και IgG.

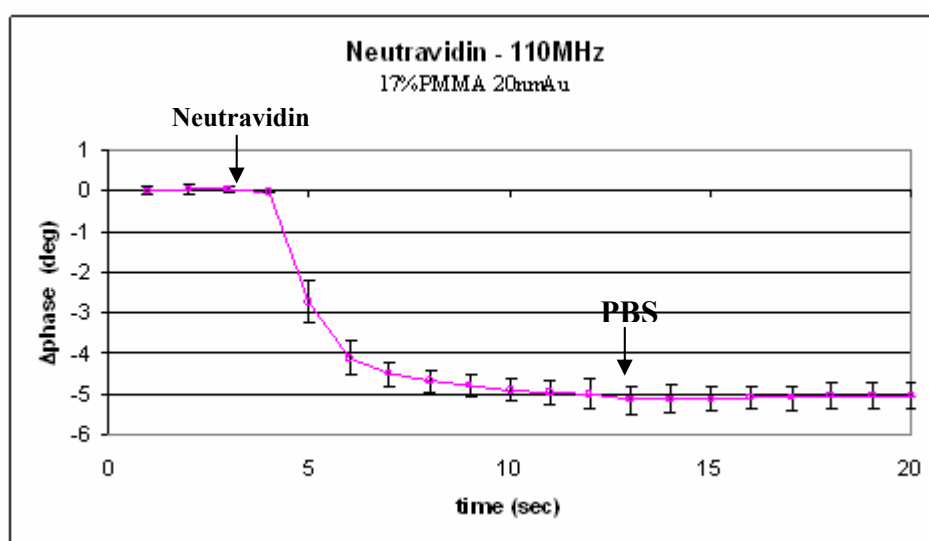


Εικόνα 17: Διάγραμμα της κανονικοποιημένης ως προς τη νουτραβιδίνη, μεταβολής στη φάση συναρτήσει της μάζας που προστίθεται στην επιφάνεια του ακουστικού βιοαισθητήρα.

Στο διάγραμμα φαίνεται η κανονικοποιημένη ως προς τη μεταβολή που προκαλεί η νουτραβιδίνη, μεταβολή στη φάση συναρτήσει των τιμών της μάζας σε μg , που προστέθηκαν στην επιφάνεια του αισθητήρα, σε κάθε πείραμα. Γίνεται εμφανές ότι η επιφάνεια φτάνει σε κορεσμό μετά από την προσθήκη $150\mu\text{g}$ της βιοτινυλιωμένης πρωτεΐνης. Επίσης η μικρότερη ποσότητα IgG που μπορεί να ανιχνεύσει ο βιοαισθητήρας είναι $1\mu\text{g}$ βιοτινυλιωμένης πρωτεΐνης. Τα αποτελέσματα δεν έχουν καλή επαναληψιμότητα, καθώς για την προσθήκη ίδιας μάζας πρωτεΐνης, παρατηρούνται διαφορετικές μεταβολές στην φάση του ακουστικού κύματος, που διαφέρουν πολύ μεταξύ τους. Πιθανά η φτωχή επαναληψιμότητα να οφείλεται σε διακυμάνσεις στις συνθήκες των πειραμάτων κυρίως θερμοκρασιακές, καθώς και στο πάχος του πολυμερούς που ήταν οριακό ως προς την ευαισθησία της συσκευής επηρεάζοντας σημαντικά το σύστημα. Η παραπάνω παρατηρήσεις βοήθησαν στην σωστή διεξαγωγή των μετέπειτα πειραμάτων μέσω του σωστότερου ελέγχου των συνθηκών διεξαγωγής τους.

4.3.2. Πειράματα με μικροσυσκευή 110MHz, PMMA πάχους 1μm και 20nm Au

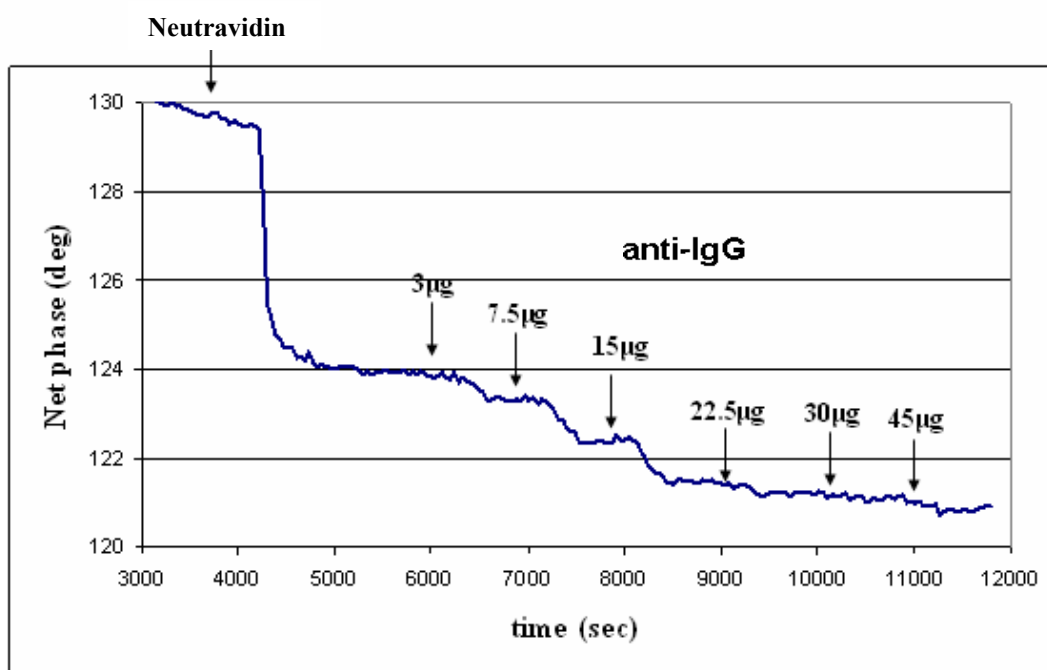
Το επόμενο βήμα ήταν η επικάλυψη της επιφάνειας της μικροσυσκευής, με λιγότερο πυκνό διάλυμα πολυμερούς (πάχος PMMA μικρότερο από 2.45μm) και η πραγματοποίηση πειραμάτων με τη βιοτινυλιωμένη πρωτεΐνη. Έτσι λοιπόν ο βιοαισθητήρας των 110MHz επικαλύφθηκε με PMMA πάχους 1μm και στην συνέχεια 20nm Au. Καταρχήν προσροφήθηκε ένα στρώμα νουτραβιδίνης, στο στρώμα χρυσού και κατόπιν προστέθηκε το βιοτινυλιωμένο μόριο (πρωτεΐνη anti-IgG). Σε όλα τα πειράματα, που πραγματοποιήθηκαν κάτω από αυτές τις συνθήκες, παρατηρήθηκε καλή επαναληψιμότητα στην πτώση της φάσης με την προσθήκη της νουτραβιδίνης, η οποία ήταν $5 \pm 0.5 \text{ deg}$ όπως φαίνεται από το παρακάτω διάγραμμα (Εικόνα 18). Η πτώση στη φάση της νουτραβιδίνης ήταν μικρότερη, από ότι στη μικροσυσκευή καλυμμένη με PMMA πάχους 2.45μm. Αυτό ήταν λογικό, καθώς αύξηση της συγκέντρωσης του πάχους του πολυμερούς οδηγεί σε αύξηση της ευαισθησίας.



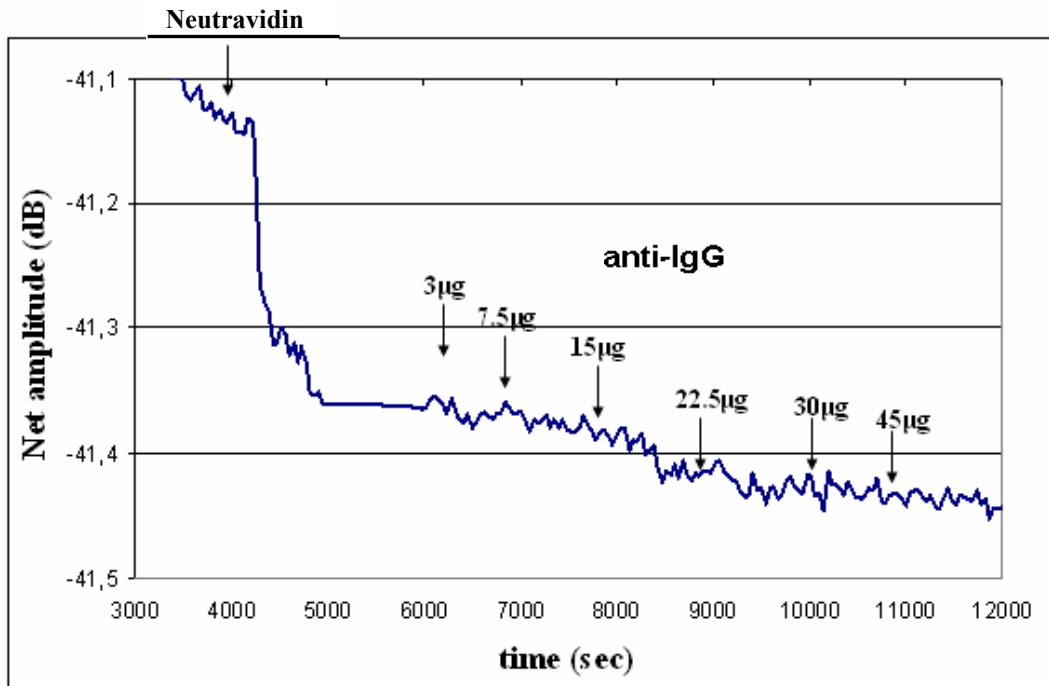
Εικόνα 18: Η μέση πτώση της φάσης του ακουστικού κύματος κατά την προσθήκη νουτραβιδίνης στον ακουστικό βιοαισθητήρα 110MHz (17% PMMA, 20nmAu).

Πάνω στο στρώμα της νουτραβιδίνης, προστέθηκαν σε σειρά διαφορετικές συγκεντρώσεις του βιοτινυλιωμένου μορίου anti-IgG 10μg/ml, 25μg/ml, 50μg/ml, 75μg/ml, 100μg/ml και 150μg/ml και το κάθε δείγμα είχε όγκο 300μl. Δηλαδή η μάζα

του κάθε δείγματος ήταν αντίστοιχα 3μg, 7.5μg, 15μg, 22,5μg, 30μg και 45μg (Εικόνα 19). Επίσης καταγράφηκαν και οι μεταβολές της πτώσης του πλάτους. Στο παρακάτω διάγραμμα (Εικόνα 20) φαίνεται η μεταβολή που προκαλεί η νουτραβιδίνη στο πλάτος συναρτήσει των τιμών της μάζας σε μg που προστέθηκαν στην επιφάνεια του αισθητήρα. Οι πτώσεις στις τιμές του πλάτους για το βιοτινυλιωμένο μόριο, είναι μικρές (από 0.02 έως 0.04 dB) ή μηδενικές (στα όρια του θορύβου), δηλαδή πρακτικά δεν είναι εφικτή η παρατήρηση μεγάλων μεταβολών στις τιμές του. Είναι γνωστό πως η μεταβολή στην ενέργεια του κύματος σχετίζεται με το πλάτος, που συνδέεται με την διαμόρφωση των μορίων. Η πρωτεΐνη IgG, όπως σχεδόν όλες οι πρωτεΐνες, διαθέτει σφαιρική δομή με αποτέλεσμα κατά την πρόσδεση της στην επιφάνεια της νουτραβιδίνης, να δημιουργεί ένα συμπαγές στρώμα. Η δημιουργία του συμπαγούς αυτού πρωτεϊνικού στρώματος, πιθανά έχει ως αποτέλεσμα αυτό να ακολουθεί την ταλάντωση της επιφάνειας της μικροσυσκευής χωρίς ιδιαίτερες αντιστάσεις άρα και απώλειες ενέργειας, που μεταφράζονται σε μικρές αλλαγές στο πλάτος του παρατηρούμενου κύματος (Andle, J.C., 1995).

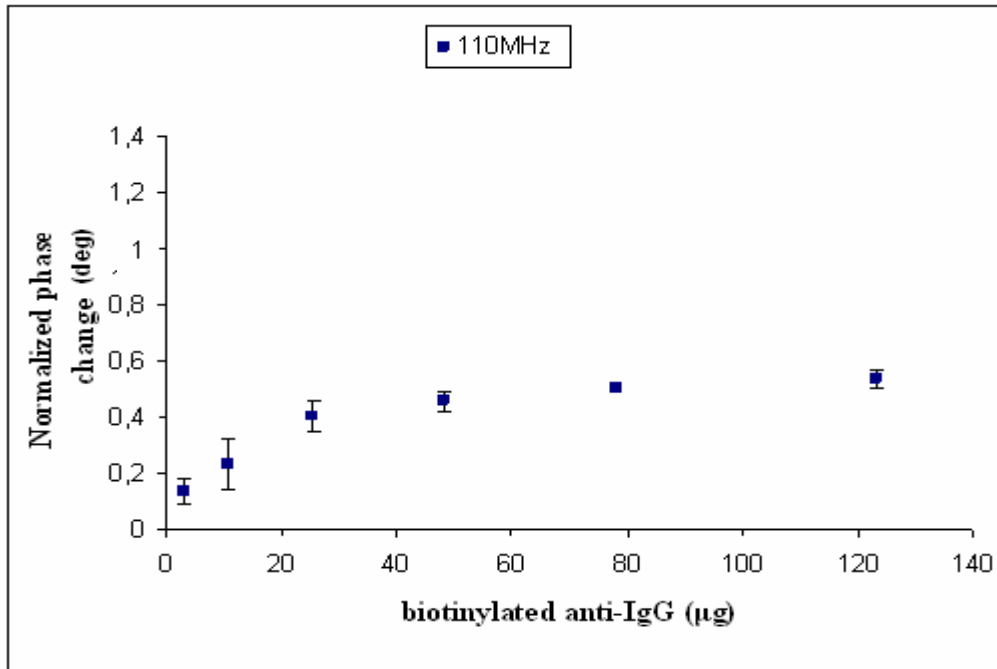


Εικόνα 19: Η μεταβολή στη φάση κατά την προσθήκη νουτραβιδίνης, και αυξανόμενης μάζας βιοτινυλιωμένης anti-IgG.

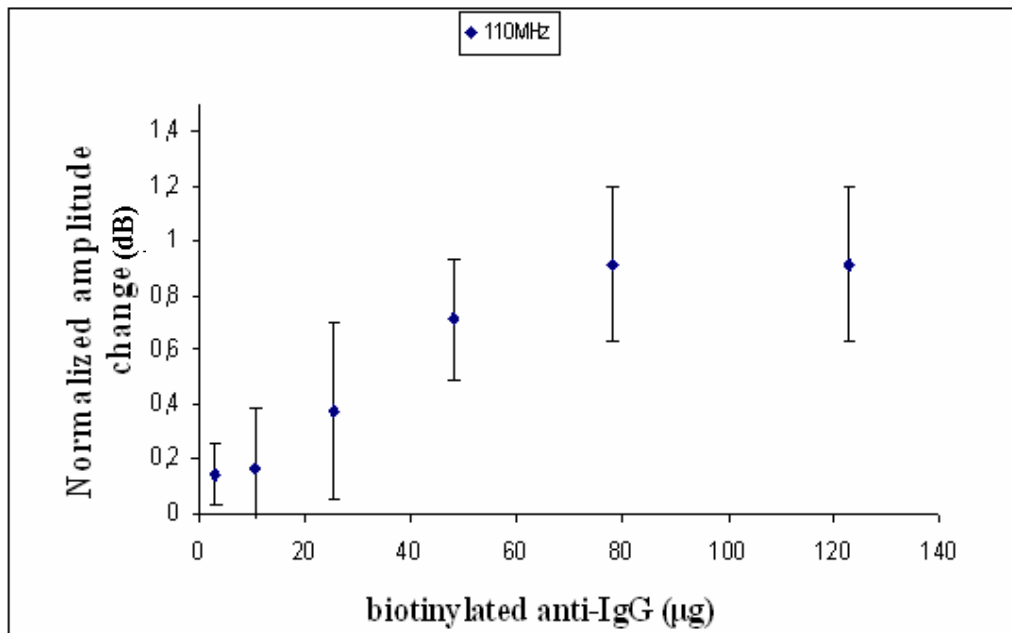


Εικόνα 20: Η μεταβολή στο πλάτος κατά την προσθήκη νουτραβιδίνης, και αυξανόμενης μάζας βιοτινυλιωμένης anti-IgG.

Αθροίζοντας κάθε φορά την κανονικοποιημένη, ως προς την νουτραβιδίνη, τιμή της πτώσης της φάσης ή του πλάτους, του πρώτου δείγματος και την αντίστοιχη τιμή του επόμενου και κάνοντας αυτό και στις τιμές της μάζας που φορτώνονταν για όλα τα δείγματα, προκύπτουν οι πτώσεις της φάσης ή αντίστοιχα του πλάτους, για καθεμία από τις εξής τιμές μάζας : 3µg, 10.5µg, 25.5µg, 48µg, 78µg και 123µg. Στα πειράματα αυτά παρατηρήθηκε καλή επαναληψιμότητα των κανονικοποιημένων ως προς τη μεταβολή που προκαλεί η νουτραβιδίνη, μεταβολών στη φάση. Όσο αυξάνεται η μάζα που προστίθεται στην επιφάνεια τόσο μεγαλύτερες είναι οι πτώσεις στη φάση αλλά και το πλάτος που παρατηρούμε (Εικόνες 21 και 22). Έτσι δημιουργήθηκε ένας ακουστικός ανοσο-βιοαισθητήρας, βασισμένος στο σύστημα αναγνώρισης αβιδίνης – βιοτίνης και ειδικός για την αναγνώριση αντισωμάτων IgG.

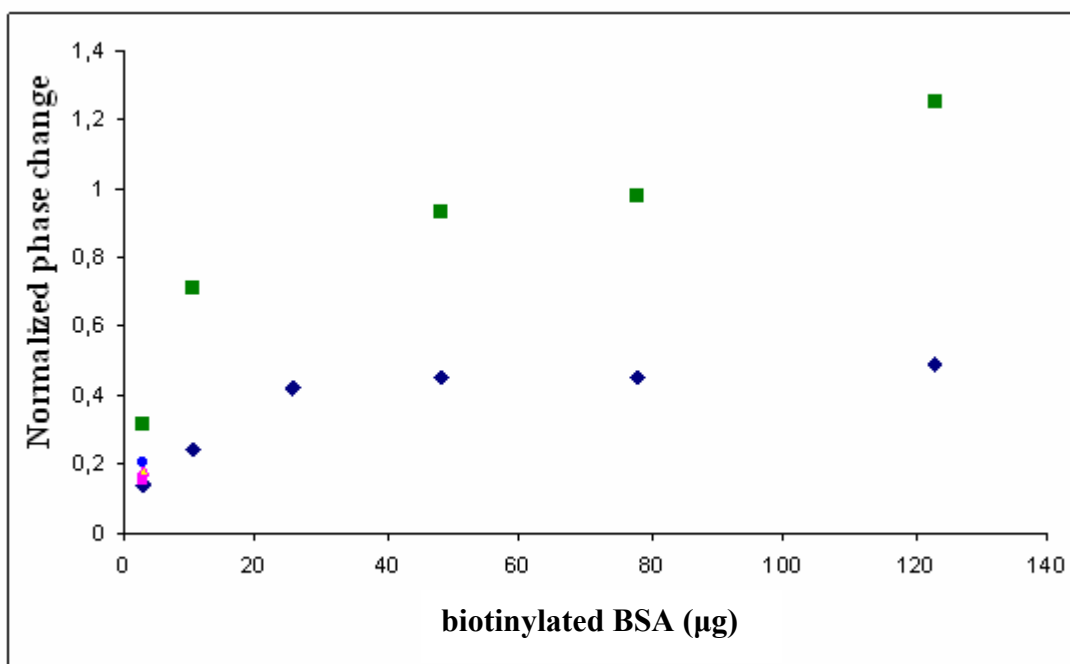


Εικόνα 21: Διάγραμμα της κανονικοποιημένης ως προς τη νουτραβιδίνη, μεταβολής στη φάση συναρτήσει της μάζας (βιοτινυλωμένη anti-IgG) που προστίθεται στην επιφάνεια του ακουστικού βιοαισθητήρα.



Εικόνα 22: Διάγραμμα της κανονικοποιημένης ως προς τη νουτραβιδίνη, μεταβολής στο πλάτος συναρτήσει της μάζας (βιοτινυλωμένη anti-IgG) που προστίθεται στην επιφάνεια του ακουστικού βιοαισθητήρα.

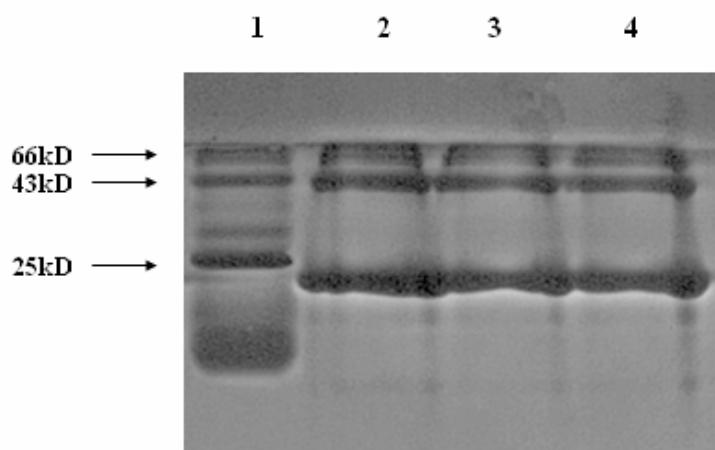
Οι πτώσεις στη φάση σχετίζονται κυρίως με τις μεταβολές στη μάζα. Επιπλέον οι μεταβολές στο πλάτος σχετίζονται με μεταβολές της ιξωδοελαστικότητας που συνδέονται με την διαμόρφωση των πρωτεϊνών. Η σκέψη ήταν ότι διαφορετικές πρωτεΐνες, ως προς το μοριακό βάρος και τη στερεοδομή, κατά την επαφή τους με την επιφάνεια του αισθητήρα θα εμφανίζουν διαφορετικές μεταβολές των χαρακτηριστικών του ακουστικού κύματος. Με γνώμονα αυτό θα μπορούσε να δημιουργηθεί, ένας αισθητήρας που βάσει των μεταβολών, του ακουστικού κύματος, θα μπορεί να διαχωρίζει πρωτεΐνες. Για τα πειράματα αυτά χρησιμοποιήθηκε και μια δεύτερη βιοτινυλιωμένη πρωτεΐνη η BSA, χρησιμοποιώντας τις ίδιες συνθήκες (διαλύματα και συγκεντρώσεις) όπως και με το αντι-αντίσωμα IgG. Τα αποτελέσματα αυτών των πειραμάτων δεν ήταν επαναλήψιμα. Παρατίθεται μερικά από αυτά τα πειράματα και πιο συγκεκριμένα το διάγραμμα της κανονικοποιημένης ως προς τη νουτραβιδίνη, μεταβολής στη φάση συναρτήσει της μάζας της βιοτινυλιωμένης BSA που προστίθεται στην επιφάνεια της μικροσυσκευής (Εικόνα 23).



Εικόνα 23: Διάγραμμα της κανονικοποιημένης ως προς τη νουτραβιδίνη, μεταβολής στη φάση συναρτήσει της μάζας (βιοτινυλιωμένη BSA) που προστίθεται στην επιφάνεια του ακουστικού βιοαισθητήρα.

Όπως φαίνεται και από το παραπάνω διάγραμμα σε τρία από τα πέντε πειράματα, η πτώση κατά την προσθήκη 3μg πρωτεΐνης είναι παρόμοια ενώ για καμία

άλλη συγκέντρωση δεν παρατηρείται πτώση. Επίσης δύο εκ των πειραμάτων παρουσιάζουν τελείως διαφορετική εικόνα. Η απουσία επαναληψιμότητας στα πειράματα με την βιοτινυλιωμένη BSA, οδήγησε στην πραγματοποίηση native πηκτώματος πολυακρυλαμίδης για την εξακρίβωση, της φυσικής κατάστασης της πρωτεΐνης (Εικόνα 24). Στο πήκτωμα φορτώθηκαν δύο δείγματα του ίδιου stock, που διατηρούνταν στους -20°C και 4°C .



Εικόνα 24:

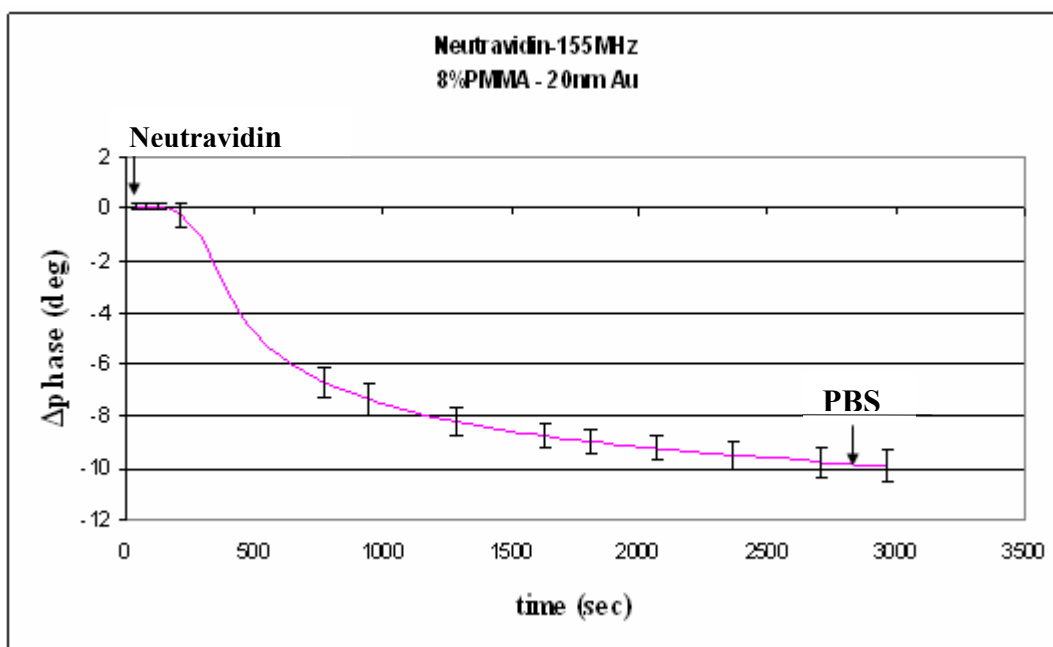
1. Πρωτεϊνικός μάρτυρας
2. Βιοτινυλιωμένη BSA (-20°C , stock)
3. Βιοτινυλιωμένη BSA (4°C , από το ίδιο stock)
4. Βιοτινυλιωμένη BSA (4°C , από το ίδιο stock που φορτώθηκε σε ένα από τα πειράματα)

Όπως φαίνεται και στην εικόνα, εκτός από την μονομερή μορφή της βιοτινυλιωμένης πρωτεΐνης BSA (66kD), εντοπίζονται και πρωτεολυμένα κομμάτια της. Το γεγονός αυτό αιτιολογεί τα παραπάνω ακουστικά αποτελέσματα. Χρειάζεται να γίνουν και άλλα πειράματα, με διαφορετικές πρωτεΐνες, έτσι ώστε να συσχετιστούν οι μεταβολές στη φάση και το πλάτος με τις χαρακτηριστικές ιδιότητες της κάθε πρωτεΐνης (δομή, MB κ.α), για συγκεκριμένες πάντα συνθήκες λειτουργίας του συστήματος του ακουστικού αισθητήρα.

4.3.2. Πειράματα με μικροσυσκευή 155MHz, PMMA πάχους 0.4μm, 20nm Au και σύγκριση με την μικροσυσκευή 110MHz

Πραγματοποιήθηκαν ακουστικά πειράματα, με την βιοτινυλιωμένη πρωτεΐνη anti-IgG, χρησιμοποιώντας τις ίδιες συνθήκες, για τη μελέτη της ευαισθησίας της μικροσυσκευής 155MHz και για τη σύγκριση των αποκρίσεων των δύο βιοαισθητήρων (155MHz και 110MHz) για τα ίδια πρωτεϊνικά μόρια. Η μόνη διαφορά ως προς τις συνθήκες διεξαγωγής των πειραμάτων, σε σχέση με αυτές που πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα στον βιοαισθητήρα 110 MHz, ήταν στο πάχος

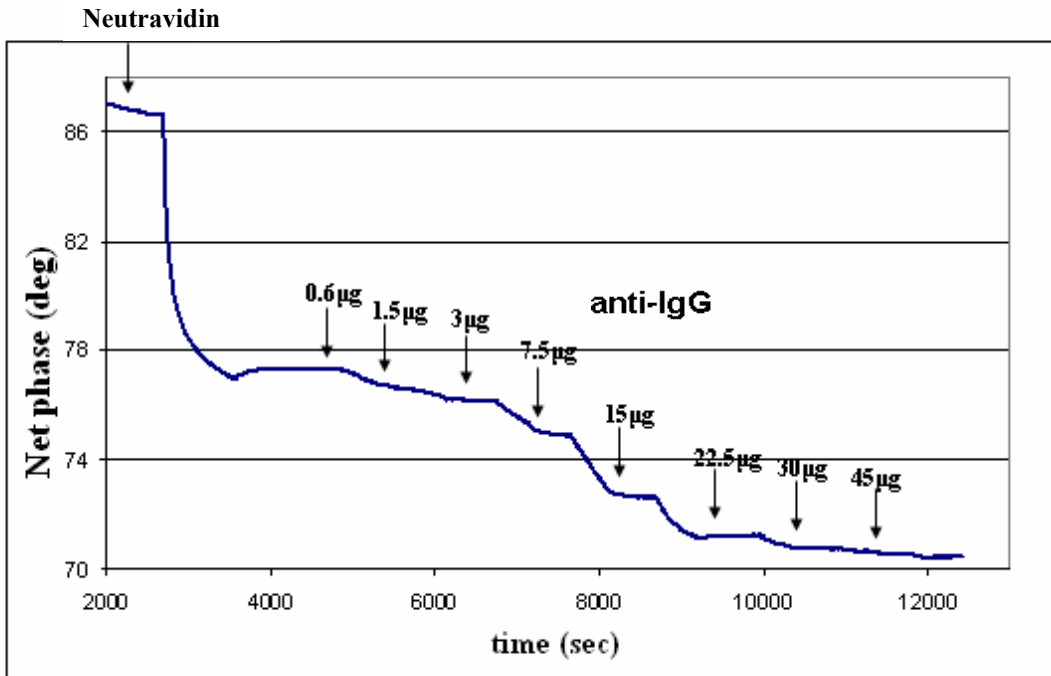
του πολυμερούς που ήταν 0.4μm και επίσης ότι στην επιφάνεια φορτώθηκαν και άλλες δύο συγκεντρώσεις (2μg/ml και 5μg/ml βιοτινυλιωμένου anti-IgG), μικρότερες από τα 10μg/ml καθώς ο βιοαισθητήρας με συχνότητα λειτουργίας 155MHz είναι πιο ευαίσθητος, σε μικρές συγκεντρώσεις, από τον 110 MHz. Σε όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, παρατηρήθηκε καλή επαναληψιμότητα στην πτώση της φάσης με την προσθήκη της νουτραβιδίνης, η οποία ήταν $10 \pm 1.15 \text{ deg}$ όπως φαίνεται από το παρακάτω διάγραμμα (Εικόνα 25). Συγκρίνοντας την μέση πτώση της φάσης του ακουστικού κύματος στον βιοαισθητήρα 155MHz και 110MHz (PMMA πάχους 1μm) αντίστοιχα, παρατηρήθηκε αύξηση της ευαισθησίας κατά 100%.



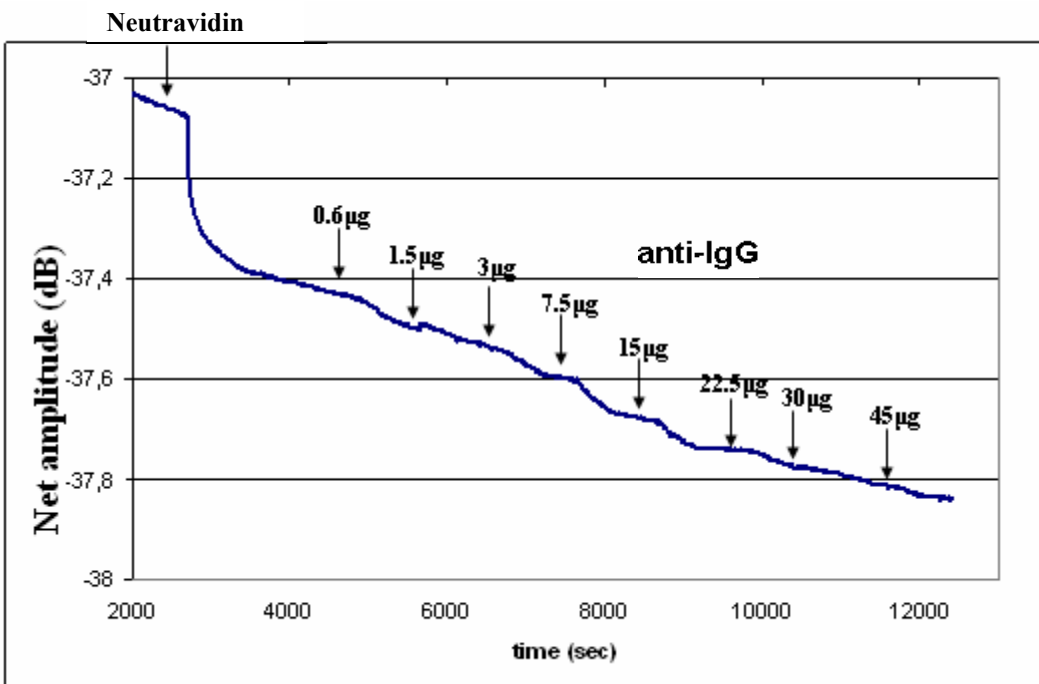
Εικόνα 25: Η μέση πτώση της φάσης του ακουστικού κύματος κατά την προσθήκη νουτραβιδίνης στον ακουστικό βιοαισθητήρα 155MHz (8% PMMA, 20nm Au).

Πάνω στο στρώμα της νουτραβιδίνης, προστέθηκαν σε σειρά διαφορετικές συγκεντρώσεις του βιοτινυλιωμένου μορίου anti-IgG 2μg/ml, 5μg/ml, 10μg/ml, 25μg/ml, 50μg/ml, 75μg/ml, 100μg/ml και 150μg/ml και το κάθε δείγμα είχε όγκο 300μl. Δηλαδή η μάζα του κάθε δείγματος ήταν αντίστοιχα 0.6μg, 1.5μg, 3μg/ml 7.5μg, 15μg/ml 22,5μg, 30μg και 45μg (Εικόνα 26). Επίσης καταγράφηκαν και οι μεταβολές στην πτώση στο πλάτος. Στο παρακάτω διάγραμμα (Εικόνα 27) φαίνεται η μεταβολή που προκαλεί η νουτραβιδίνη στο πλάτος συναρτήσει των τιμών της μάζας σε μg που προστέθηκαν στην επιφάνεια του αισθητήρα. Οι πτώσεις στις τιμές του

πλάτους είναι μικρές (από 0.02 έως 0.4 dB) για το βιοτινυλιωμένο μόριο, δηλαδή πρακτικά δεν μπορούν να παρατηρηθούν μεγάλες μεταβολές στις τιμές του. Αυτό συμβαίνει για τους ίδιους λόγους που αναπτύχθηκαν και για τον ακουστικό βιοαισθητήρα 110 MHz.

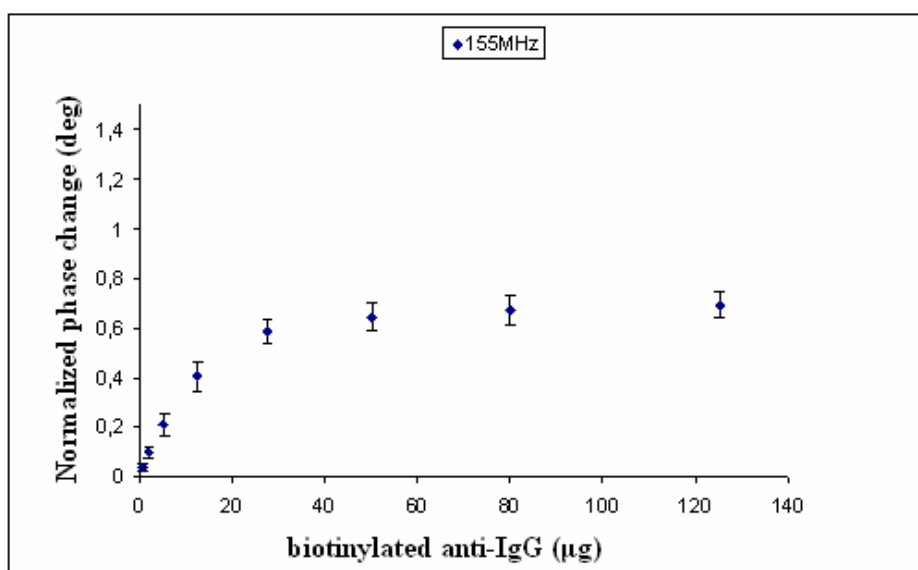


Εικόνα 26: Η μεταβολή στη φάση κατά την προσθήκη νουτραβιδίνης, και αυξανόμενης μάζας βιοτινυλιωμένης anti-IgG.

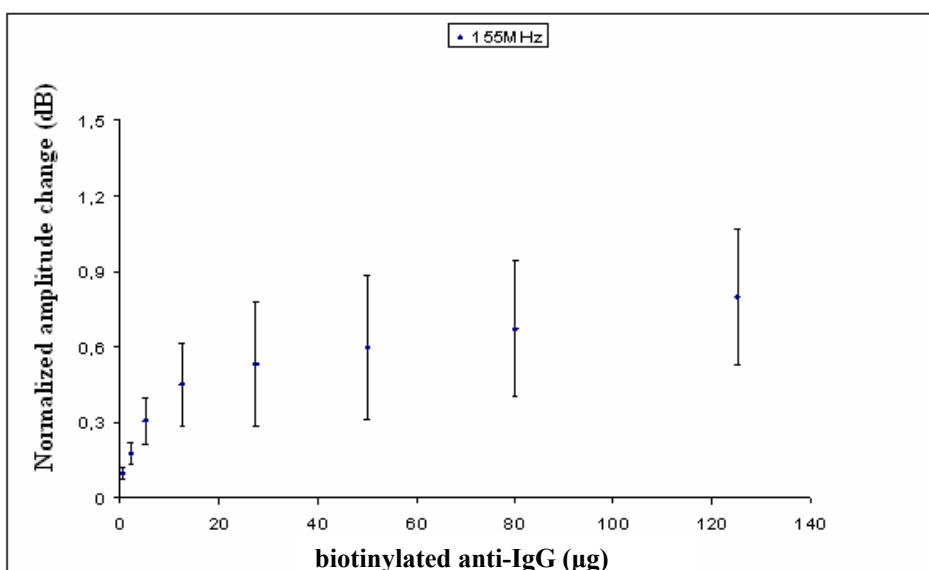


Εικόνα 27: Η μεταβολή στη φάση κατά την προσθήκη νουτραβιδίνης, και αυξανόμενης μάζας βιοτινυλιωμένης anti-IgG.

Αθροίζοντας, όπως και στα πειράματα με τον βιοαισθητήρα 110MHz, κάθε φορά την κανονικοποιημένη, ως προς την νουτραβιδίνη, τιμή της πτώσης της φάσης του πρώτου δείγματος με την αντίστοιχη τιμή του επόμενου, κάνοντας το ίδιο για τις τιμές της μάζας που φορτώνονταν, για όλα τα δείγματα, αλλά και για τις πτώσεις στο πλάτος, προκύπτουν οι πτώσεις της φάσης και του πλάτους για καθεμία από τις εξής τιμές μάζας : 0.6μg, 2.1μg, 5.1μg, 12.6μg, 27.6μg, 50.1μg, 80.1μg και 125.1μg. Η συσχέτιση της μάζας που φορτώνεται στο βιοαισθητήρα με την κανονικοποιημένη πτώση στην φάση και το πλάτος του ακουστικού σήματος, φαίνεται στα παρακάτω διαγράμματα (Εικόνες 28-39).

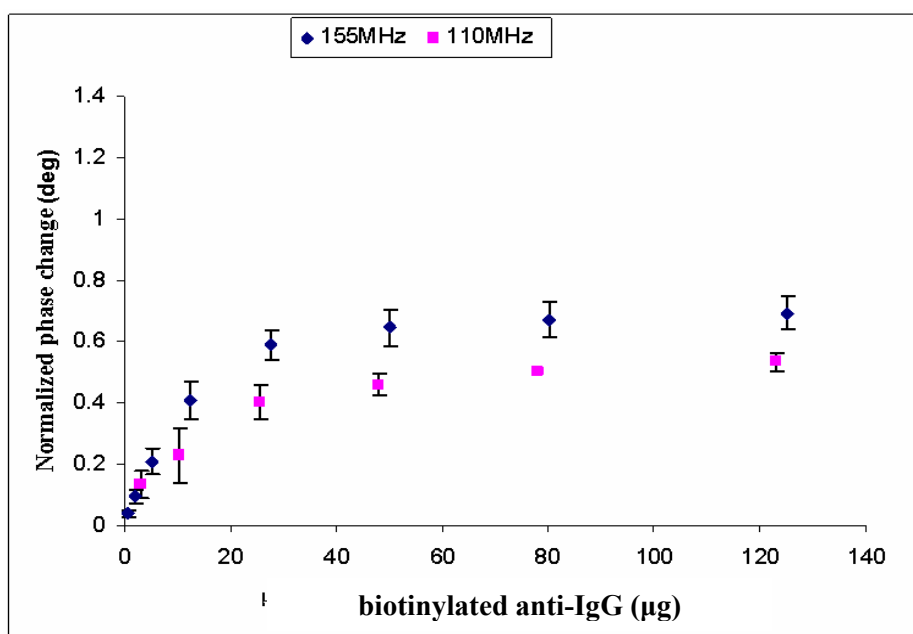


Εικόνα 28: Διάγραμμα της κανονικοποιημένης ως προς τη νουτραβιδίνη, μεταβολής στη φάση συναρτήσει της μάζας (βιοτινυλιωμένη anti-IgG) που προστίθεται στην επιφάνεια του ακουστικού βιοαισθητήρα των 155MHz.

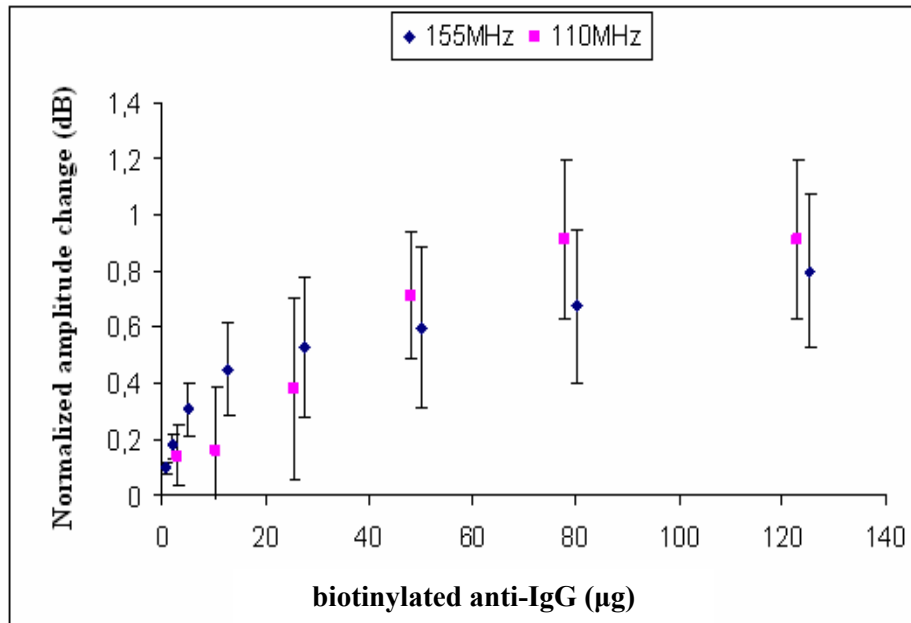


Εικόνα 29: Διάγραμμα της κανονικοποιημένης ως προς τη νουτραβιδίνη, μεταβολής στη φάση συναρτήσει της μάζας (βιοτινυλιωμένη anti-IgG) που προστίθεται στην επιφάνεια του ακουστικού βιοαισθητήρα των 155MHz.

Επίσης συσχετίστηκαν οι τις τιμές, της κανονικοποιημένης ως προς τη νουτραβιδίνη, μεταβολής στη φάση συναρτήσεως της μάζας, για το βιοτινυλιωμένο anti-IgG που προστίθεται στην επιφάνεια του ακουστικού βιοαισθητήρα των 155MHz και οι αντίστοιχες τιμές για τον βιοαισθητήρα των 110MHz. Οι πτώσεις στη φάση, για παρόμοιες μάζες που προστίθενται στην επιφάνεια του αισθητήρα, είναι περίπου ίδιες με μικρές αποκλίσεις και για τις δύο μικροσυσκευές (Εικόνα 30). Συγκρίνοντας τις κανονικοποιημένες πτώσεις στο πλάτος (Εικόνα 31) παρατηρήθηκε ότι και οι δύο βιοαισθητήρες εμφανίζουν τις ίδιες περίπου μεταβολές. Οι παρατηρήσεις αυτές ήταν αναμενόμενες καθότι η κυψελίδα συνεχούς ροής που χρησιμοποιήθηκε, σε καθένα από τους βιοαισθητήρες ήταν διαφορετική. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα να εναποτίθενται παρόμοια και όχι ίδια μάζα στην επιφάνεια των συσκευών.



Εικόνα 30: Σύγκριση της απόκρισης (μεταβολές στη φάση) των ακουστικών μικροσυσκευών 155MHz και 110MHz κατά την προσθήκη αυξανόμενης μάζας του βιοτινυλιωμένου αντι-αντισώματος IgG στην επιφάνεια τους.



Εικόνα 31: Σύγκριση της απόκρισης (μεταβολές στο πλάτος) των ακουστικών μικροσυσκευών 155MHz και 110MHz κατά την προσθήκη αυξανόμενης μάζας του βιοτινυλιωμένου αντι-αντισώματος IgG στην επιφάνεια τους.

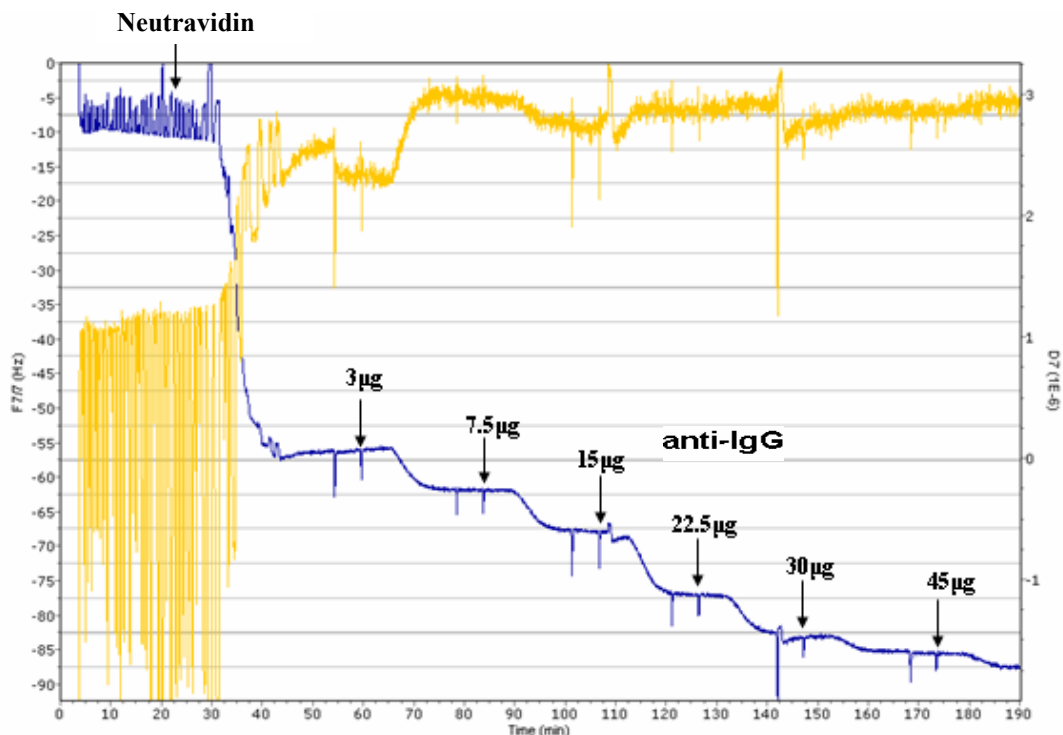
4.4.Ακουστικά πειράματα με βιοτινυλιωμένο αντι-αντίσωμα IgG σε ακουστικό βιοαισθητήρα Q-sense.

Εκτός από τα παραπάνω πειράματα, χρησιμοποιήθηκε ο ακουστικός βιοαισθητήρας *Q-Sense* με σκοπό τον υπολογισμό των τιμών της μάζας ανά επιφάνεια για το βιοτινυλιωμένο anti-IgG. Σκοπός των πειραμάτων αυτών ήταν η εύρεση της μάζας του βιοτινυλιωμένου anti-IgG που εναποτίθεται στην επιφάνεια της μικροσυσκευής. Χρησιμοποιήθηκε ίδιο διάλυμα (PBS), ενώ η συσκευή του βιοαισθητήρα επικαλύφθηκε με PMMA και στην συνέχεια εναποτέθηκε σε αυτή στρώμα χρυσού πάχους 5nm. Ο βιοαισθητήρας *Q-Sense* είναι, όπως αναφέρθηκε και στη εισαγωγή, λιγότερο ευαίσθητος από τους άλλους δύο που έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί (110MHz και 155MHz) αφού λειτουργεί με ακουστικό κύμα όγκου, σε αντίθεση με το ακουστικό κύμα επιφάνειας και διαθέτει χαμηλότερες συχνότητες λειτουργίας (5, 15, 25 και 35MHz). Οι μετρήσεις του παρακολουθούν τη μεταβολή στη συχνότητα, Δf , που είναι αντίστοιχη με τη μεταβολή στη φάση για τους ακουστικούς βιοαισθητήρες Love, και τη μεταβολή στην απόσβεση της ταλάντωσης ΔD , που είναι αντίστοιχη με τη μεταβολή στο πλάτος.

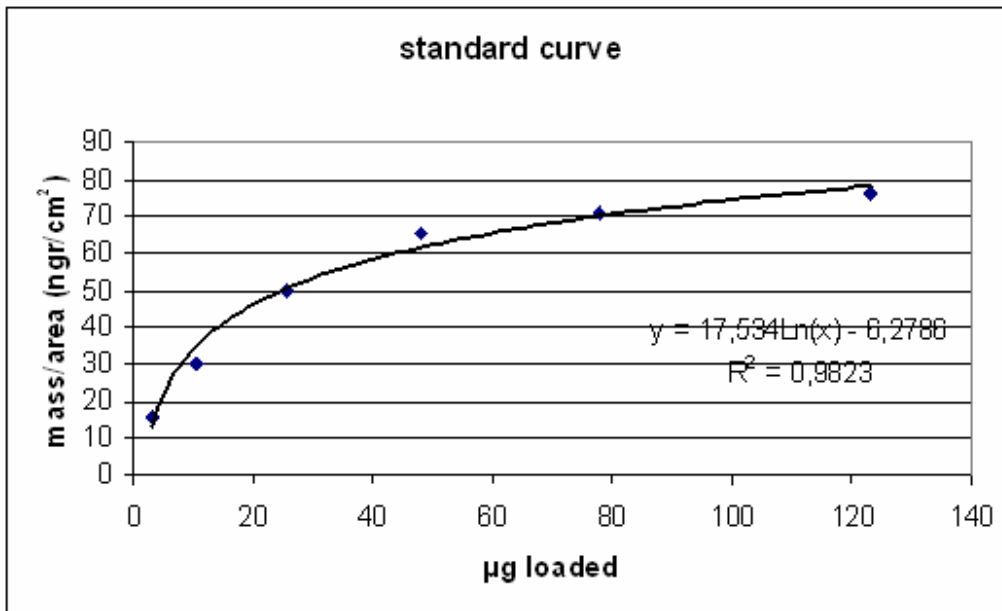
Η μάζα που εναποτίθεται ανά επιφάνεια μπορεί να υπολογιστεί από τη μεταβολή στη συχνότητα μέσω της εξίσωσης του Sauerbrey (Sauerbrey,1959) και είναι η παρακάτω:

$$\Delta m = -\frac{C \cdot \Delta f}{n}$$

όπου C είναι σταθερά για το Q -Sense, Δf είναι η μεταβολή στη συχνότητα και n είναι ο αριθμός που αντιπροσωπεύει τη συχνότητα λειτουργίας (overtone) για την οποία υπολογίζεται η μεταβολή αυτή. Για τον υπολογισμό της μάζας ανά επιφάνεια συνυπολογίστηκε η λειτουργική επιφάνεια της μικροσυσκευής Q -Sense, η οποία είναι $0,2 \text{ cm}^2$. Στα πειράματα αυτά η μάζα της πρωτεΐνης που προστέθηκε στο στρώμα νουτραβιδίνης ήταν $3\mu\text{g}$, $7,5\mu\text{g}$, $15\mu\text{g}$, $22,5\mu\text{g}$, $30\mu\text{g}$ και $45\mu\text{g}$. Ενδεικτικό διάγραμμα από τα πειράματα φαίνεται παρακάτω (Εικόνα 32), ενώ ακολουθεί το διάγραμμα της μάζας που προστίθεται στο βιοαισθητήρα προς τη μάζα που δεσμεύτηκε ανά μονάδα επιφάνειας (Εικόνα 33). Το τελευταίο υπολογίστηκε από τον τύπο του Sauerbrey, με βάση τη μεταβολή στη συχνότητα του ακουστικού κύματος. Πρέπει να σημειωθεί ότι, όταν η εξίσωση του Sauerbrey χρησιμοποιείται για βιολογικά μόρια, εμφανίζονται αποκλίσεις λόγω των ιξωδοελαστικών ιδιοτήτων του στρώματος των προσροφημένων μορίων.



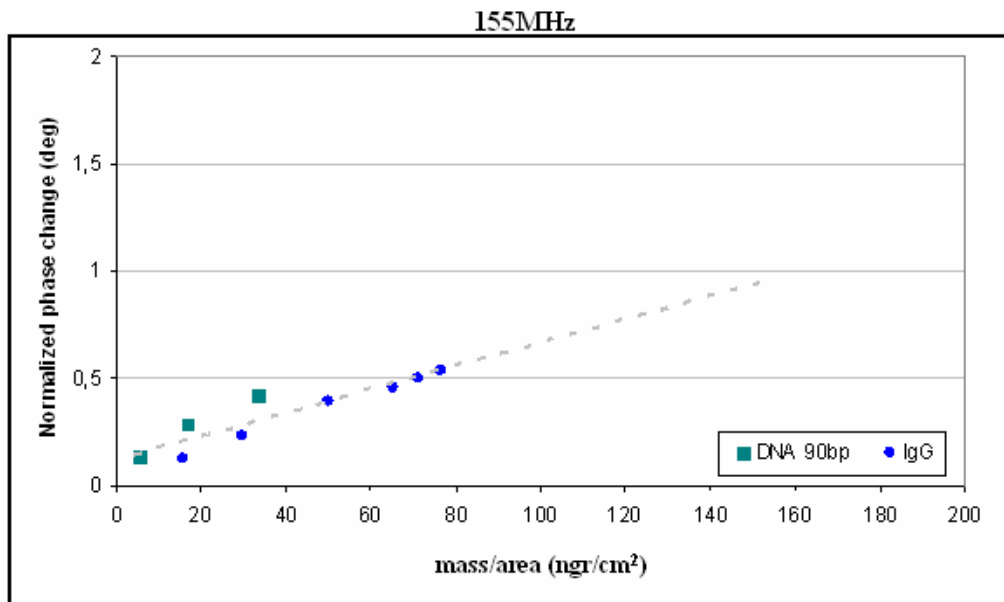
Εικόνα 32: Πειράματα στον ακουστικό βιοαισθητήρα Q -Sense. Καταγράφηκε η μεταβολή στη συχνότητα και την απόσβεση του ακουστικού κύματος ως απόκριση στην προσθήκη αυξανόμενων συγκεντρώσεων του anti-IgG.



Εικόνα 33: Η μάζα της πρωτεΐνης που προσροφήθηκε στο στρώμα της νουτραβιδίνης ανά μονάδα επιφάνειας, συναρτήσει της μάζας που προστέθηκε στο βιοαισθητήρα *Q-Sense* όπως υπολογίστηκε με βάση τη μεταβολή της συχνότητας.

Η πρότυπη καμπύλη μάζας ανά επιφάνεια που υπολογίστηκε (Εικόνα 40) χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της μάζας πρωτεΐνης που προσδένεται στο στρώμα της νουτραβιδίνης ανά επιφάνεια στον ακουστικό βιοαισθητήρα 155MHz. Οι τιμές που προκύπτουν ίσως να μην αντικατοπτρίζουν την πραγματικότητα για τον βιοαισθητήρα 155MHz, αλλά μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε μια πρώτη φάση, για την εξαγωγή κάποιων συμπερασμάτων. Για τον υπολογισμό της τιμής μάζας ανά επιφάνεια, πρέπει να γίνουν πειράματα με σημασμένα μόρια (φθορίζουσες ουσίες, ραδιενέργεια) για να βρεθεί η μάζα που έχει προσδεθεί στο στρώμα της νουτραβιδίνης.

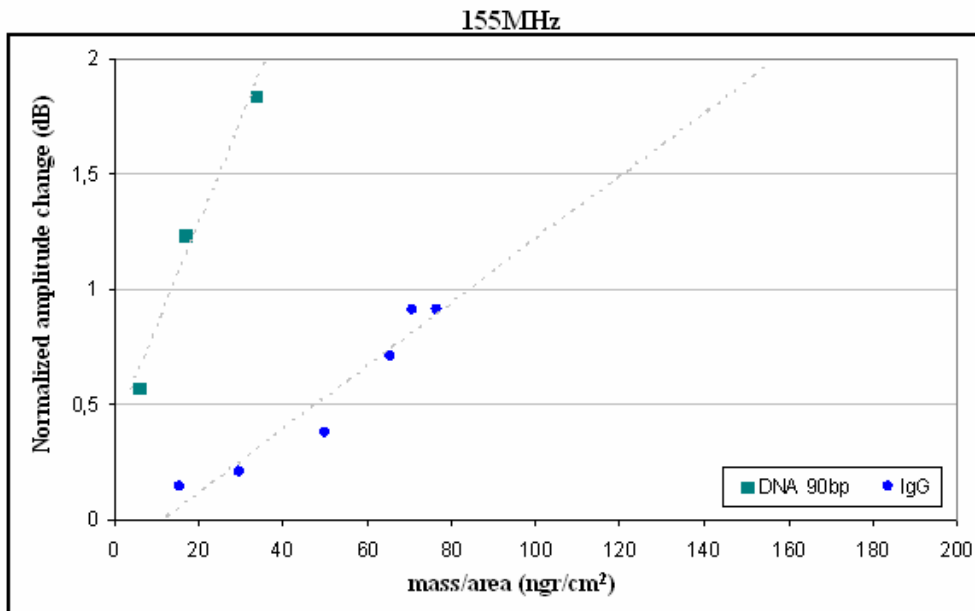
Στο επόμενο διάγραμμα (Εικόνα 34) φαίνεται η κανονικοποιημένη, ως προς τη μεταβολή που προκαλεί η νουτραβιδίνη, μεταβολή στη φάση συναρτήσει των τιμών μάζας ανά επιφάνεια που υπολογίστηκαν για καθένα από τα μόρια IgG και 90bp DNA (τα πειράματα με DNA πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Ακουστικών Βιοαισθητήρων από τους Παπαδάκη Γ. και Σαιτάκη Μ.). Η πρωτεΐνη προστέθηκε σε συγκεντρώσεις 10, 25, 50, 75, 100, 150µg/ml, που αντιστοιχούν στις μάζες που αναφέρθηκαν παραπάνω. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν για τη σύγκριση μεταξύ μορίων DNA και της IgG πρωτεΐνης, που έχει σφαιρική μορφή σχηματίζοντας ένα συμπαγές στρώμα (Zhou, C., 2004) στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα.



Εικόνα 34: Λιάγραμμα της κανονικοποιημένης ως προς τη νουτραβιδίνη μεταβολής στη φάση συναρτήσει των υπολογισμένων από την πρότυπη καμπύλη τιμών προσδεμένης μάζας ανά επιφάνεια για τα μόρια IgG και DNA 90bp.

Παρατηρείται ότι η μεταβολή στη φάση, σε σχέση με τη μεταβολή στη μάζα ανά επιφάνεια είναι γραμμική και δεν φαίνεται να σχετίζεται με το είδος του μορίου (DNA ή πρωτεΐνη). Αυτό σημαίνει ότι η φάση επηρεάζεται κατά κύριο λόγο από την αλλαγή στη μάζα πάνω στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα, η οποία προκαλείται από τη δέσμευση των βιομορίων στη νουτραβιδίνη, γεγονός που είχε παρατηρηθεί και στα πειράματα στον ακουστικό βιοαισθητήρα (110MHz και 155MHz). Επομένως, η μέτρηση της μεταβολής στη φάση διαπιστώθηκε πως είναι ικανή να δώσει την επιφανειακή συγκέντρωση ενός βιοτινυλιωμένου μορίου, που έχει προσδεθεί στο στρώμα της νουτραβιδίνης.

Αναφορικά με το πλάτος φαίνεται η κανονικοποιημένη, ως προς τη μεταβολή που προκαλεί η νουτραβιδίνη, μεταβολή στο πλάτος του ακουστικού κύματος συναρτήσει των τιμών της μάζας ανά επιφάνεια για κάθε μόριο (Εικόνα 35). Η μεταβολή στο πλάτος φαίνεται πως διαφοροποιείται και δεν είναι ομοιόμορφη για τα μόρια όπως η μεταβολή στη φάση. Συγκεκριμένα, η μεταβολή στο πλάτος είναι μεγαλύτερη για το μόριο DNA 90bp σε σύγκριση με την πρωτεΐνη IgG. Η μεταβολή αυτή πρέπει να οφείλεται στον τύπο και τη διαμόρφωση των μορίων αυτών. Άρα πιθανά οι μεταβολές στο πλάτος να μπορέσουν να αποτελέσουν ένα βασικό χαρακτηριστικό, μέσω του οποίου θα μπορέσουμε να διαχωρίσουμε διαφορετικά μεταξύ τους βιολογικά μόρια με βάση τις διαφορετικές τους ιδιοελαστικές ιδιότητες



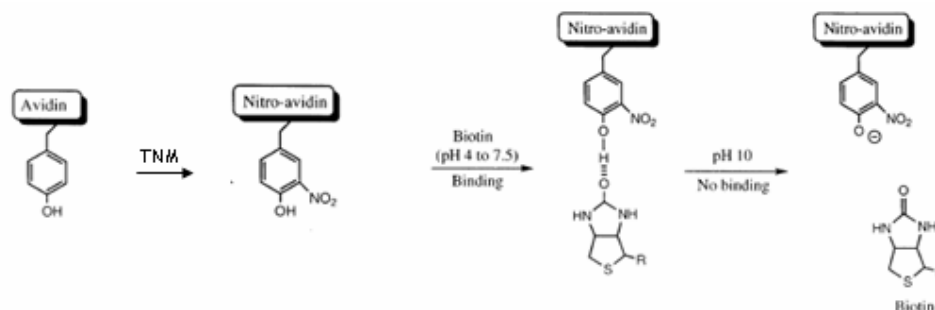
Εικόνα 35: Διάγραμμα της κανονικοποιημένης ως προς τη νουτραβιδίνη μεταβολής στο πλάτος συναρτήσει των υπολογισμένων από την πρότυπη καμπύλη τιμών προσδεμένης μάζας ανά επιφάνεια για τα μόρια IgG και DNA 90bp.

4.5.Παρασκευή τροποποιημένης αβιδίνης (νίτρο-αβιδίνης), με σκοπό την αναγέννηση της επιφάνειας

Επίσης πραγματοποιήθηκαν πειράματα με σκοπό την αναγέννηση της επιφάνειας της νουτραβιδίνης. Ήδη από την βιβλιογραφία ήταν γνωστό πως ήταν δυνατή η παρασκευή ενός τέτοιου τροποποιημένου μορίου αβιδίνης (Morag, E., et al., 1996b). Οι τρισδιάστατες και κρυσταλλικές δομές της αβιδίνης είχαν δείξει (Morag, E., et al., 1996a) ότι ο σημαντικός δεσμός μεταξύ αβιδίνης και βιοτίνης είναι ένας υδρογονοδεσμός μεταξύ μιας καρβοξυλομάδας της βιοτίνης και ενός αμινοξέος, της τυροσίνης στη θέση 33 (Tyr-33) του μονομερούς της αβιδίνης. Επιπρόσθετα φάνηκε ότι υπάρχει χώρος στην περιοχή πρόσδεσης της τυροσίνης, και πιο συγκεκριμένα στην όρθο περιοχή της φαινόλης της τυροσίνης, που μπορεί να «φιλοξενήσει» μια χημική ομάδα, χωρίς να διαταραχθεί ο δεσμός μεταξύ αβιδίνης-βιοτίνης. Τέλος σταθερά σύνδεσης της αβιδίνης/βιοτίνης είναι 10^{15} M^{-1} ενώ στις νίτρο-αβιδίνης/βιοτίνης $1.6 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1}$ (<http://probes.invitrogen.com/>).

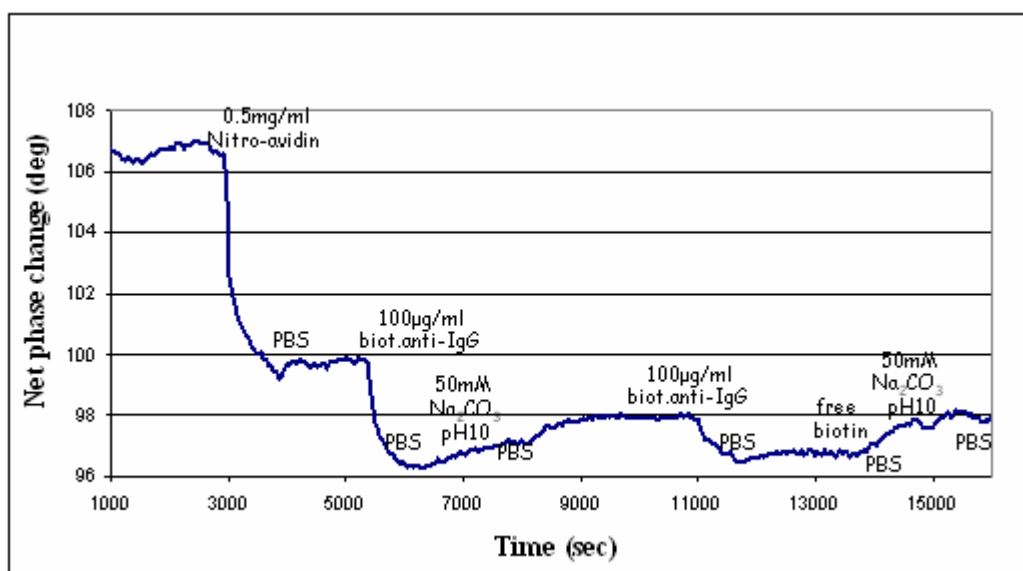
Η προετοιμασία της νίτρο-αβιδίνης έγινε με χημική τροποποίηση (όπως αναφέρεται στα υλικά και μέθοδοι), μέσω νίτρωσης, με την χρήση τετρανιτρομεθανίου (TNM). Τρεις από τις τέσσερις θέσεις, του τετραμερούς μορίου της αβιδίνης τροποποιούνται, ενώ οι μη τροποποιημένες μπλοκάρονται από μόρια ελεύθερης βιοτίνης κατά την παρασκευή της. Η τροποποιημένη αβιδίνη, μπορεί να

δεσμεύει τη βιοτίνη σε χαμηλές τιμές του pH (pH 4-7.5), λόγω της μείωσης της pKa της φαινόλης. Το αποτέλεσμα είναι για υψηλές τιμές του pH (pH 10) η νίτρο-αβιδίνη να αποδεσμεύει τη βιοτίνη (Εικόνα 36).



Εικόνα 36: Η αλληλεπίδραση της βιοτίνης με τη νίτρο-αβιδίνη, στην όρθο θέση του καταλοίπου της τυροσίνης.

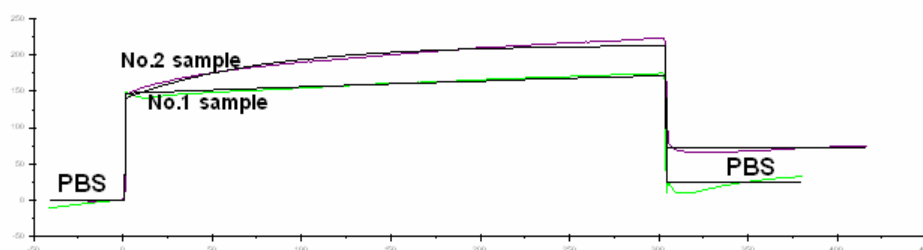
Τα ακουστικά πειράματα πραγματοποιήθηκαν με την νίτρο-αβιδίνη, στη μικροσυσκευή 110MHz με PMMA πάχους 1μm και 20nm Au. Αρχικά προστέθηκε νίτρο-αβιδίνη σε συγκέντρωση 0.5mg/ml και στη συνέχεια 100μg/ml βιοτινυλιωμένου anti-IgG. Το διάλυμα, υψηλού pH, που χρησιμοποιήθηκε για την αποδέσμευση της βιοτινυλιωμένης πρωτεΐνης από την νίτρο αβιδίνη ήταν Na₂CO₃ pH 10 και η αναγέννηση της επιφάνειας επιτεύχθηκε κατά 50% (Εικόνα 37).



Εικόνα 37: Ενδεικτικό διάγραμμα ακουστικού πειράματος, με τη χρήση νίτρο-αβιδίνης.

Για την εξακρίβωση της ποιότητας, της τροποποιημένης αβιδίνης, πραγματοποιήθηκαν επιπρόσθετα πειράματα οπτικά με SPR και χρωματογραφίας.

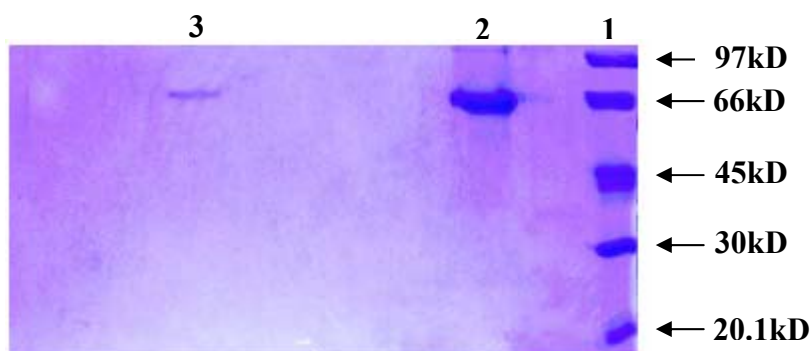
Όσον αφορά τα οπτικά, στον SPR αρχικά προστέθηκε νίτρο-αβιδίνη σε συγκέντρωση 100μg/ml και στην συνέχεια το βιοτινυλιωμένο anti-IgG, σε συγκεντρώσεις 10 μg/ml και 100 μg/ml. Τέλος ακολούθησε εξισορρόπηση με διάλυμα PBS. Στα πειράματα αυτά υπολογίστηκε ότι η σταθερά σύνδεσης μεταξύ της νίτρο-αβιδίνης και της βιοτινυλιωμένης πρωτεΐνης anti-IgG, που όπως φαίνεται και στο παρακάτω διάγραμμα ήταν $KD = 1.14 \cdot 10^{10} M^{-1}$ (Εικόνα 38). Η τιμή αυτή συμφωνεί με τη βιβλιογραφία, όπως αναφέρθηκε παραπάνω και είναι ενδεικτική της ποιότητας της νίτρο-αβιδίνης.



Biotinylated anti-IgG	K_a (1/Ms)	k_d (1/s)	R_{max} (mdeg)	RI (md)	Drift (mdeg/°)	Conc of analyte	K_A (1/M)	KD (M)	R_{eq} (md)	K_{obs} (1/s)	Chi2
No. 1 (10 μg/ml)	1.1e4	1.26e-6	45.3	148	0.0522	6.7e-8	8.79e9	1.14e-10	45.2	7.42e-4	4.51
No. 2 (100μg/ml)				158	0.0818	6.7e-7			45.3	7.4e-3	

Εικόνα 38: Ενδεικτικό διάγραμμα ακουστικού πειράματος, με τη χρήση νίτρο-αβιδίνης.

Επίσης πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία συγγένειας σε στήλη με ακινητοποιημένη νίτρο-αβιδίνη, με την οποία επίσης ελέγχθηκε η ποιότητα της. Στην στήλη φορτώθηκε η βιοτινυλιωμένη πρωτεΐνη BSA, η οποία τελικά εκλούστηκε με διάλυμα Na_2CO_3 σε pH 10. Η βιοτινυλιωμένη πρωτεΐνη εντοπίζεται σε 12% πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, στο οποίο και ηλεκτροφορήθηκαν τα συλλεγμένα από τη στήλη δείγματα, σε μοριακό βάρος 66 kD (Εικόνα 39).



Εικόνα 39:

1. Πρωτεϊνικός μάρτυρας.
2. BSA (control).
3. Έκλυση της βιοτινυλιωμένης BSA, από τη στήλη νίτρο-αβιδίνης με διάλυμα Na_2CO_3 pH 10.

Η αναγέννηση της επιφάνειας αβιδίνης του ακουστικού βιοαισθητήρα, κατά ένα σημαντικό βαθμό δεν ήταν δυνατή, παρόλο που η τροποποιημένη αβιδίνη είχε παρασκευαστεί σωστά. Η δημιουργία επαναχρησιμοποιούμενων επιφανειών έχει σημαντικά οφέλη, καθότι μειώνει σημαντικά το κόστος των πειραμάτων αλλά ταυτόχρονα και τον χρόνο διεξαγωγής τους.

**ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ
ΚΑΙ
ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ**

5. Συμπεράσματα και Προοπτικές

Στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία, πραγματοποιήθηκε μια πρώτη προσέγγιση για την μελέτη απόκρισης του ακουστικού βιοαισθητήρα κατά την προσθήκη πρωτεϊνικών μορίων, με αυξανόμενες συγκεντρώσεις, στην επιφάνεια του. Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν πειράματα βελτιστοποίησης των συνθηκών λειτουργίας του αισθητήρα, που επικεντρώθηκαν στην μελέτη της ποιότητας του ακουστικού σήματος.

Αναλυτικότερα πραγματοποιήθηκε μελέτη της ευαισθησίας του ακουστικού σήματος, ως προς τη διάταξη του κυματοδηγού, βαθμονόμηση (calibration) και χαρακτηρισμός των μικροσυσκευών 110MHz και 155MHz του ακουστικού βιοαισθητήρα Love. Καταλήξαμε για την μικροσυσκευή 110MHz στην χρήση PMMA πάχους 1 μ m και για την 155MHz στην χρήση PMMA πάχους 0.4 μ m και στην εναπόθεση και στις δύο ενός στρώματος χρυσού 20nm. Η ευαισθησία του ακουστικού σήματος και για τις δύο αυτές συχνότητες λειτουργίας, μελετήθηκε με πειράματα στα οποία προστέθηκε ίδια μάζα πρωτεΐνης στην επιφάνεια της συσκευής, δείχνοντας ότι το σύστημα λειτουργούσε σωστά εμφανίζοντας σε υψηλότερη συχνότητα μεγαλύτερες μεταβολές των ακουστικών χαρακτηριστικών και κυρίως της φάσης. Έχοντας βρει τις κατάλληλες συνθήκες για την λειτουργία της ακουστικής μικροσυσκευής 110MHz, πραγματοποιήσαμε πειράματα με σκοπό, την δημιουργία ενός βιοαισθητήρα για την παρατήρηση της δέσμευσης, στην επιφάνεια του πρωτεϊνικών μορίων. Αυτό ήταν αδύνατο λόγω της ποιότητας του δείγματος, μιας εκ των δύο πρωτεϊνών που χρησιμοποιήθηκαν, καθότι ήταν πρωτεολυμένη με αποτέλεσμα να μην έχουμε επαναλήψιμα πειράματα. Σαφώς και είναι μέσα στα σχέδια μας, η μελέτη της ευαισθησίας του ακουστικού σήματος, πως και σε ποιο βαθμό αυτή διαφοροποιείται ανάμεσα στις πρωτεΐνες.

Πειράματα για τον υπολογισμό της μάζας της πρωτεΐνης που επικάθεται στην επιφάνεια της συσκευής έγιναν με την τεχνολογία των ακουστικών βιοαισθητήρων BAW (Q-sense). Με τα πειράματα αυτά δείχθηκε ότι υπάρχει διαφοροποίηση στο πλάτος του ακουστικού σήματος, μεταξύ πρωτεϊνών και DNA μορίων. Οι διαφοροποιήσεις αυτές σχετίζονται με την διαμόρφωση του κάθε μορίου, ενώ αναφορικά με τις μεταβολές στην φάση, όλα τα ακουστικά πειράματα πιστοποίησαν, ότι οι παρατηρούμενες μεταβολές στη φάση σχετίζονται κυρίως με μεταβολές στην μάζα που εναποτίθεται στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα.

Η αναγέννηση της επιφάνειας της νουτραβιδίνης ήταν ένας ακόμα στόχος της παρούσας εργασίας. Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν με τον ακουστικό βιοαισθητήρα η αναγέννηση της επιφάνειας επιτεύχθηκε κατά 50%. Σαφώς υπάρχει ανάγκη για βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου παραγωγής της τροποποιημένης αβιδίνης, έτσι ώστε να αυξηθεί το ποσοστό αναγέννησης. Η ανάγκη δημιουργίας επαναχρησιμοποιούμενων επιφανειών είναι μεγάλη, καθότι μειώνει σημαντικά το κόστος των πειραμάτων αλλά ταυτόχρονα και τον χρόνο διεξαγωγής τους.

Η ικανότητα μας να μελετάμε μεταβολές στα χαρακτηριστικά του ακουστικού κύματος και να τις συνδέουμε με αλλαγές στη μάζα και διαμόρφωση βιολογικών μορίων μπορεί να αποτελέσει σημαντικό παράγοντα για την γρήγορη και αξιόπιστη μελέτη διαμοριακών αλληλεπιδράσεων, που χαρακτηρίζονται από μεταβολές στη μάζα π.χ πρωτεόλυση ή πολυμερισμός μιας πρωτεΐνης ή αλλαγές στην δομή και διαμόρφωση των μορίων π.χ αντιγραφή ή μεταγραφή. Το επόμενο βήμα είναι η δημιουργία σημασμένων πρωτεϊνικών μορίων (με φθορίζουσες ουσίες ή ραδιενέργεια) για τον άμεσο προσδιορισμό (και όχι με Q-sense) της ακριβούς μάζας, που επικάθεται στην επιφάνεια της ακουστικής συσκευής.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Andle, J.C., Weaver, J.F., Vetelino, L.F. and McAllister, D.J., (1995). "*Selective acoustic olate mode DNA sensor.*" Sensors and Actuator B. **24-25:** 129-133.
2. Ballantine, D. S., White, R. M., Martin S. J., Ricco, A. J., Zellers, E.T., Frye, G. C.,
3. Bayer, E. A. and Wilchek, M. (1978). "*The complex avidin-biotin as a tool in molecular biology.*" Trends Biochem. Sci. 3: N237-N239.
4. Becker, J.M., Wilchek, M., (1972). "*Inactivation by avidin of biotin-modified bacteriophage.*" Biochim. Biophys. Acta. 264: 165-170.
5. Binning, G., Quate, C.F., Gerber, C.H., (1986). "*Atomic Force Microscopy.*" Phys. Rev. Lett. **56:** 930-933.
6. Boas, M.A., (1927). "*The effect of desiccation upon the nutritive properties of egg-white.*" Biochem. J. 21: 712-724.
7. Cady, W. P., (1924). Proc. Inst. Radio Eng., **12:** 805.
8. Cass, T. and Ligler, F.S., (1998). "*Immobilized Biomolecules in Analysis.*" Oxford University Press.
9. Chen, Q., Kobayashi, Y., Takeshita, H., Hoshi, T., Anzai, J.. (1998). "*Avidin-Biotin System-Based Enzyme Multilayer Membranes for Biosensor Applications: Optimization of Loading of Choline Esterase and Choline Oxidase in the Bienzyme Membrane for Acetylcholine Biosensors.*" Electroanalysis. **10:** 94-97.

10. Choi, S.H., Wook Lee, J., and, S.J., (2005). " *Enhanced performance of a surface plasmon resonance immunosensor for detecting Ab–GAD antibody based on the modified self-assembled monolayers .*" Biosensors and Bioelectronics, **21**: 378-383.

11. Collins, F. S., Lander E. S. et al., (2004). " *Finishing the euchromatic sequence of the human genome.* " Nature **431**: 931-945.

12. Delamarche, E., Michel, B., Biebuyck, H.A. and Gerber, Ch., (1996). " *Golden Interfaces: The surface of Self-Assembled Monolayers*" Adv. Mater. **8**: 719.

13. Dieulesaint, E. and Royer D., (1980). " *Acoustic Surface Waves, Elastic Waves In Solids, applications to Signal Processing.* " Wiley, New York : 65-190.

14. Dupont-Gillain, C. C., Rouxhet, R.G., (2001). " *AFM study of the interaction of collagen with polystyrene and plasma-oxidized polystyrene.*" Langmuir **17**: 7261-7266.

15. Eakin, R.E., Snell, E.E., Williams, R.J., (1941). " *The concentration and assay of avidin, the injury-producing protein in raw egg white.*" J. Biol. Chem. **140**: 535-543.

16. Ebersole, R.C., Miller, J.A., Moran, J.R., and Ward, M.D., (1990). " *Spontaneously Formed Functionally Active Avidin Minelayers on Metal Surfaces : a Strategy for Immobilizing Biological Reagents and Design for Piezoelectric Biosensors.* " JACS **112**: 3239-3241.

17. Egelhofer, (2004). " *Post-genome science highlights systems biology.*" Drug Discovery Today **9**: 1000-1002.

18. Eric, M. Phizicky, E.M. and Stanley Fields, S., (1995). *"Protein-Protein Interactions: Methods for Detection and Analysis."* MICROBIOLOGICAL REVIEWS. 94-9-123.
19. Garguilo, M.G., Huynh, N., Proctor, A., Michael, A.C., (1993). *"Amperometric sensors for peroxide, choline, and acetylcholine based on electron transfer between horseradish peroxidase and a redox polymer."* Analytical Chemistry. **65(5)**: 523-528.
20. Ghafouri, S., and Thompson, M., (1999). *"Interfacial properties of biotin conjugate - avidin complexes studied by acoustic wave sensor."* Langmuir. **15**: 564.
21. Gitlin, G. Bayer, E.A., Wilchek, M., (1988). *"Studies on the biotin-binding site of avidin. Tryptophan residues involved in the active site"*. Biochem. J **250**: 291-294.
22. Gizeli, E., (1997). *" Design considerations for the acoustic waveguide biosensor."* Smart Mater. Struct **6**: 700-706.
- 23.
24. Gizeli, E., Bender F., Rasmusson A., Saha K., Josse F. and Cernosek R., (2003). *" Sensitivity of the acoustic waveguide biosensor to protein binding as a function of waveguide properties."* Biosensors & Bioelectronics **18**: 1399-1406.
25. Gizeli, E., Liley, M., Lowe, C.R. and Vogel, H., (1997). *"Antibody Binding to a Functionalized Supported Lipid Layer: A direct Acoustic Immunosensor."* Analytical Chemistry. **69**: 4808-4813.
26. Gizeli, E. and Lowe, C.R., (2002). Biomolecular Sensors. Taylor & Francis, London and New York.

27. Gooding, J.J., Wasiowych, C., Barnett, D., Hibbert, D.B., Barisci, J.N., Wallace, G.G., (2004). "Electrochemical modulation of antigen-antibody binding." Biosens Bioelectron.**15**:260-8.
28. Green, N. M., (1975). "Avidin. In *Advances in Protein Chemistry.*" Academic Press, New York. **29**: 85-133.
29. Gyorgy, P., Rose, C.S., Eakin, R. E., Snell, E.E., Williams, R.J., (1941). "Egg-white injury as the result of nonabsorption or inactivation of biotin." Science **93**: 477-478.
30. Harding, g.L., Du, J., Dencher, P.R., Barnett, D., Howe, E., (1997). "Love wave immunosensor operating in liquid." Sensors and Actuators A. **61**: 279-286.
31. Heitzmann, H., Richards, F.M., (1974). "Use of the avidin-biotin complex for specific staining of biological membranes in electron microscopy." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **71**:3537-3541.
32. Hiller, Y., Gershoni, J.M., Bayer, E.A., Wilchek, M., (1978). "Biotin binding to avidin. Oligosaccharide side chain not required for ligand association". Biochem. J. **248**: 167-171.
33. Hook, F., Rodahl, M., Brzezinski, P., and Kasemo, B. (1998). "Energy Dissipation Kinetics for Protein and Antibody-Antigen Adsorption under Shear Oscillation on a Quartz Crystal Microbalance." Langmuir. **14**: 729-734.
34. Hozumi, N. and Tonegawa S., (2004). "Pillars Article: Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions." J. Immunol. **173**: 4260 - 4264.

35. Ikebukuro, K., Kohiki, Y. and Koji Sode (2002). "Amperometric DNA sensor using the pyrroquinoline quinone glucose dehydrogenase - avidin conjugate." Biosensors and Bioelectronics. **17**: 1075 – 1080.
36. Kubly (2002). "Immunology 4th edition." Page: 161.
37. Jo, S., Park, K., (2000). "Surface modification using silanated poly(ethylene glycol)." Biomaterials **21**: 605-616.
38. Junowicz, E., and Charm, S.E., (1976). "The derivatization of oxidized polysaccharides for protein immobilization and affinity chromatography." Biochimica and Biophysica Acta. **428**: 157-165.
39. Kossek, S., Padeste, C., Tiefenauer, L., (1996). "Immobilization of Streptavidin for Immunosensors on Nanostructured Surfaces." Journal of Molecular Recognition. **9**: 485 – 487
40. Kwan RC, Leung HF, Hon PY, Barford JP, Renneberg R., (2005). "A screen-printed biosensor using pyruvate oxidase for rapid determination of phosphate in synthetic wastewater". Appl Microbiol Biotechnol. **66(4)**: 377-83.
41. Laemmli, UK., (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature. Aug **15**: 227(5259):680-5.
42. Lee, S.-W., Laibinis, P.E., (1998). "Protein resistant coatings for glass and metal oxide surfaces derived from oligo(ethylene glycol)-terminated alkyltrichlorosilanes." Biomaterials **19**: 1669-16-75.
43. Liedberg, B., (1983). Sensors Actuators. **4**: 299.
44. Love, A.E.H., (1911). "Some Problems of Geodynamics." Cambridge University Press.

45. Magrisso, M., Etzion, O., Pilch, G., Novodvoretz, A., Perez-Avraham, G., Schlaeffer, F. and Marks, R., (2005). "Fiber-optic biosensor to assess circulating phagocyte activity by chemiluminescence." Biosensors and Bioelectronics. (article in press).
46. Mernagh, D.R., Janscak, P., Firman, K., Kneale, G.G., (1998). "Protein-protein and protein-DNA interactions in the Type I restriction endonuclease *R.EcoRI24I*." Biol. Chem. **379**: 497-503.
47. Minunni, M., Tombelli, S., Scielzi, R., Mannelli, I., Mascini, M. and Gaudiano, C., (2003). "Detection of β -thalassemia by DNA piezoelectric biosensor coupled with polymerase chain reaction." Analytica Chimica Acta. **481**: 55-64.
48. Mittelman, A.S., , E. Z., and Rishpon, J., (2002). "Amperometric quantification of total coliforms and specific detection of *Escherichia coli*." Analytical Chemistry **74**: 903-907.
49. Morgan, D.P., (1985). "Surface Acoustic Wave Devices for Signal Processing." Elsevier, New York.
50. Morag, E., Bayer, E.A. and Wilchek, M., (1996a). "Reversibility of biotin-binding by selective modification of tyrosine in avidin." Biochem. J. **316**: 193-199.
51. Morag, E., Bayer, E.A., and Wilchek, M., (1996b). "Immobilized Nitro-avidin and Nitro-streptavidin as Reusable Affinity Matrices for Application in Avidin-Biotin Technology." ANALYTICAL BIOCHEMISTRY. **243**: 257-263.
52. Pellegrini, M., Holmest, D.S., and Manning J., (1977). "Application of the avidin-biotin method of gene enrichment to the isolation of long double-

- stranded DNA containing specific gene sequences."* Nucleic Acids Research 4: 2961-2973.
53. Pennington, P., Snell, E.E., Eakin, R.E., (1942). "*Crystalline avidin.*" J. Amer. Chem. Soc. 64: 469.
54. Peris, M., Simpson, A.M., Grunstein, J., Liliental, J.E., Frech, G.C., and Simpson, L. (1997). "*Native gel analysis of ribonucleoprotein complexes from a Leishmania tarentolae mitochondrial extract.*" Mol.Biochem. Parasitol. **85**: 9-24.
55. Ross, S.E., Carson, S. D., Fink, L.M., (1986). "*Effects of detergents on avidin-biotin interaction.*" BioTechniques. **4(4)**: 350-354.
56. Sagvolden, S., Giaever, I., Feder, J., (1998). "*Characteristic protein adhesion forces on glass and polystyrene by atomic force microscopy.*" Langmuir **14**: 5984-5987.
57. Saha, K., Bender, F. and Gizeli, E., (2003). "*Comparative Study of IgG Binding to Proteins G and A: Nonequilibrium Kinetic and Binding Constant Determination with the Acoustic Waveguide Device.*" Analytical Chemistry. **75**: 835-842.
58. Sandwick, R.K., and Schray, K. J., (1988). "*Conformational states of enzymes bound to surfaces .*" Journal of Colloid and Interface Science 121: 1-12.
59. Sauerbrey, G., (1959). Z.Physik. **155**: 206-222.
60. Serway, R.A., (1990). "*PHYSICS for Scientists & Engineers.*" Third Edition.
61. Smith, G.P., (1985). "*Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface.*" Science. **228**: 1315-1317.

62. Sota, H., Hasegawa, Y., Iwakura M., (1998). *"Detection of conformational changes in an immobilized protein using surface plasmon resonance."* Anal. Chem. **70**: 2019-2024.
63. Storri, S., Santoni, T., Minunni, M. and Mascini, M., (1998). *"Surface modifications for the development of piezoimmunosensors."* Biosensors and Bioelectronics. **13**: 347-357.
64. Su, X., Wu, Ying-Ju and Knoll, W., (2005). *"Comparison of surface plasmon resonance spectroscopy and quartz crystal microbalance techniques for studying DNA assembly and hybridization."* Biosensors and Bioelectronics.
65. Tanaka, M., Motomura, T., Kawada, M., Anzai, T., Kasori, Y., Shiroya, T., Shimura, K., Onishi, M., Mochizuki, A., (2000). *"Blood compatible aspects of poly(2-methoxyethylacrylate) (PMEA)-relationship between protein adsorption and platelet adhesion on PMEA surface."* Biomaterials **21**: 1471-1481.
66. Turner, A.P.F., Karube, I. and Wilson, G.S., (1987). Biosensors: Fundamentals & Applications. Oxford University.
67. Wahlgren, M., Arnebrant, T., Lundstrom, I., (1995). *"The adsorption of lysozyme to hydrophilic silicon oxide surfaces: "Comparison between experimental data and models for adsorption kinetics."* J. Colloid Interface Sci. **175**: 506-514.
68. Wessa, T., Rapp, M. and Ache, H.J. (1999). *"New immobilization method for SAW-biosensors: covalent attachment of antibodies via CNBr. "* Biosensors and Bioelectronics. **14**: 93-98.

69. White R.M., (1970). Surface Elastic Waves, Proc. of IEEE. **58**: 1238-77.
70. Wohltjen, H., (1997). *"Acoustic Wave Sensors: Theory, Design, and Physico-Chemical Applications."* Academic Press, Inc., San Diego, CA, U.S.A.
71. Zhou, C., Friedt, J.M., Angelova, A., Choi, K.H., Laureyn, W., Frderix, F., Francis, L.A., Campitelli, A., Engelborghs, Y., and Borghs,G., (2004). *"Human Immunoglobulin Adsorption Investigated by Means of Quartz Crystal Microbalance Dissipation, Atomic Force Microscopy, Surface Acoustic Wave, and Surface plasmon Resonance Techniques."* Langmuir. **20**: 5870-5878.

Διευθύνσεις στο διαδίκτυο

- www.q-sense.com
- www.gla.ac.uk
- www.xantec.com
- probes.invitrogen.com
- www.sigmaldrich.com