

**ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΧΗΜΙΚΗΣ/ΦΥΣΙΚΗΣ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ ΒΙΟΜΟΡΙΩΝ ΣΕ ΕΠΙΦΑΝΕΙΕΣ ΔΙΟΞΕΙΔΙΟΥ ΚΑΙ ΝΙΤΡΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΠΥΡΙΤΙΟΥ ΓΙΑ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΕ ΟΠΤΙΚΟΥΣ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ****Μ. Αντωνίου<sup>1,2</sup>, Δ. Τσουνίδη<sup>2</sup>, Π. Πέτρου<sup>2\*</sup>, Κ. Μπέλτσιος<sup>1</sup>, Σ.Η. Κακαμπάκος<sup>2</sup>**<sup>1</sup>Τμήμα Μηχανικών Επιστήμης και Τεχνολογίας των Υλικών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα, Ελλάδα<sup>2</sup>Εργαστήριο Ανοσοαναλύσεων/Ανοσοαισθητήρων, ΙΠΡΕΤΕΑ, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος», Αγία Παρασκευή, Αττική, Ελλάδα  
(\*[ypetrou@rrp.demokritos.gr](mailto:ypetrou@rrp.demokritos.gr))**ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

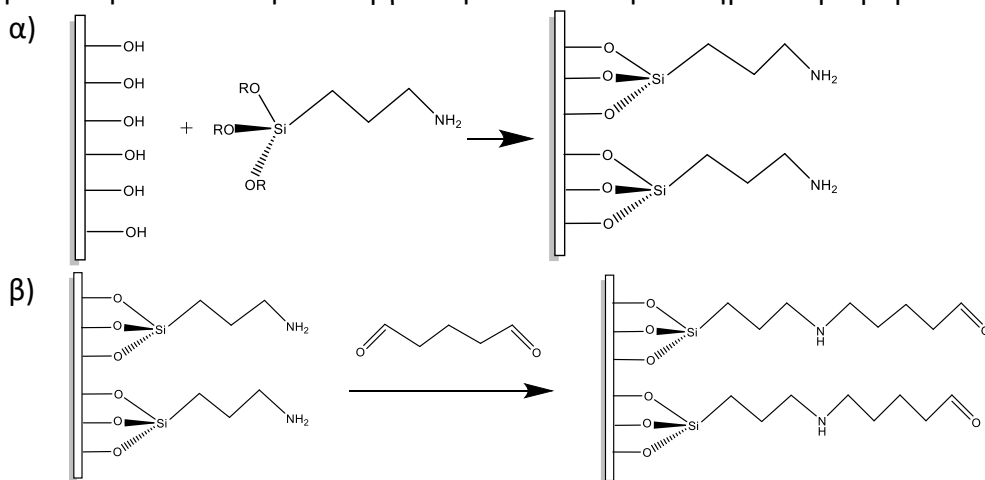
Για την ανάπτυξη οπτικών βιοαισθητήρων με μεταλλάκτες σήματος που κατασκευάζονται από διοξείδιο ή νιτρίδιο του πυριτίου είναι απαραίτητη η χημική ενεργοποίηση της επιφάνειας του μεταλλάκτη με σκοπό την σταθερή, επαναλήψιμη και ομοιογενή πρόσδεση των βιομορίων αλλά και την διατήρηση της λειτουργικότητας τους. Στην παρούσα εργασία έγινε βελτιστοποίηση μεθόδων χημικής ενεργοποίησης επιφανειών από διοξείδιο ή νιτρίδιο του πυριτίου με την χρήση του σιλανίου, 3-αμινοπροπυλοτριαιθοξυσιλάνιο (APTES) έτσι ώστε να καταστεί δυνατή η ακινητοποίηση βιομορίων τόσο μέσω προσρόφησης όσο και ομοιοπολικά. Για την ομοιοπολική σύνδεση οι επιφάνειες μετά την τροποποίησή τους με APTES, ενεργοποιήθηκαν με γλουταραλδεΐδη η οποία αντιδρά με τις αμινομάδες της επιφάνειας για την εισαγωγή αλδεΐδομάδων οι οποίες αντιδρούν στην συνέχεια με τις ελεύθερες αμινομάδες των πρωτεϊνικών μορίων. Οι επιφάνειες που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη ήταν ψηφίδες πυριτίου στις οποίες είχε εναποτεθεί υμένιο διοξειδίου του πυριτίου (SiO<sub>2</sub>) και αποτελούν τον μεταλλάκτη βιοαισθητήρα φασματοσκοπίας ανάκλασης λευκού φωτός. Βρέθηκε ότι η τροποποίηση επιφανειών με διάλυμα APTES 5% (ο/ο) σε απόλυτη αιθανόλη ακολουθούμενη από αντίδραση με γλουταραλδεΐδη παρείχε σήματα φθορισμού κατά 30% υψηλότερα σε σχέση με τα υπόλοιπα πρωτόκολλα. Επιπλέον, η συγκεκριμένη μέθοδος παρείχε τις χαμηλότερες τιμές διακύμανσης σήματος μεταξύ διαφορετικών ψηφίδων. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν με μετρήσεις στον αισθητήρα φασματοσκοπίας ανάκλασης λευκού φωτός, παρακολουθώντας σε πραγματικό χρόνο τόσο την αντίδραση γ-σφαιρινών ποντικού/αντισώματος κατά των γ-σφαιρινών ποντικού όσο και με την ακινητοποίηση αντισώματος κατά της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης και χρήση των ψηφίδων σε ανοσοχημικό προσδιορισμό μη-ανταγωνιστικού τύπου της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης. Ως εκ τούτου, η προτεινόμενη μέθοδος χημικής και βιολογικής ενεργοποίησης ψηφίδων πυριτίου αναμένεται να βοηθήσει στην βελτίωση των αναλυτικών χαρακτηριστικών οπτικών αισθητήρων με μεταλλάκτες σήματος που κατασκευάζονται από διοξείδιο ή νιτρίδιο του πυριτίου.

**ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

Οι βιοαισθητήρες είναι αναλυτικές συσκευές που συνδυάζουν ένα βιομόριο αναγνώρισης σε στενή επαφή με έναν μεταλλάκτη σήματος ο οποίος μετατρέπει σε μετρήσιμο σήμα μια φυσικοχημική μεταβολή που προκαλείται από την αλληλεπίδραση του βιομορίου με τον αναλύτη στο δείγμα. Οι οπτικοί αισθητήρες αποτελούν μια από τις πλέον υποσχόμενες κατηγορίες βιοαισθητήρων λόγω των ποικίλων αρχών ανίχνευσης αλλά και της μεγάλης ευαισθησίας ανίχνευσης που προσφέρουν<sup>[1,2]</sup>. Προκειμένου να αξιοποιηθούν στο έπακρο οι αναλυτικές ικανότητες των οπτικών αισθητήρων θα πρέπει τα βιομόρια αναγνώρισης να ακινητοποιηθούν στην επιφάνεια του μεταλλάκτη με τρόπο που να εξασφαλίζει την υψηλότερη δυνατή λειτουργικότητα τους αλλά και την επαναληψιμότητα των μετρήσεων.

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την χημική/βιολογική ενεργοποίηση των αισθητήρων εξαρτώνται κυρίως από το υλικό του αισθητήρα<sup>[2]</sup>. Για οπτικούς αισθητήρες που βασίζονται σε κυματοδηγούς πυριτικών υλικών (οξείδιο πυριτίου, νιτρίδιο πυριτίου, πυρίτιο σε μονωτικό υλικό,

γυαλί) η διαδικασία χημικής/βιολογικής ενεργοποίησης που ακολουθείται περιλαμβάνει καθαρισμό/υδροφιλοποίηση της επιφάνειας, χημική τροποποίηση, συνήθως με σιλάνια, και ακινητοποίηση των βιομορίων. Για τον καθαρισμό εφαρμόζεται συνήθως επεξεργασία με πλάσμα οξυγόνου<sup>[3]</sup> ή διαλύματα Piranha (μίγματα πυκνού θειικού οξέος και διαλύματος υπεροξειδίου του υδρογόνου)<sup>[4,5]</sup>, ώστε αφενός να απομακρυνθούν υπολείμματα οργανικών υλικών από την επιφάνεια των αισθητήρων αλλά και να εμπλουτιστεί η επιφάνεια με ομάδες υδροξυλίου οι οποίες αξιοποιούνται για τη σύνδεση των σιλανίων μέσω συμπύκνωσης τους με τις ομάδες σιλοξανίου. Παράμετροι όπως ο διαλύτης, η περιεκτικότητα σε σιλάνιο, η διάρκεια και η θερμοκρασία της επεξεργασίας επηρεάζουν σημαντικά τις ιδιότητες του υμενίου που προκύπτει<sup>[5,7]</sup>. Το συνηθέστερα χρησιμοποιούμενο σιλάνιο που έχει χρησιμοποιηθεί περισσότερο για την χημική ενεργοποίηση οπτικών αισθητήρων που βασίζονται σε πυριτικά υλικά είναι το 3-αμινοπροπυλοτριαιθοξυσιλάνιο (APTES). Σε επιφάνειες τροποποιημένες με APTES τα βιομόρια μπορούν να ακινητοποιηθούν τόσο με φυσική προσρόφηση όσο και με ομοιοπολική σύνδεση<sup>[5]</sup>. Η φυσική προσρόφηση βασίζεται κυρίως σε υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και δυνάμεις Van der Waals μεταξύ της επιφάνειας και των βιομορίων (κυρίως πρωτεϊνών) ενώ η ομοιοπολική σύνδεση σε χημικές αντιδράσεις μεταξύ ομάδων της επιφάνειας και του προς ακινητοποίηση μορίου. Η ομοιοπολική σύνδεση πρωτεϊνικών μορίων σε επιφάνειες τροποποιημένες με APTES πραγματοποιείται συνήθως με το διδραστικό αντιδραστήριο γλουταραλδεΐδη, ώστε να εισαχθούν στην επιφάνεια δραστικές ομάδες αλδεΐδης οι οποίες αντιδρούν στην συνέχεια με ελεύθερες αμινομάδες στα μόρια των πρωτεϊνών<sup>[1,5]</sup>. Η αξιολόγηση των διαφόρων μεθόδων χημικής/βιολογικής ενεργοποίησης πραγματοποιείται μέσω μεθόδων χαρακτηρισμού επιφανείας (π.χ., φασματοσκοπία FT-IR, XPS, ToF-SIMS, AFM, κλπ.) αλλά και με χρήση μορίων σημασμένων με ραδιοϊσότοπα ή φθορίζουσες ουσίες ώστε να εκτιμηθεί τόσο η ποσότητα όσο και η λειτουργικότητα των ακινητοποιημένων βιομορίων<sup>[6]</sup>.



**Σχήμα 1.** (α) Αντίδραση τροποποίησης με αμινοσιλάνιο επιφανειών διοξειδίου του πυριτίου. (β) Αντίδραση του αμινοσιλανίου με την γλουταραλδεΐδη.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η βελτιστοποίηση της χημικής τροποποίησης ψηφίδων από διοξείδιο ή νιτρίδιο του πυριτίου με APTES με στόχο την βελτίωση των αναλυτικών χαρακτηριστικών οπτικών βιοαισθητήρων που βασίζονται σε αυτές τις ψηφίδες μέσω της αύξησης της ποσότητας των βιομορίων αναγνώρισης που ακινητοποιούνται, της λειτουργικότητας τους αλλά και της επαναληψιμότητας της ακινητοποίησης. Επιλέχθηκαν δύο πρωτόκολλα τροποποίησης με APTES (Σχήμα 1α), ένα με χρήση υδατικού διαλύματος και ένα με χρήση διαλύματος σε απόλυτη αιθανόλη, και παρασκευάστηκαν επιφάνειες που αξιολογήθηκαν ως προς την ακινητοποίηση γ-σφαιρινών ποντικού τόσο με φυσική προσρόφηση όσο και με ομοιοπολική σύνδεση μετά από τροποποίηση των επιφανειών με το διδραστικό αντιδραστήριο γλουταραλδεΐδη (Σχήμα 1β). Η ποσότητα των ακινητοποιημένων γ-σφαιρινών ποντικού εκτιμήθηκε μέσω αντίδρασης με φθοροσημασμένο αντίσωμα κατά των γ-σφαιρινών ποντικού και μέτρηση του σήματος

φθορισμού. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε αισθητήρα φασματοσκοπίας ανάκλασης λευκού φωτός (WLRS)<sup>[8,9]</sup>, παρακολουθώντας σε πραγματικό χρόνο την αντίδραση των ακινητοποιημένων γ-σφαιρινών ποντικού με μη σημασμένο αντίσωμα κατά των γ-σφαιρινών ποντικού. Τέλος, σε ψηφίδες που είχαν τροποποιηθεί με APTES με τα δύο πρωτόκολλα που επιλέχθηκαν ακινητοποιήθηκε αντίσωμα κατά της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP), ενός ευρέως χρησιμοποιούμενου στην κλινική πράξη δείκτη φλεγμονής, και οι ψηφίδες χρησιμοποιήθηκαν για τον ανοσοχημικό προσδιορισμό της CRP.

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Υλικά και μέθοδοι: Όλα τα αντιδραστήρια και οι διαλύτες χρησιμοποιήθηκαν όπως παραλήφθηκαν. Τα υποστρώματα ήταν δισκίδια πυριτίου (Si-Mat, Γερμανία) στα οποία είχε δημιουργηθεί με θερμική οξείδωση στρώμα SiO<sub>2</sub> πάχους περίπου 1000 nm καθώς επίσης και δισκίδια στα οποία εναποτέθηκε ένα επιπλέον στρώμα Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> πάχους περίπου 100 nm. Όλα τα δισκίδια κόπηκαν σε ψηφίδες διαστάσεων 5x15 mm. Το πυκνό θειικό οξύ (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 95-97% (o/o)), η αιθυλική αλκοόλη (≥ 98%) και το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 30% (o/o)) ήταν από την Merck (Γερμανία). Η γλουταραλδεΐδη (25% β/o), το APTES, η αλβουμίνη ορού βοός (BSA), οι γ-σφαιρίνες ποντικού και το αντίσωμα αίγας κατά των γ-σφαιρινών ποντικού ήταν από την Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo, USA). Η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP) και το πολυκλωνικό αντίσωμα αίγας έναντι της CRP ήταν από την Scripps Laboratories (San Diego, CA, USA). Το σημασμένο με την φθορίζουσα Alexa Fluor 546 (AF546) πολυκλωνικό αντίσωμα αίγας έναντι των γ-σφαιρινών ποντικού ήταν από την Molecular Probes (Eugene, OR, USA).

Καθαρισμός και υδροφιλοποίηση ψηφίδων πυριτίου και τροποποίηση με APTES: Οι ψηφίδες καθαρίστηκαν αρχικά με ακετόνη και ισοπροπανόλη σε λουτρό υπερήχων για 15 min (σε κάθε διαλύτη) και ξηράθηκαν με ρεύμα αζώτου (N<sub>2</sub>). Ακολούθησε εμβάπτιση σε διάλυμα Piranha (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 1:1 o/o) για 20 min, έκλυση των επιφανειών με απεσταγμένο νερό και ξήρανση σε ρεύμα αζώτου. Αμέσως μετά, οι ψηφίδες εμβάπτιστηκαν σε διάλυμα APTES 2% (o/o) σε απεσταγμένο νερό ή σε 5% (o/o) απόλυτη αιθανόλη για 20 min και 1 ώρα, αντίστοιχα. Ακολούθως, οι επιφάνειες εκπλύθηκαν με τον αντίστοιχο διαλύτη, ξηράθηκαν σε ρεύμα N<sub>2</sub> και θερμάνθηκαν σε κλίβανο επί 20 min στους 120 °C. Κατόπιν, οι ψηφίδες αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία δωματίου (RT) επί 36 ώρες πριν χρησιμοποιηθούν για την ακινητοποίηση βιομορίων με φυσική προσρόφηση ή τροποποιήθηκαν απευθείας με γλουταραλδεΐδη.

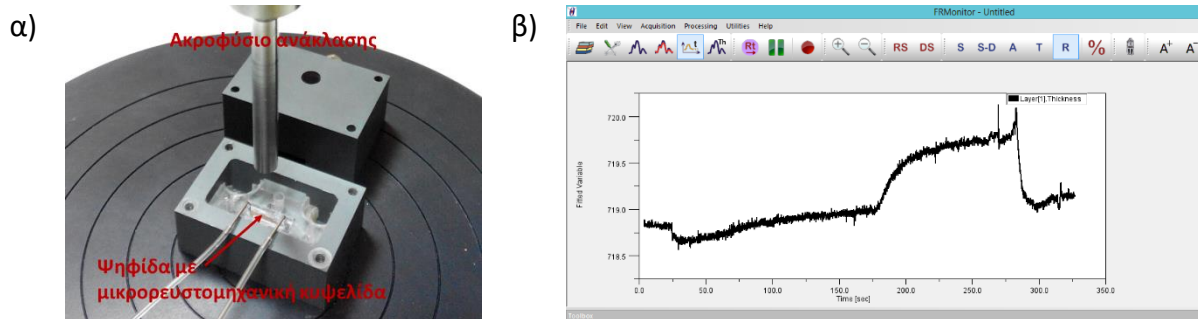
Τροποποίηση ψηφίδων με γλουταραλδεΐδη: Οι τροποποιημένες με APTES ψηφίδες εμβάπτιστηκαν σε διάλυμα γλουταραλδεΐδης συγκέντρωσης 2,5% (o/o) σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0,1 M, pH 7,4, για 1 ώρα σε RT. Ακολούθως οι ψηφίδες εκπλύθηκαν διαδοχικά με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών και απεσταγμένο νερό, ξηράθηκαν σε ρεύμα αζώτου και χρησιμοποιήθηκαν άμεσα για την ακινητοποίηση βιομορίων.

Ανίχνευση των ακινητοποιημένων στις ψηφίδες γ-σφαιρινών με αντίσωμα σημασμένο με AF546: Διάλυμα γ-σφαιρινών ποντικού συγκέντρωσης 100 μg/mL σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50 mM, pH 7,4, εναποτέθηκε στις ενεργοποιημένες με APTES ψηφίδες επί 24 ώρες σε RT ή για 1 ώρα στις ψηφίδες που είχαν τροποποιηθεί και με γλουταραλδεΐδη. Ακολούθησε έκπλυση με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50 mM, pH 7,4, (διάλυμα έκπλυσης) και εμβάπτιση των ψηφίδων σε διάλυμα αποκλεισμού (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50 mM, pH 7,4, που περιείχε 10 mg/mL BSA). Μετά από επώαση για 1 ώρα σε RT, οι ψηφίδες εκπλύθηκαν με διάλυμα έκπλυσης και νερό και ξηράθηκαν με ρεύμα αζώτου. Ακολούθως οι ψηφίδες επώαστηκαν με διάλυμα 5 μg/mL σημασμένου με AF546 αντισώματος αίγας έναντι των γ-σφαιρινών ποντικού σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50 mM, pH 7,4, που περιείχε 10 mg/mL BSA, για 1 ώρα σε RT. Κατόπιν, οι ψηφίδες εκπλύθηκαν διάλυμα έκπλυσης και νερό, και ξηράθηκαν σε ρεύμα αζώτου. Οι επιφάνειες παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού χρησιμοποιώντας κατάλληλο ζεύγος φίλτρων

διέγερσης/εκπομπής (598/615 nm), ελήφθησαν φωτογραφίες από διαφορετικές περιοχές της ψηφίδας και μετρήθηκε η ένταση του σήματος φθορισμού με το λογισμικό ImagePro Plus v 6.0.

**Ανίχνευση των ακινητοποιημένων στις ψηφίδες γ-σφαιρινών ποντικού με αισθητήρα WLRS:** Η ακινητοποίηση των γ-σφαιρινών ποντικού και ο αποκλεισμός των ελεύθερων θέσεων δέσμησης της επιφάνειας πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφηκε παραπάνω. Στις ψηφίδες προσαρμόστηκε μικρορεστομηχανική κυψελίδα (Σχήμα 2α) και τοποθετήθηκαν στην ειδική βάση της συσκευής ανάκλασης λευκού φωτός (BA-uProbe, θmetrisis, Ελλάδα), μέσω της οποίας πραγματοποιείται καταγραφή του φάσματος ανάκλασης σε πραγματικό χρόνο και μετατροπή από το λογισμικό (BA-monitor, θmetrisis, Ελλάδα) σε φαινόμενο πάχος βιομοριακής στοιβάδας (Σχήμα 2β). Αρχικά, διοχετεύεται στην επιφάνεια ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50 mM, pH 7,4, που περιείχε 10 mg/mL BSA (διάλυμα ανοσοανάλυσης) και ακολουθεί παροχέτευση διαδοχικά: διαλύματος αντισώματος αίγας κατά των γ-σφαιρινών ποντικού σε διάλυμα ανοσοανάλυσης για 10 min και διαλύματος ανοσοανάλυσης για 3 min. Η ταχύτητα ροής όλων των διαλυμάτων ήταν 50  $\mu$ L/mL.

**Ανίχνευση CRP με φασματοσκοπία ανάκλασης λευκού φωτός:** Σε χημικά ενεργοποιημένες ψηφίδες Si/SiO<sub>2</sub> εναποτέθηκε διάλυμα αντισώματος κατά της CRP συγκέντρωσης 100  $\mu$ g/mL σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50 mM, pH 7,4, και ακολούθησε επώαση σε RT για 24 ώρες στις τροποποιημένες με APTES ψηφίδες ή για 1 ώρα στις ψηφίδες που είχαν τροποποιηθεί με γλουταραλδεΐδη. Ακολούθησε έκπλυση των ψηφίδων, εμβάπτιση σε διάλυμα αποκλεισμού και επώαση για 1 ώρα σε RT. Οι ψηφίδες εκπλύθηκαν με διάλυμα έκπλυσης και νερό και ξηράθηκαν με ρεύμα αζώτου. Ακολούθησε προσαρμογή της μικρορεστομηχανικής κυψελίδας και τοποθέτηση της στη μετρητική διάταξη. Κατόπιν παροχέτευθηκαν διαδοχικά: διάλυμα Tris-HCl 50 mM, pH 7,8, που περιείχε 5 mg/mL BSA, 9 g/L NaCl (διάλυμα ανάλυσης), πρότυπα διαλύματα CRP σε διάλυμα ανάλυσης για 10 min, διάλυμα αντισώματος κατά της CRP συγκέντρωσης 10  $\mu$ g/mL σε διάλυμα ανάλυσης για 5 min, και τέλος διάλυμα ανάλυσης για 3 min.



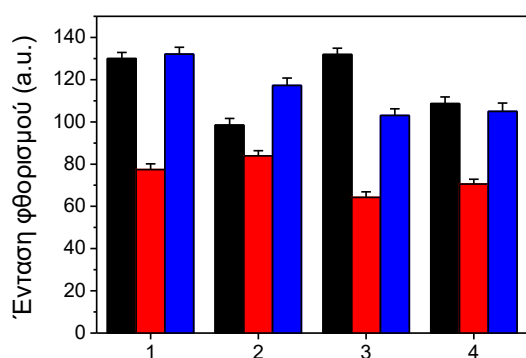
**Σχήμα 2.** (α) Φωτογραφία ψηφίδας Si/SiO<sub>2</sub> στην οποία έχει προσαρμοστεί η μικρορεστομηχανική κυψελίδα και έχει τοποθετηθεί στην βάση της μετρητικής διάταξης WLRS. (β) Παρακολούθηση της βιοαντίδρασης σε πραγματικό χρόνο μέσω του λογισμικού της μετρητικής διάταξης WLRS.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

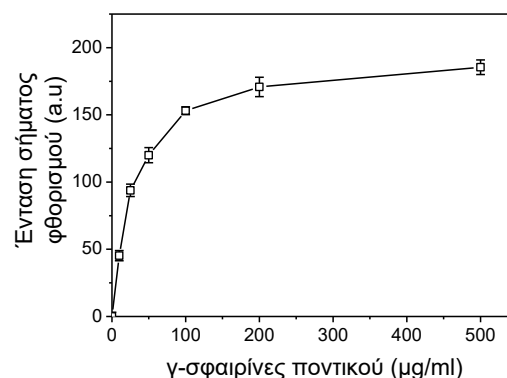
Αρχικά προσδιορίστηκαν οι βέλτιστες συνθήκες για καθένα από τα πρωτόκολλα τροποποίησης των επιφανειών διοξειδίου και νιτριδίου του πυριτίου με APTES. Συγκεκριμένα προσδιορίστηκε η βέλτιστη συγκέντρωση του σιλανίου, ο βέλτιστος χρόνος επώασης με την επιφάνεια, καθώς και ο χρόνος επώασης των τροποποιημένων επιφανειών με το διάλυμα της πρωτεΐνης. Η βελτιστοποίηση πραγματοποιήθηκε με ακινητοποίηση διαλύματος γ-σφαιρινών ποντικού (100  $\mu$ g/mL) και προσδιορισμό της έντασης φθορισμού μετά από επώαση με φθορισμοσημασμένο αντίσωμα κατά των γ-σφαιρινών ποντικού. Βρέθηκε ότι για το πρωτόκολλο τροποποίησης με υδατικό διάλυμα APTES, τα βέλτιστα αποτελέσματα επιτυγχάνονταν με εμβάπτιση σε διάλυμα 2% (o/o) για 20 min, ενώ για την τροποποίηση με διάλυμα σε αιθανόλη βέλτιστα αποτελέσματα επιτυγχάνονταν με εμβάπτιση σε διάλυμα 5% (o/o) για 1 ώρα, ενώ όσον αφορά την ακινητοποίηση

των γ-σφαιρινών ποντικού με φυσική προσρόφηση ο βέλτιστος χρόνος ήταν 18 ώρες. Επίσης βελτιστοποιήθηκε η τροποποίηση με γλουταραλδεΐδη τόσο ως προς την συγκέντρωση του διαλύματος της γλουταραλδεΐδης, τον χρόνο επώασης με τις επιφάνειες, τον χρόνο που μεσολαβεί από την τροποποίηση με το APTES και την επίδραση της θερμικής κατεργασίας στους 120 °C. Στο Σχήμα 3α παρουσιάζονται ενδεικτικά οι τιμές σήματος φθορισμού που ελήφθησαν από επιφάνειες διοξειδίου του πυριτίου που είχαν τροποποιηθεί με τα δύο πρωτόκολλα και χρησιμοποιηθεί είτε αμέσως είτε 3 ημέρες από την παρασκευή τους για ακινητοποίηση γ-σφαιρινών ποντικού με φυσική προσρόφηση (μαύρες στήλες) ή με ομοιοπολική σύνδεση μετά από τροποποίηση με γλουταραλδεΐδη χωρίς (κόκκινες στήλες) ή μετά από κατεργασία στους 120 °C (μπλε στήλες). Όπως φαίνεται, ακολουθώντας το πρωτόκολλο με APTES σε αιθανόλη επιτυγχάνονταν μέσω φυσικής προσρόφησης περίπου 30% υψηλότερα σήματα σε σύγκριση με εκείνα που ελήφθησαν όταν χρησιμοποιήθηκε υδατικό διάλυμα APTES. Όσον αφορά την ομοιοπολική σύνδεση, τα υψηλότερα σήματα ελήφθησαν από επιφάνειες που είχαν θερμανθεί στους 120 °C μετά την τροποποίηση με APTES και χρησιμοποιηθεί αμέσως μετά για την ακινητοποίηση των γ-σφαιρινών ποντικού. Επίσης, βρέθηκε ότι μέγιστες τιμές σήματος φθορισμού επιτεύχθηκαν για συγκεντρώσεις ακινητοποίησης γ-σφαιρινών ποντικού  $\geq 200$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Σχήμα 3β), ανεξαρτήτως του πρωτοκόλλου τροποποίησης. Πρέπει να σημειωθεί ότι παρόμοια αποτελέσματα ελήφθησαν για τις επιφάνειες διοξειδίου και νιτριδίου του πυριτίου όσον αφορά τις βέλτιστες συνθήκες τροποποίησης με τη διαφορά ότι οι επιφάνειες νιτριδίου παρείχαν σταθερά  $\sim 10\%$  χαμηλότερες τιμές φθορισμού.

α)



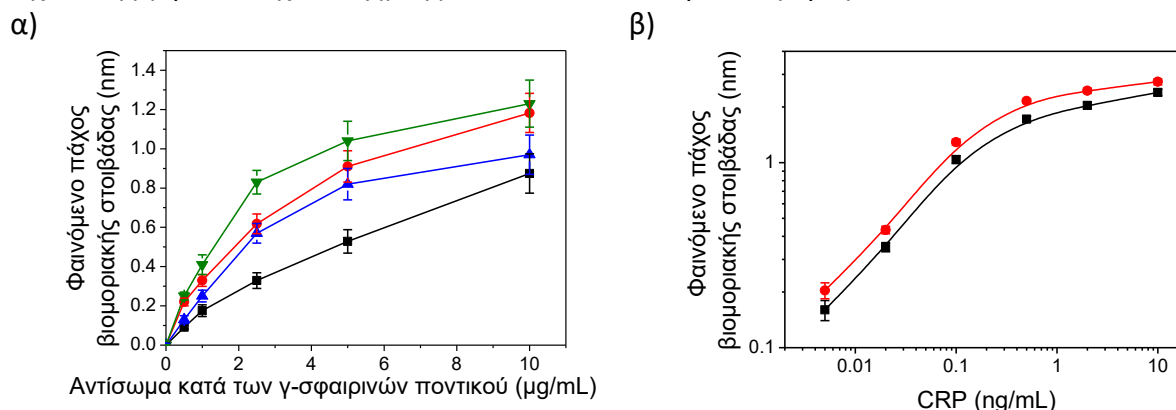
β)



**Σχήμα 3.** (α) Ένταση σήματος φθορισμού από επιφάνειες που είχαν τροποποιηθεί με 5% (ο/ο) APTES/EtOH (στήλες 1, 3) ή 2% (ο/ο) APTES/H<sub>2</sub>O (στήλες 2, 4) και χρησιμοποιήθηκαν ως είχαν (μαύρες στήλες) ή τροποποιήθηκαν με γλουταραλδεΐδη πριν (κόκκινες στήλες) και μετά από κατεργασία στους 120 °C (μπλε στήλες) την ίδια ημέρα (στήλες 1 & 2) ή τρεις ημέρες μετά την παρασκευή τους (στήλες 3 & 4). Η συγκέντρωση των γ-σφαιρινών ποντικού ήταν 100 ng/mL και του φθορισμοσημασμένου αντισώματος κατά των γ-σφαιρινών ποντικού 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . (β) Ένταση σήματος φθορισμού συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος των γ-σφαιρινών ποντικού που χρησιμοποιήθηκε για την επικάλυψη ψηφίδων που είχαν τροποποιηθεί με 5% (ο/ο) APTES/ΕΤΟΗ. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος 5 μετρήσεων  $\pm$  τυπική απόκλιση.

Τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν με μετρήσεις σε αισθητήρα φασματοσκοπίας ανάκλασης λευκού φωτός (WLRS) ο οποίος παρέχει την δυνατότητα παρακολούθησης βιομοριακών αντιδράσεων σε πραγματικό χρόνο. Στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιήθηκαν ψηφίδες πυριτίου/διοξειδίου του πυριτίου που είναι τα πλέον κατάλληλα υποστρώματα για τον συγκεκριμένο αισθητήρα<sup>[8,9]</sup>. Αρχικά, παρακολουθήθηκε η αντίδραση των γ-σφαιρινών ποντικού με μη σημασμένο αντίσωμα κατά των γ-σφαιρινών ποντικού. Όπως προκύπτει από το Σχήμα 4α, οι ψηφίδες που είχαν τροποποιηθεί με APTES σε αιθανόλη και γλουταραλδεΐδη παρείχαν τις υψηλότερες τιμές για όλη την περιοχή συγκεντρώσεων αντισώματος. Τέλος, σε ψηφίδες που είχαν τροποποιηθεί με APTES σε νερό και αιθανόλη και γλουταραλδεΐδη, ακινητοποιήθηκε αντίσωμα κατά της CRP και χρησιμοποιήθηκαν για τον ανοσοχημικό προσδιορισμό της CRP. Οι καμπύλες

βαθμονόμησης που ελήφθησαν παρουσιάζονται στο Σχήμα 4β από όπου προκύπτει ότι η επιφάνεια που είχε τροποποιηθεί με APTES σε αιθανόλη παρείχε υψηλότερες τιμές σήματος για όλη την περιοχή συγκεντρώσεων της καμπύλης βαθμονόμησης και βελτιωμένη ευαισθησία ανίχνευσης (όριο ανίχνευσης) της CRP κατά δύο περίπου φορές.



**Σχήμα 4.** (α) Καμπύλες βαθμονόμησης αντισώματος κατά των γ-σφαιρινών ποντικού που ελήφθησαν με τον αισθητήρα WLRS χρησιμοποιώντας ψηφίδες τροποποιημένες με: APTES 2% (o/o)/H<sub>2</sub>O (μαύρα τετράγωνα), APTES 2% (o/o)/H<sub>2</sub>O/γλουταραλδεΐδη (μπλε τρίγωνα), APTES 5% (o/o)/EtOH (κόκκινοι κύκλοι) ή APTES 5% (o/o)/EtOH/γλουταραλδεΐδη (πράσινα τρίγωνα). Το διάλυμα ακινητοποίησης των γσφαιρινών ποντικού ήταν 200 μg/mL. (β) Καμπύλες βαθμονόμησης CRP που ελήφθησαν με τον αισθητήρα WLRS με ψηφίδες τροποποιημένες με APTES 2% (o/o)/H<sub>2</sub>O (μαύρα τετράγωνα) ή APTES 5% (o/o)/EtOH (κόκκινοι κύκλοι). Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος 3 προσδιορισμών ± τυπική απόκλιση.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η προτεινόμενη μέθοδος χημικής ενεργοποίησης ψηφίδων πυριτίου η οποία συνίσταται στην κατεργασία με διάλυμα APTES 5% (o/o) σε απόλυτη αιθανόλη ακολουθούμενη από αντίδραση με γλουταραλδεΐδη αναμένεται να βοηθήσει στην βελτίωση των αναλυτικών χαρακτηριστικών οπτικών αισθητήρων με μεταλλάκτες σήματος που κατασκευάζονται από διοξείδιο ή νιτρίδιο του πυριτίου.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] E. Makarona, P. Petrou, S. Kakabakos, K. Misiakos, I. Raptis. *Biotechnol. Adv.* 34 (2016) 209-233.
- [2] M. Angelopoulou, S. Kakabakos, P. Petrou. *Chemosensors* 6 (2018) 52.
- [3] K. Misiakos, I. Raptis, E. Makarona, A. Botsialas, A. Salapatas, P. Oikonomou, A. Psarouli, P.S. Petrou, S.E. Kakabakos, K. Tukkinemi, M. Sopenan, G. Jobst. *Opt. Express* 22 (2014) 26803-26813.
- [4] D. Sarkar, N. Siva Kumar Gunda, I. Jamal, I., S.K. Mitra 2014. *Biomed. Microdevices* 16 (2014) 509-520.
- [5] M.-J. Banuls, R. Puchades, A. Maquieira. *Anal. Chim. Acta* 777 (2013) 1-16.
- [6] K. Awsiuik, A. Bernasik, M. Kitsara, A. Budkowski, P. Petrou, S. Kakabakos, S. Prauzner-Bechcicki, S., J. Rysz, I. Raptis. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 90 (2012) 159-168.
- [7] Y. Han, D. Mayer, A. Offenhausser, S. Ingebrandt. *Thin Solid Film* 510 (2016) 175-180.
- [8] G. Koukouvinos, D. Goustouridis, K. Misiakos, S. Kakabakos, I. Raptis, P. Petrou. *Sens. Actuator B* 260 (2018) 282-288.
- [9] D. Tsounidi, G. Koukouvinos, P. Petrou, K. Misiakos, G. Zisis, D. Goustouridis, I. Raptis, S.E. Kakabakos. *Sens. Actuators B* 282 (2019) 104-111.