



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ-ΔΙΑΣΦΑΛΙΣΗ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ»**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Μελέτη απταμερών ειδικών για την οξυτετρακυκλίνη και
ανάπτυξη ηλεκτροχημικού αισθητήρα για τον
προσδιορισμό της**

ΜΠΙΖΙΝΤΗ ΧΡΙΣΤΙΝΑ

ΑΘΗΝΑ

ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2024

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μελέτη απταμερών ειδικών για την οξυτετρακυκλίνη και ανάπτυξη
ηλεκτροχημικού αισθητήρα για τον προσδιορισμό της

ΜΠΙΖΙΝΤΗ ΧΡΙΣΤΙΝΑ

A.M.: 7111112200008

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Οικονόμου Αναστάσιος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Οικονόμου Αναστάσιος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Γκίκας Ευάγγελος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Κόκκινος Χρήστος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ: 18/10/2024

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η οξυτετρακυκλίνη (OTC) είναι ένα αντιβιοτικό ευρέος φάσματος, ικανό να αναστείλει την σύνθεση των πρωτεϊνών στα βακτήρια. Οι υπερβολικές δόσεις χορήγησής της είναι δυνατόν να αφήσουν κτηνιατρικά κατάλοιπα στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης, αποτελώντας κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία. Οι συνήθεις αναλυτικές τεχνικές για την ανίχνευσή της μπορούν να χαρακτηριστούν ως πολύπλοκες, χρονοβόρες και υψηλού κόστους. Για τον λόγο αυτό υπάρχει ανάγκη για περισσότερο άμεσες, υψηλής ευαισθησίας και χαμηλού κόστους μεθόδους όπως η χρήση βιοαισθητήρων.

Ως σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας τέθηκε η ανάπτυξη ενός ηλεκτροχημικού βιοαισθητήρα για την ανίχνευση της οξυτετρακυκλίνης σε τρόφιμα όπως το γάλα, με στοιχεία αναγνώρισης τα απταμερή. Βασικό χαρακτηριστικό των απταμερών αποτελεί η πρόσδεση τους με μόρια-στόχους με υψηλή ειδικότητα. Στο πλαίσιο της παραπάνω προσπάθειας κρίθηκε απαραίτητη η μελέτη της διαμόρφωσης των απταμερών στο χώρο. Για τον χαρακτηρισμό των απταμερών ως προς την αλλαγή της δομής τους κατά την πρόσδεση τους με τον αναλύτη αλλά και για την εκτίμηση της συγγένειας πρόσδεσης χρησιμοποιήθηκε ο Κυκλικός Διχρωισμός (CD) και ο Φθορισμός Πόλωσης (Fluorescence Polarization). Όσον αφορά την ανάπτυξη του βιοαισθητήρα χρησιμοποιήθηκαν ηλεκτρόδια χρυσού. Η πρόσδεση του απταμερούς με την οξυτετρακυκλίνη αξιολογήθηκε με χρήση των εξής βολταμετρικών τεχνικών: Κυκλική Βολταμετρία (CV), Διαφορική Παλμική Βολταμετρία (DPV), Ηλεκτροχημική Φασματοσκοπία Εμπέδησης (EIS).

Ακολούθησε επεξεργασία των αποτελεσμάτων, μελέτη και σχολιασμός των τελικών ευρημάτων. Σε κάθε περίπτωση, περαιτέρω έρευνα με έμφαση στην βελτιστοποίηση των συνθηκών δέσμευσης μπορεί να οδηγήσει την επιστημονική κοινότητα σε ακόμη πιο εμπειριστωμένα αποτελέσματα.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Αναλυτική Χημεία

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Απταμερή, Οξυτετρακυκλίνη, Κυκλικός Διχρωισμός, Φθορισμός Πόλωσης, Βιοαισθητήρες

ABSTRACT

Oxytetracycline (OTC) is a broad-spectrum antibiotic causes inhibition of protein synthesis in bacteria. Excessive doses of its administration may result in the detection of veterinary residues in food of animal origin which is a major challenge for human health. The most common analytical techniques used for the detection of OTC can be characterized as complex, time-consuming, and high cost. So, for this purpose, there is a great need for more direct, high sensitivity and low-cost methods such as the use of biosensors.

The aim of this study was the development of an electrochemical biosensor using aptamers as recognition elements, to detect OTC in food such as milk. One basic characteristic of aptamers is their capability to bind with molecules-targets with high specificity. Consequently, it was necessary to study the configuration that aptamers take on space. Circular Dichroism (CD) and Fluorescence Polarization (Fluorescence Polarization) were used for the characterization of their structure change while binding with the analyte and to estimate their binding affinity. For the development of the biosensor were used gold electrodes. Aptamer binding with oxytetracycline was evaluated using the following voltametric techniques: Cyclic Voltammetry (CV), Differential Pulse Voltammetry (DPV), Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS).

Finally, the results processing as well as the evaluation of the final findings took place. Further research with emphasis on optimizing binding conditions could lead to even more comprehensive results.

SUBJECT AREA: Analytical Chemistry

KEYWORDS: Aptamers, Oxytetracycline, Circular Dichroism, Fluorescence Polarization, Biosensors

Αφιερώνεται στην οικογένειά μου.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Τις εκ βάθους ευχαριστίες μου για την ευκαιρία που μου δόθηκε να πραγματοποιήσω την εν λόγω μελέτη στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας, θα ήθελα να εκφράσω στον επιβλέποντα αυτής, Καθηγητή κ. Οικονόμου Αναστάσιο. Η εμπιστοσύνη και η στήριξη από μέρους του, στα πλαίσια της προσωπικής μου προσπάθειας, ήταν για μένα τιμή και πολύτιμη ενθάρρυνση. Οι κατευθύνσεις στις οποίες με ώθησε υπήρξαν καίριες για την ολοκλήρωση της εργασίας μου.

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στον συνεπιβλέποντα της μελέτης μου, Δρ. Τσέκενη Γεώργιο, για την φιλοξενία και την διεξαγωγή μεγάλου μέρους των πειραμάτων στο εργαστήριο του, που στεγάζεται στο Ι.ΙΒ.Ε.Α.Α.. Οι γνώσεις και η εμπειρία του αποτέλεσαν καθοριστικά σημεία για την εκπόνηση της μεταπτυχιακής μου μελέτης.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους υποψήφιους διδάκτορες κ. Μέλιο Νικήτα, κ. Σούλη Διονύση, κα. Γκίκα Γεωργία, κα. Κούρτη Δήμητρα, καθώς και τις ερευνήτριες κα. Κουτσουμπέλη Έλενα και κα. Σπανού Κατερίνα με τη βοήθεια των οποίων πραγματοποιήθηκε ορθά το εργαστηριακό μέρος της εργασίας. Η αμέριστη στήριξη από πλευράς τους αλλά και η εμπειρία τους, με ευνόησαν καθ' όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας.

Ακόμη, θα ήθελα να απευθύνω ευχαριστίες στους καθηγητές μου και μέλη της εξεταστικής επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Γκίκα Ευάγγελο και τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Κόκκινο Χρήστο, για την πρόθυμη συμμετοχή τους στην αξιολόγηση και διόρθωση σημείων της εργασίας μου. Τους ευχαριστώ επίσης για τη γνώση με την οποία με εφοδίασαν κατά τη διάρκεια των σπουδών μου.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω ένα μεγάλο ευχαριστώ στους ανθρώπους που είναι δίπλα μου και ιδίως στην οικογένειά μου για τη στήριξη και την αγάπη με την οποία με εφοδιάζουν διαρκώς.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	XVIII
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 - ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 - ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ	4
2.1 Ορισμοί.....	4
2.2 Χημικοί Κίνδυνοι στα Τρόφιμα	5
2.2.1 Κατάλοιπα κτηνιατρικών φαρμάκων	6
2.2.2 Οξυτετρακυκλίνη	6
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 – ΑΠΤΑΜΕΡΗ	9
3.1 Γενικά για τα απταμερή	9
3.2 Επιλογή Απταμερών- SELEX.....	10
3.3 Απταμερή και Αντισώματα	12
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 – ΣΥΓΓΕΝΙΑ ΑΠΤΑΜΕΡΟΥΣ- ΣΤΟΧΟΥ	15
4.1 Μελέτη Συγγένειας Απταμερούς και Στόχου	15
4.2 Τεχνικές Προσδιορισμού Συγγένειας απταμερούς και στόχου.....	17
4.2.1. Φασματοσκοπικές Τεχνικές	18
4.2.2. Τεχνικές Διαχωρισμού	19
4.2.3 Τεχνικές που βασίζονται στην αλλαγή μάζας.....	20
4.2.4 Λοιπές Τεχνικές	21
4.3 Φασματοσκοπία Κυκλικού Διχρωισμού (CD)	21
4.4 Φθορισμομετρία Πολωμένου Φωτός (Fluorescence Polarization).....	27
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 – ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ.....	30
5.1 Γενικά για τους βιοαισθητήρες.....	30
5.2 Κατηγορίες Βιοαισθητήρων	32
5.2.1. Ταξινόμηση με βάση το είδος του στοιχείου βιοαναγνώρισης.....	32
5.2.1.1 Ενζυμικοί Βιοαισθητήρες.....	33
5.2.1.2 Ανοσοαισθητήρες.....	33
5.2.1.3 Βιοαισθητήρες DNA.....	34
5.2.2 Ταξινόμηση με βάση το είδος του μεταλλάκτη	35
5.2.2.1 Ηλεκτροχημικοί Βιοαισθητήρες.....	35

5.2.2.2 Οπτικοί Βιοαισθητήρες.....	36
5.2.2.3 Πιεζοηλεκτρικοί και Θερμικοί Βιοαισθητήρες.....	37
5.3 Βιοαισθητήρες και Απταμερή.....	37
5.3.1 Ηλεκτροχημικοί Αισθητήρες Απταμερών.....	39
5.4 Εφαρμογές Βιοαισθητήρων	43
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 – ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	45
6.1 Επιλογή Απταμερών	45
6.2 Κυκλικός Διχρωισμός	46
6.2.1 Παρασκευή Διαλυμάτων	46
6.2.2 Οργανολογία.....	47
6.2.3 Πειραματική Διαδικασία.....	48
6.3 Ένταση Φθορισμού- Φθορισμός Πόλωσης	50
6.3.1 Παρασκευή Διαλυμάτων	51
6.3.2 Οργανολογία.....	52
6.3.3 Πειραματική Διαδικασία.....	52
6.4 Ανάπτυξη Ηλεκτροχημικού Βιοαισθητήρα	53
6.4.1 Παρασκευή Διαλυμάτων	54
6.4.2 Οργανολογία	55
6.4.3 Πειραματική Διαδικασία	56
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 – ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	59
7.1 Αποτελέσματα Φασματομετρίας Κυκλικού Διχρωισμού.....	59
7.2 Αποτελέσματα Φθορισμομετρίας.....	64
7.3 Ηλεκτροχημικός Αισθητήρας για την ανίχνευση OTC.....	68
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8 – ΕΠΙΛΟΓΟΣ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	88
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ.....	89
ΑΝΑΦΟΡΕΣ	91

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Πορεία κτηνιατρικών φαρμάκων μέχρι τον ανθρώπινο οργανισμό ...	2
Σχήμα 2: Γενική ταξινόμηση χημικών κινδύνων στα τρόφιμα.....	5
Σχήμα 3: Χημική δομή οξυτετρακυκλίνης.....	7
Σχήμα 4: Σχηματική παρουσίαση αντίδρασης απταμερούς με μόριο-στόχο	9
Σχήμα 5: Σχηματική παρουσίαση διαδικασίας SELEX.....	12
Σχήμα 6: Γραφική παράσταση του κλάσματος δεσμευμένων απταμερών f_a συναρτήσει της συγκέντρωσης του στόχου T για την εκτίμηση της σταθεράς διάστασης K_d	17
Σχήμα 7: Σχηματική παρουσίαση Φασματόμετρου Κυκλικού Διχρωισμού	22
Σχήμα 8: Σχηματική απεικόνιση φάσματος απταμερούς, στόχου, συμπλόκου.....	24
Σχήμα 9: Φάσμα κυκλικού διχρωισμού απταμερούς 15-mer με διαφορετικές συγκεντρώσεις θρομβίνης	24
Σχήμα 10: Φάσμα κυκλικού διχρωισμού απταμερούς 29-mer με διαφορετικές συγκεντρώσεις θρομβίνης	25
Σχήμα 11: : Φάσμα κυκλικού διχρωισμού απταμερούς, απουσία και παρουσία καδμίου	26
Σχήμα 12: Φάσμα κυκλικού διχρωισμού για parallel, antiparallel G-quadruplex δομή.....	26
Σχήμα 13: Σχηματική απεικόνιση του φαινομένου του φθορισμού πόλωσης	27
Σχήμα 14: Σχηματική απεικόνιση φαινομένων εκπόλωσης και πόλωσης	28
Σχήμα 15: Τυπική διάταξη ενός βιοαισθητήρα	31
Σχήμα 16: Ηλεκτροχημικός Βιοαισθητήρας DNA	36
Σχήμα 17: Παραδείγματα αναδιάταξης της δομής του απταμερούς σε ηλεκτροχημικό βιοαισθητήρα και τροποποίηση του ηλεκτρικού σήματος.....	39

Σχήμα 18: Παράδειγμα πρόσδεσης απταμερούς και στόχου όπως αποτυπώνεται με διαφορική παλμική βολταμετρία (DPV).....	41
Σχήμα 19: Ηλεκτροχημικός βιοαισθητήρας απταμερούς για ανίχνευση ΟΤΑ.....	42
Σχήμα 20: Διαγραμματική απεικόνιση αντίστασης υπό αυξανόμενες συγκεντρώσεις acetamiprid.....	42
Σχήμα 21: Φάσματα CD διαλύματος ΟΤC διαφορετικών συγκεντρώσεων, απουσία απταμερούς.....	59
Σχήμα 22: Φάσματα CD διαλύματος απταμερούς ΟΤC-APT1-71 2uM απουσία και παρουσία ΟΤC (2-64uM) πριν (Α) και μετά (Β) την αφαίρεση του φάσματος ΟΤC.....	60
Σχήμα 23: Α. Φάσματα CD για το απταμερές ΟΤC-APT1-71 απουσία και παρουσία ΟΤC. Β. Πιθανή δευτεροταγής δομή ΟΤC-APT1-71.....	61
Σχήμα 24: Α. Φάσματα CD για το απταμερές ΟΤC-APT2-40 απουσία και παρουσία ΟΤC. Β. Πιθανή δευτεροταγής δομή ΟΤC-APT2-40.....	62
Σχήμα 25: Α. Φάσματα CD για το απταμερές ΟΤC-APT3 απουσία και παρουσία ΟΤC. Β. Πιθανή δευτεροταγής δομή ΟΤC-APT3.....	62
Σχήμα 26: Α. Φάσματα CD για το απταμερές ΟΤC-APT4 απουσία και παρουσία ΟΤC. Β. Πιθανή δευτεροταγής δομή ΟΤC-APT4.....	63
Σχήμα 27: Α. Φάσματα CD για το απταμερές ΟΤC-APT5 απουσία και παρουσία ΟΤC. Β. Πιθανή δευτεροταγής δομή ΟΤC-APT5.....	63
Σχήμα 28: Α. Φάσματα CD για το απταμερές ΟΤC-APT6 απουσία και παρουσία στόχου. Β. Πιθανή δευτεροταγής δομή ΟΤC-APT6.....	64
Σχήμα 29: Διάγραμμα έντασης φθορισμού (FI) της ΟΤC παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων του απταμερούς Α) ΟΤC-APT5, Β) ΟΤC-APT1-71, Γ) ΟΤC-APT6, Δ) ΟΤC-APT2-40.....	65
Σχήμα 30: Διάγραμμα φθορισμού πόλωσης (FP) της ΟΤC παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων του απταμερούς Α) ΟΤC-APT5, Β) ΟΤC-APT1-71, Γ) ΟΤC-APT6, Δ) ΟΤC-APT2-40.....	66

Σχήμα 31: FI της OTC παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων OTC-APT5. Kd=105.87nM.....	67
Σχήμα 32: FP της OTC παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων OTC-APT5. Kd=61.53nM.....	67
Σχήμα 33: Στάδια ανάπτυξης ηλεκτροχημικού αισθητήρα σε επιφάνεια Au-Sputtered ηλεκτροδίου για το απταμερές OTC-APT5-Thio με τεχνική A) CV, B) DPV οξείδωση, C) DPV αναγωγή, D) EIS.....	69
Σχήμα 34: Γραφήματα οξείδωσης DPV μη τροποποιημένου Au-Sputtered ηλεκτροδίου υπό διαφορετικές συγκεντρώσεις διαλύματος Ferri/Ferro.....	70
Σχήμα 35: Γραφήματα οξείδωσης DPV κατά την ανάπτυξη ηλεκτροχημικού αισθητήρα επί της επιφάνειας Au-Sputtered ηλεκτροδίου με ακινητοποίηση απταμερούς: A) OTC-APT5-Thio, B) OTC-APT2-40-Thio, C) OTC-APT1-71-Thio και D) OTC-APT7.....	71
Σχήμα 36: Ανάπτυξη αισθητήρα για κάθε απταμερές.....	71
Σχήμα 37: Γραφήματα οξείδωσης DPV σε επιφάνεια ηλεκτροδίου: A)SPE, B) Sputtered.....	72
Σχήμα 38: Ανάπτυξη αισθητήρα σε ηλεκτρόδια A)SPE B) Sputtered.....	73
Σχήμα 39: Γραφήματα οξείδωσης DPV σε επιφάνεια Au-Sputtered ηλεκτροδίου με διάλυμα MCE: A)1mM, B) 0.25mM, C) απουσία MCE.....	73
Σχήμα 40: Ανάπτυξη αισθητήρα υπό διαφορετικές συγκεντρώσεις διαλύματος MCE σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS.....	74
Σχήμα 41: Γραφήματα οξείδωσης DPV σε επιφάνεια Au-Sputtered ηλεκτροδίου με διάλυμα MCE: A) 0.25mM, B) απουσία MCE.....	74
Σχήμα 42: Ανάπτυξη αισθητήρα υπό διαφορετικές συγκεντρώσεις διαλύματος MCE σε ρυθμιστικό διάλυμα TRIS.....	75
Σχήμα 43: Γραφήματα οξείδωσης DPV σε επιφάνεια Au-Sputtered ηλεκτροδίου: A) παρουσία και B) απουσία αναγωγικού διαλύματος TCEP....	75
Σχήμα 44: Ανάπτυξη αισθητήρα παρουσία ή απουσία αναγωγικού διαλύματος TCEP.....	76

Σχήμα 45: Γραφήματα οξειδωσης DPV σε επιφάνεια Au-Sputtered ηλεκτροδίου με επώαση διαλύματος απταμερούς OTC-APT5-Thio: A) 20uM, B) 40uM και C) 80uM.....	77
Σχήμα 46: Ανάπτυξη αισθητήρα με χρήση διαφορετικών συγκεντρώσεων του απταμερούς OTC-APT5-Thio.....	77
Σχήμα 47: Γραφήματα οξειδωσης DPV σε επιφάνεια Au-Sputtered ηλεκτροδίου με χρήση OTC: A) υδατοδιαλυτής, B) μη υδατοδιαλυτής.....	78
Σχήμα 48: Ανάπτυξη αισθητήρα με χρήση διαλύματος OTC που διαφοροποιείται ως προς την ιδιότητα της να διαλύεται στο νερό.....	79
Σχήμα 49: Στάδια ανάπτυξης ηλεκτροχημικού αισθητήρα σε επιφάνεια Au-Sputtered ηλεκτροδίου με χρήση μορίου-συνδέτη για διαφορετικές συγκεντρώσεις OTC συμφωνά με τις τεχνικές A) CV, B) DPV οξειδωση, C) DPV αναγωγή και D) EIS.....	80
Σχήμα 50: Γραφήματα A) CV, B) οξειδωσης DPV και C) αναγωγής DPV κατά την ανάπτυξη ηλεκτροχημικού αισθητήρα επί της επιφάνειας Au-Sputtered ηλεκτροδίου με επώαση linker για 2 ώρες.....	81
Σχήμα 51: Γραφήματα A) CV, B) οξειδωσης DPV και C) αναγωγής DPV κατά την ανάπτυξη ηλεκτροχημικού αισθητήρα επί της επιφάνειας Au-Sputtered ηλεκτροδίου για διαφορετικά διαλύματα OTC.....	82
Σχήμα 52: Καμπύλη αναφοράς για διαλύματα OTC συγκέντρωσης 25, 50, 75, 100, 150, 200ng/ml.....	83
Σχήμα 53A: Γράφημα CV κατά την ανάπτυξη ηλεκτροχημικού αισθητήρα επί της επιφάνειας Au-Sputtered ηλεκτροδίου για διαφορετικά διαλύματα OTC.....	83
Σχήμα 53B: Γραφήματα B) οξειδωσης DPV και C) αναγωγής DPV κατά την ανάπτυξη ηλεκτροχημικού αισθητήρα επί της επιφάνειας Au-Sputtered ηλεκτροδίου για διαφορετικά διαλύματα OTC.....	84
Σχήμα 54: Καμπύλη αναφοράς για διαλύματα OTC συγκέντρωσης 25, 50, 100, 200, 400, 600ng/ml.....	85

Σχήμα 55: Γράφημα A) CV, B) οξείδωσης DPV και C) αναγωγής DPV κατά τα στάδια επώασης OTC-APT5-Amino 40uM και επώασης OTC 0ng/ml, 100ng/ml, 200ng/ml σε γάλα επί της επιφάνειας Au-Sputtered ηλεκτροδίου...86

Σχήμα 56: Καμπύλη αναφοράς για διαλύματα OTC συγκέντρωσης 0, 100, 200 ng/ml σε γάλα.....87

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Δευτεροταγείς και τριτοταγείς δομές απταμερών.....	10
Εικόνα 2: Εφαρμογές Βιοαισθητήρων.....	44
Εικόνα 3: Πλάκα μικροτιτλοδότησης 96 θέσεων.....	52
Εικόνα 4: Ηλεκτρόδια χρυσού: A) Screen-printed της εταιρείας DropSense B)Sputtered.....	56
Εικόνα 5: Αναλυτική συσκευή ανίχνευσης με χρήση linker.....	57

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Ανώτατα όρια καταλοίπων ΟΤC στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης.	8
Πίνακας 2: Σύγκριση Απταμερών-Αντισωμάτων	14
Πίνακας 3: Σειρά προσθήκης διαλύματος ΟΤC υπό διαφορετικές συγκεντρώσεις στο μετρούμενο διάλυμα απταμερούς 1uM.....	49
Πίνακας 4: Σειρά προσθήκης διαλύματος ΟΤC υπό διαφορετικές συγκεντρώσεις στο μετρούμενο διάλυμα απταμερούς 2uM.....	50

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η εν λόγω ερευνητική εργασία πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Αναλυτική Χημεία-Διασφάλιση Ποιότητας», του Τμήματος Χημείας, της Σχολής Θετικών Επιστημών, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Οι πειραματικές αναλύσεις έλαβαν χώρα στο εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών με επιβλέποντα τον Καθηγητή κ. Οικονόμου Αναστάσιο καθώς και στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών με επιβλέποντα τον ερευνητή κ. Τσέκενη Γεώργιο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 - ΕΙΣΑΓΩΓΗ

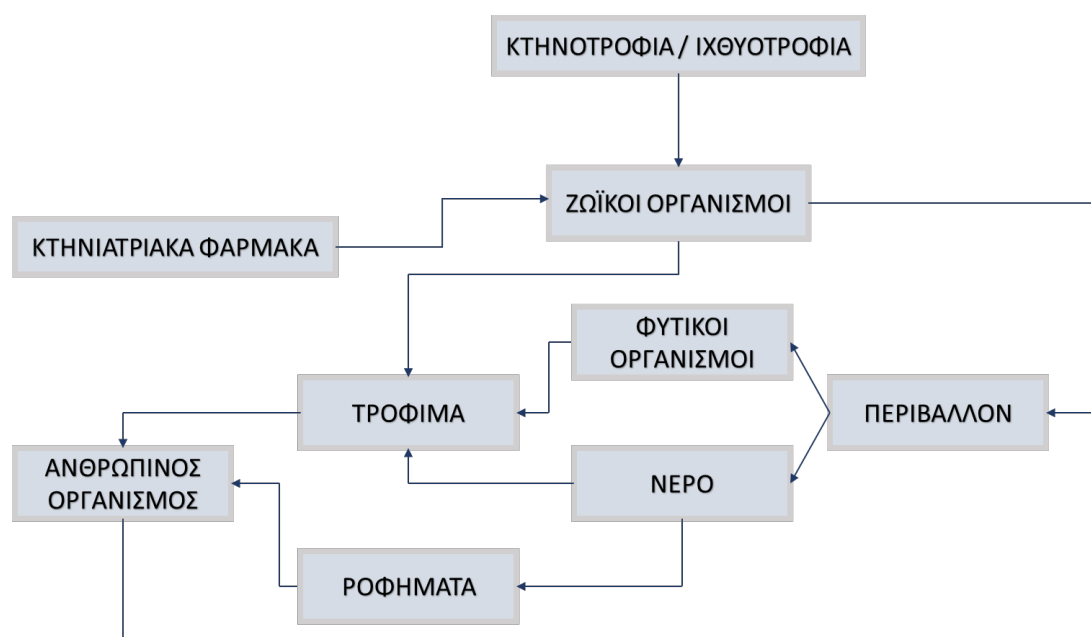
Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται αύξηση της παραγωγής από τα παραγωγικά ζώα. Ο αριθμός των κτηνοτροφικών και ορνιθοτροφικών μονάδων μπορεί να έχει μειωθεί, χωρίς ωστόσο να σημειώνεται μείωση στον αριθμό των ζώων που εκτρέφονται σε αυτές. Ταυτόχρονα όμως, το γεγονός αυτό δεν φαίνεται να επηρεάζει αρνητικά την παραγωγή, η οποία έχει γίνει πιο αποτελεσματική, αφού λιγότερα ζώα παράγουν μεγαλύτερες ποσότητες προϊόντων [1]. Η αύξηση αυτή είναι δυνατό να οφείλεται σε διάφορους παράγοντες όπως η προληπτική ιατρική, η γενετική επιλογή, η βελτιωμένη διατροφή και η διαχείριση της εκτροφής. Όσον αφορά την κτηνιατρική περίθαλψη συνίσταται η χρήση εμβολίων και προληπτικής ιατρικής για την αποφυγή ή τον περιορισμό λοιμώξεων, αντιβιοτικών και παρασιτοκτόνων για την αντιμετώπιση της ενεργού λοίμωξης ή την πρόληψη εμφάνισης νόσου και αντιβιοτικών φαρμάκων και ορμονών για την βελτίωση της παραγωγής, την ενίσχυση της ανάπτυξης και την βελτίωση της αποτελεσματικότητας της τροφής [1].

Όπως προαναφέρθηκε, τα οφέλη από τη χορήγηση κτηνιατρικών φαρμάκων σε παραγωγικά ζώα είναι πολλά. Παρόλα αυτά εγκυμονούν κινδύνους για την υγεία των καταναλωτών καθώς υπάρχει πιθανότητα μεταφοράς καταλοίπων στα ζωικά προϊόντα [2]. Οι άνθρωποι προκειμένου να καλύψουν τις διατροφικές τους ανάγκες καταναλώνουν τροφές πλούσιες σε πρωτεΐνες, κυρίως ζωικής προέλευσης (αυγά, κρέας, γάλα) [3]. Η ποιότητα αυτών προκαλεί μεγάλη ανησυχία σε παγκόσμιο επίπεδο, καθώς επηρεάζει σημαντικά την ανθρώπινη υγεία [2,3].

Τα ζώα που υποβάλλονται σε θεραπεία είτε μεταβολίζουν το φάρμακο γρήγορα και αποτελεσματικά, είτε αργά και ανεπαρκώς με αποτέλεσμα την συσσώρευση του στον οργανισμό [3]. Επιπλέον, υπάρχει πιθανότητα ανίχνευσης του στο κρέας, στο γάλα ή στα αυγά [2]. Υπάρχουν πολλοί παράγοντες που επηρεάζουν την ύπαρξη καταλοίπων φαρμάκων στα ζωικά προϊόντα όπως η ακατάλληλη ή υπερβολική χορήγηση φαρμάκου, η αδυναμία διατήρησης του χρόνου αναμονής μεταξύ συνεχόμενων δόσεων, οι κακές πρακτικές κατά την εκτροφή, οι ιδιότητες του φαρμάκου, τα φαρμακοκινητικά

χαρακτηριστικά του, οι φυσικοχημικές και βιολογικές διεργασίες των ζώων και των τροφίμων [2,3].

Κανένα προϊόν που προέρχεται από ζώο, το οποίο έχει υποβληθεί σε θεραπεία, δεν θα πρέπει να καταναλώνεται, εκτός και αν ολόκληρη η ποσότητα φαρμάκου έχει εξαλειφθεί. Κάτι τέτοιο καλείται ως μηδενική ανοχή και ισοδυναμεί με την πλήρη απουσία καταλοίπων φαρμάκων [2]. Με την διαρκή εξέλιξη των αναλυτικών τεχνικών τα όρια ανοχής ολοένα και μικραίνουν και αφορούν κλίμακες των τάξεων ppm, ppb, ppt. Έτσι λοιπόν, χρησιμοποιώντας υψηλής αποτελεσματικότητας αναλυτικές τεχνικές η ανίχνευση καταλοίπων φαρμάκων θα αφορά συγκεντρώσεις μη ικανές να αποτελέσουν τοξικό παράγοντα [2]. Για την προστασία των καταναλωτών έχουν θεσπιστεί ανώτατα όρια καταλοίπων από την Ευρωπαϊκή Ένωση, τις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής και την Κίνα [4].



Σχήμα 1: Πορεία κτηνιατρικών φαρμάκων μέχρι τον ανθρώπινο οργανισμό [4]

Σύμφωνα με τα παραπάνω, η ανάπτυξη αναλυτικών τεχνικών υψηλής ευαισθησίας και αποτελεσματικότητας, είναι πολύ σημαντική για την εξασφάλιση ενός ασφαλούς προϊόντος [5]. Γενικά, για την ανίχνευση κτηνιατρικών φαρμάκων στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης απαιτείται προ κατεργασία των δειγμάτων, καθορισμός της μεθόδου ανάλυσης και τέλος ανάλυση δεδομένων ώστε να αξιολογηθεί η σταθερότητα, η ακρίβεια και η

ευαισθησία της μεθόδου αυτής. Εξαιτίας της πολύπλοκης μήτρας και των πολλών ενδογενών ουσιών σε τρόφιμα τέτοιου είδους, η απευθείας ανίχνευση καταλοίπων κτηνιατρικών φαρμάκων καθίσταται αδύνατη [4]. Έτσι, διαφορετικές μέθοδοι εκχύλισης όπως η υγρό-υγρό εκχύλιση (LLE), η στερεής-φάσης (SPE), με διαλύτη υπό πίεση (ASE) χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό του δείγματος [4,5]. Ύστερα από την προετοιμασία των δειγμάτων ακολουθεί η ανάλυση με μεθόδους όπως η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC), η υγρή χρωματογραφία (LC), η αέρια χρωματογραφία (GC), η ανοσοενζυμική μέθοδος ELISA [4]. Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος για τον προσδιορισμό καταλοίπων κτηνιατρικών φαρμάκων στα ζωικά προϊόντα είναι η φασματομετρία μάζας υγρής χρωματογραφίας (LC-MS). Στην τεχνική αυτή, η υγρή χρωματογραφία λειτουργεί ως σύστημα διαχωρισμού ενώ η φασματομετρία μάζας ως σύστημα ανίχνευσης. Κατά αυτό τον τρόπο παρέχονται πληροφορίες για την μοριακή μάζα, υψηλή εκλεκτικότητα, υψηλή ευαισθησία και καλός διαχωρισμός [5].

Ταυτόχρονα με τα όποια πλεονεκτήματα των παραπάνω μεθόδων, απαιτούνται μεγάλες ποσότητες σε οργανικά αντιδραστήρια, πολύς χρόνος, έχουν αυξημένο κόστος και δεν είναι κατάλληλες για μεγάλο αριθμό δειγμάτων. Για τον λόγο αυτό έχουν αναπτυχθεί και χρησιμοποιούνται εναλλακτικά πιο γρήγορες, περισσότερο οικονομικές και εξίσου αποτελεσματικές μέθοδοι όπως η χρήση ηλεκτροχημικών βιοαισθητήρων [4].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 - ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

2.1 Ορισμοί

Σύμφωνα με τον παγκόσμιο οργανισμό υγείας η πρόσβαση σε ασφαλή και θρεπτικά τρόφιμα αποτελεί τον πλέον σημαντικό παράγοντα για την διατήρηση της ζωής και της καλής υγείας. Ένα μη ασφαλές προϊόν περιλαμβάνει επιβλαβή βακτήρια, ιούς, παράσιτα ή χημικά κατάλοιπα, ικανά να προκαλέσουν πάνω από 200 διαφορετικές ασθένειες. Αναφέρεται, επίσης, ότι περίπου 600 εκατομμύρια άνθρωποι παγκοσμίως, ποσοστό που ισοδυναμεί με 1 στους 10, ασθενούν από μολυσμένα τρόφιμα και πολλές φορές οδηγούνται σε θάνατο. Έτσι λοιπόν, βασικός στόχος του παγκόσμιου οργανισμού υγείας είναι η βελτίωση της ικανότητας του να προλαμβάνει, να εντοπίζει και να αντιμετωπίζει απειλές που σχετίζονται με μη ασφαλή τρόφιμα τόσο σε παγκόσμιο όσο και σε εθνικό επίπεδο [6].

Τα τρόφιμα θεωρούνται ως μη ασφαλή όταν εκτιμάται ότι είναι επιβλαβή για την υγεία και ακατάλληλα για ανθρώπινη κατανάλωση, όπως ορίζεται στο άρθρο 14 του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 178/2002 [7]. Επιπλέον, κατά τον παραπάνω κανονισμό ο όρος κίνδυνος χρησιμοποιείται για να περιγράψει τον βαθμό στον οποίο είναι πιθανή μια επιβλαβής συνέπεια στην υγεία και την σοβαρότητα αυτής, ως αποτέλεσμα της ύπαρξης μιας πηγής κινδύνου [7].

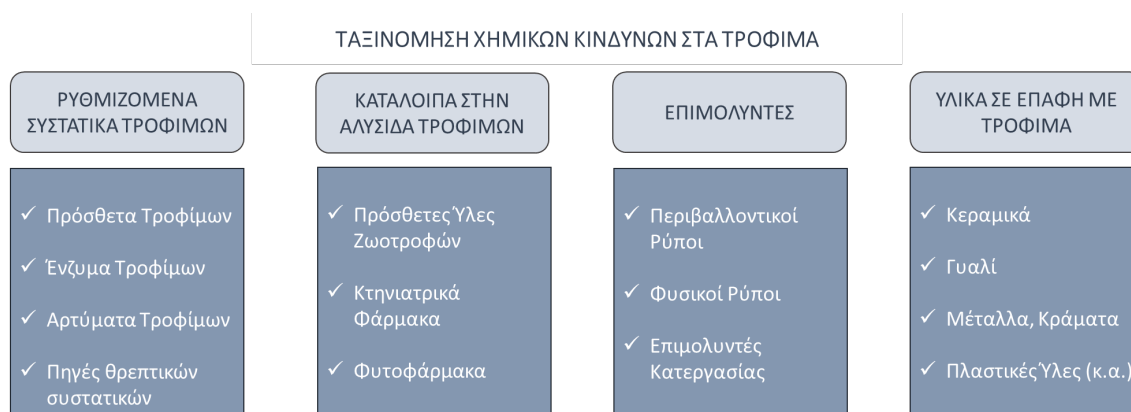
Οι κίνδυνοι στα τρόφιμα μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε φυσικούς, χημικούς και βιολογικούς [8,9]. Η ασφάλεια ενός τροφίμου μπορεί να βεβαιωθεί μέσω της ανάλυσης κινδύνων που είναι δυνατόν να προκύψουν σε όλα τα μέρη της παραγωγικής διαδικασίας [8]. Η ανάλυση κινδύνου αφορά στην διαδικασία που αποτελείται από τρεις αλληλένδετες συνιστώσες, οι οποίες είναι οι εξής: αξιολόγηση κινδύνου, διαχείριση κινδύνου και ενημέρωση σχετικά με τον κίνδυνο [7].

2.2 Χημικοί Κίνδυνοι στα Τρόφιμα

Όλα τα τρόφιμα περιέχουν χημικές ουσίες και είναι δυνατό να εκτίθενται σε αυτές σε τοξικά επίπεδα σε οποιοδήποτε στάδιο της παραγωγικής διαδικασίας και της εφοδιαστικής αλυσίδας [8,9]. Ο όρος χημικοί κίνδυνοι στα τρόφιμα αναφέρεται σε όλες αυτές τις ουσίες που έχουν τη δυνατότητα να προκαλέσουν αρνητικές συνέπειες στην υγεία και είτε απαντώνται σε αυτά φυσικά είτε είναι αποτέλεσμα προσθήκης κατά την παραγωγή ή την επεξεργασία τους [9].

Η Ευρωπαϊκή Ένωση έχει θεσπίσει αυστηρή νομοθεσία για τον έλεγχο των χημικών κινδύνων στα τρόφιμα. Πιο συγκεκριμένα, ο έλεγχος αυτός απευθύνεται σε γενικότερες κατηγορίες όπως τα ρυθμιζόμενα συστατικά τροφίμων, τα κατάλοιπα στην αλυσίδα τροφίμων, οι επιμολυντές και τα υλικά που έρχονται σε επαφή με τα τρόφιμα [9]. Σε αυτό το σημείο αξίζει να τονισθεί πως η υπάρχουσα νομοθεσία, στα πλαίσια του παραπάνω ελέγχου ορίζει ενέργειες που αφορούν ολόκληρη την τροφική αλυσίδα, από τις ζωοτροφές, την υγεία των ζώων, την προστασία των φυτών, την παραγωγή τροφίμων έως την μεταποίηση, αποθήκευση, μεταφορά και πώληση των προϊόντων [9].

Στον παρακάτω σχήμα παρουσιάζονται οι χημικοί κίνδυνοι των τροφίμων και οι επί μέρους κατηγορίες τους:



Σχήμα 2: Γενική ταξινόμηση χημικών κινδύνων στα τρόφιμα [9]

2.2.1 Κατάλοιπα κτηνιατρικών φαρμάκων

Σύμφωνα με το άρθρο 1 του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 2377/90, ως κατάλοιπα κτηνιατρικών φαρμάκων ορίζονται όλες οι φαρμακολογικώς ενεργές ουσίες, είτε πρόκειται για ενεργά συστατικά, είτε για έκδοχα, είτε για προϊόντα αποικοδόμησης, καθώς και τα προϊόντα μεταβολισμού τους που παραμένουν στα τρόφιμα που λαμβάνονται από τα ζώα στα οποία χορηγήθηκε το εν λόγω κτηνιατρικό φάρμακο [10]. Τα κτηνιατρικά φάρμακα μπορούν να χωριστούν σε έξι μεγάλες κατηγορίες οι οποίες είναι οι εξής: τα αντιμικροβιακά, τα αντιπαρασιτικά, τα αντιφλεγμονώδη, τα ηρεμιστικά, φάρμακα που ενισχύουν την ανάπτυξη και άλλα [5]. Η μεγαλύτερη κατηγορία φαρμάκων είναι τα αντιμικροβιακά, τα οποία από το 1950 και μετά χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση βακτηριακών λοιμώξεων [5]. Στην παραπάνω κατηγορία ανήκουν και τα αντιβιοτικά [5].

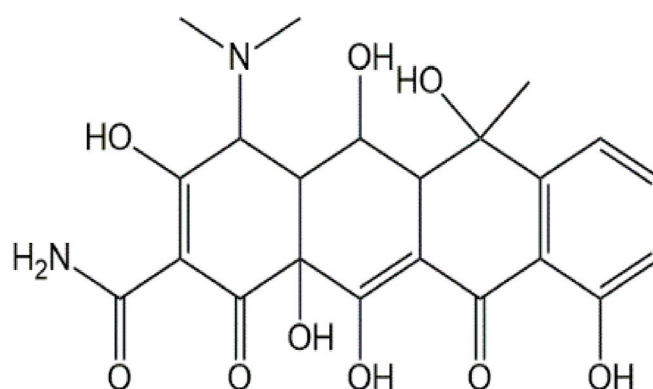
Τα αντιβιοτικά ορίζονται ως οι ουσίες που είναι ικανές να θανατώσουν ή να αναστείλουν την ανάπτυξη διαφόρων μικροοργανισμών. Παράγονται είτε φυσικά από τους ζωντανούς οργανισμούς είτε συνθετικά υπό εργαστηριακές συνθήκες. Στα ζώα μπορούν να χορηγηθούν από το στόμα, παρεντερικά ή τοπικά για την πρόληψη ή την αντιμετώπιση ασθενειών όπως η μαστίτιδα, η αρθρίτιδα αλλά και σε περίπτωση αναπνευστικών, γαστρεντερικών ή άλλων βακτηριακών λοιμώξεων [11]. Τα κατάλοιπα αυτών των ουσιών πολλές φορές συσσωρεύονται στα προϊόντα των παραγωγικών ζώων με αποτέλεσμα την μεταφορά στον ανθρώπινο οργανισμό και την πρόκληση σοβαρών προβλημάτων υγείας [5,11]. Στη βιβλιογραφία υπάρχουν αναφορές για αλλεργίες, βλάβες στο ανοσοποιητικό, καρκινογένεσεις, μεταλλάξεις, νευροπάθειες, αναπαραγωγικές διαταραχές, προβλήματα στο ήπαρ και το μυελό των οστών ακόμα και για αναφυλαξία [11].

2.2.2 Οξυτετρακυκλίνη

Το 1950 δημοσιεύτηκε η ανακάλυψη του αντιβιοτικού οξυτετρακυκλίνη (OTC) που παράγεται από το βακτήριο *Streptomyces rimosus*. Πρόκειται για ένα ευρέος φάσματος αντιβιοτικό που δρα αναστέλλοντας την σύνθεση πρωτεϊνών στα βακτήρια, ενώ αποτελεί σημαντικό μέλος της οικογένειας των βακτηριακών αρωματικών πολυκετιλίων [12]. Η OTC χορηγείται εκτενώς στους ανθρώπους

για θεραπευτικούς λόγους όπως η αντιμετώπιση λοιμώξεων αλλά και ως αντιβιοτικό ή αυξητικός παράγοντας στα εντατικά συστήματα κτηνοτροφίας και ιχθυοκαλλιέργειας [13,14]. Στην Κίνα εκατοντάδες τόνοι OTC κάθε χρόνο, χρησιμοποιούνται για την παραγωγή κτηνιατρικών φαρμάκων [15].

Σήμερα, η εκτεταμένη χρήση της σε κτηνοτροφικές μονάδες με στόχο την θεραπεία, την πρόληψη ή τον έλεγχο πολλών ασθενειών είναι δυνατό να προκαλέσει ανεπανόρθωτους κινδύνους στον τελικό καταναλωτή [16]. Επιπλέον, η βιοδιαθεσιμότητα της είναι χαμηλή οπότε η προσλαμβάνουσα OTC από τους ζωικούς οργανισμούς μεταβολίζεται μερικώς και τα υπολείμματα αποβάλλονται και απελευθερώνονται στο έδαφος, στα επιφανειακά και στα υπόγεια ύδατα [13]. Παρόλα αυτά οι υπερβολικές δόσεις χορήγησης αφήνουν κατάλοιπα στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης όπως το κρέας, το γάλα και τα αυγά και έτσι μέσω της τροφικής αλυσίδας περνούν στον ανθρώπινο οργανισμό [13,15,16].



oxytetracycline

Σχήμα 3: Χημική δομή οξυτετρακυκλίνης [16]

Μελέτες αναφέρουν πως η OTC μπορεί να καταστρέψει την ανθρώπινη επιδερμίδα και το ανοσοποιητικό, αλλά και να προκαλέσει την παραγωγή ανθεκτικών βακτηρίων [15,16]. Επιπλέον, η χρόνια έκθεση σε OTC προκαλεί γαστρεντερικό ερεθισμό και αλλαγές στη σύσταση του αίματος. Τέλος, γίνεται λόγος και για ηπατοτοξικότητα [17].

Με σκοπό την πρόληψη των αρνητικών συνεπειών, οι περισσότερες χώρες έχουν θεσπίσει μέγιστα όρια καταλοίπων (MRLs) [16]. Το 1998, στην 50^η συνάντησή της, η επιτροπή εμπειρογνομόνων FAO/WHO για τα πρόσθετα τροφίμων (JECFA) καθιέρωσε ως ημερήσια επιτρεπτή πρόσληψη τα 0-0,03 mg/kg ΣΒ για τα αντιβιοτικά οξυτετρακυκλίνη (OTC), τετρακυκλίνη (TC) και χλωροτετρακυκλίνη (CTC), ποσότητα που αφορά είτε το καθένα ξεχωριστά είτε τον συνδυασμό τους. Επιπλέον, πρότεινε ως MRL τα 100 µg/L στο γάλα ή στο κρέας για όλα τα παραγωγικά ζώα [13].

Τέλος, στον κανονισμό αριθ. 2377/90, η Ευρωπαϊκή Ένωση καθορίζει τα ανώτατα όρια καταλοίπων κτηνιατρικών φαρμάκων στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης [10].

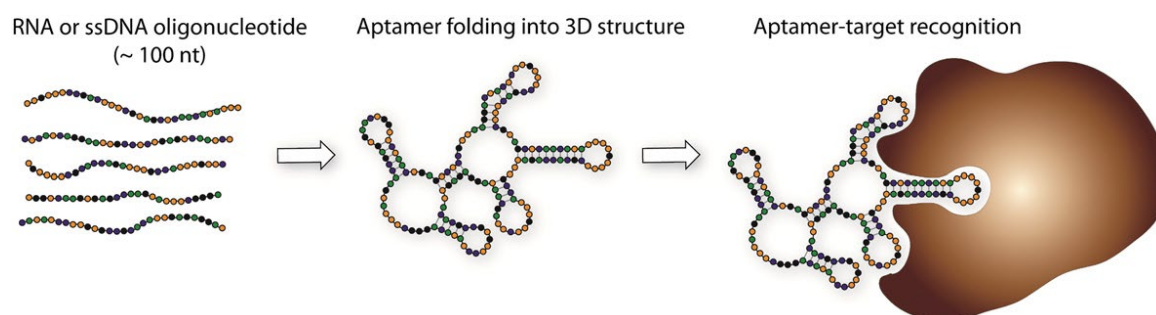
Πίνακας 1: Ανώτατα όρια καταλοίπων OTC στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης [10].

Φαρμακολογικώς Ενεργός Ουσία	Κατάλοιπο/Δείκτης	Ζωικά Είδη	Ανώτατα Όρια Καταλοίπων (µg/kg)	Ιστοί-Στόχοι
Οξυτετρακυκλίνη (OTC)	Ποσότητα για το αρχικό φάρμακο και το 4-επιμερές του	Όλα τα είδη παραγωγής τροφίμων	100	Μύες
			300	Ήπαρ
			600	Νεφρά
			100	Γάλα
			200	Αυγά

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 – ΑΠΤΑΜΕΡΗ

3.1 Γενικά για τα απταμερή

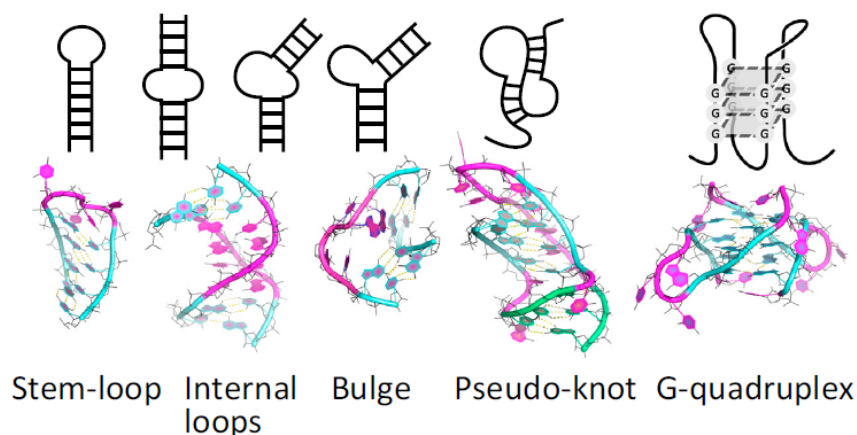
Τα απταμερή από την ανακάλυψη τους κιόλας, έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον των ερευνητών. Ξεκίνησαν ως θεραπευτικοί παράγοντες και μέσα σε λίγα χρόνια έγιναν βασικό αντικείμενο έρευνας για την αναλυτική χημεία [18]. Πρώτη φορά περιγράφηκαν στις αρχές του 1990 και γρήγορα αποτέλεσαν καλά ανεπτυγμένα εργαλεία για πολλές εφαρμογές στην έρευνα, την διάγνωση και τη θεραπεία [19]. Πέρα από τον πολλά υποσχόμενο ρόλο τους στις κλινικές διαγνώσεις ως θεραπευτικοί παράγοντες, χρησιμοποιούνται σε βασικές έρευνες για την διασφάλιση της ασφάλειας των τροφίμων και την παρακολούθηση του περιβάλλοντος [20]. Ο όρος «απταμερές» προέρχεται από το λατινικό «aptus», που σημαίνει ταιριάζω και την ελληνική λέξη «μέρος» [19]. Πρόκειται για μικρού μήκους (20-100 βάσεις) μονόκλινα ολιγονουκλεοτίδια DNA ή RNA που προσδένονται σε ένα στόχο με υψηλή συγγένεια και ειδικότητα, δημιουργώντας τριτοταγείς δομές [20,21].



Σχήμα 4: Σχηματική παρουσίαση αντίδρασης απταμερούς με μόριο-στόχο [19]

Τα απταμερή συντίθενται στο εργαστήριο (in vitro) και η αποθήκευσή τους γίνεται σχετικά εύκολα [22]. Συνήθως έχουν καθορισμένες δομές λόγω της τάσης τους να σχηματίζουν συμπληρωματικά ζεύγη βάσεων. Παραδείγματα τέτοιων δευτεροταγών δομών είναι οι εξής: stem, loop, bugle, pseudoknot, G-quadruplex, hairpin. Αυτές με την σειρά τους σχηματίζουν μοναδικές τρισδιάστατες δομές που αναγνωρίζουν συγγενικούς μοριακούς στόχους. Αλληλεπιδράσεις όπως η υδροφοβικότητα και η ηλεκτροστατικότητα, οι δεσμοί υδρογόνου, οι δυνάμεις van der Waals, η συμπληρωματικότητα ως προς το σχήμα και η σειρά των βάσεων (base stacking) είναι απαραίτητες για την

δημιουργία του συμπλόκου απταμερούς και στόχου, όπως παρόμοια συμβαίνει και κατά την σύνδεση αντισωμάτων με αντιγόνα [23].



Εικόνα 1: Δευτεροταγείς και τριτοταγείς δομές απταμερών [24]

Ως στόχοι αναφέρονται είτε μακρομόρια όπως πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα, ολόκληρα βακτηριακά κύτταρα είτε πιο μικρά μόρια όπως πεπτίδια, αμινοξέα, τοξίνες και ιόντα μετάλλων [22]. Η σύνδεση μεταξύ απταμερούς και μορίου-στόχου προϋποθέτει χαμηλό Kd και υψηλή ειδικότητα. Τέλος αξίζει να σημειωθεί πως η σύνδεση επηρεάζεται και από το περιβάλλον. Το απταμερές είναι πιο εύκολα ικανό να αναγνωρίσει τον στόχο του στο ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείται κατά τα εργαστηριακά πειράματα, παρά σε ένα πολυπληθές κυτταρικό περιβάλλον [21].

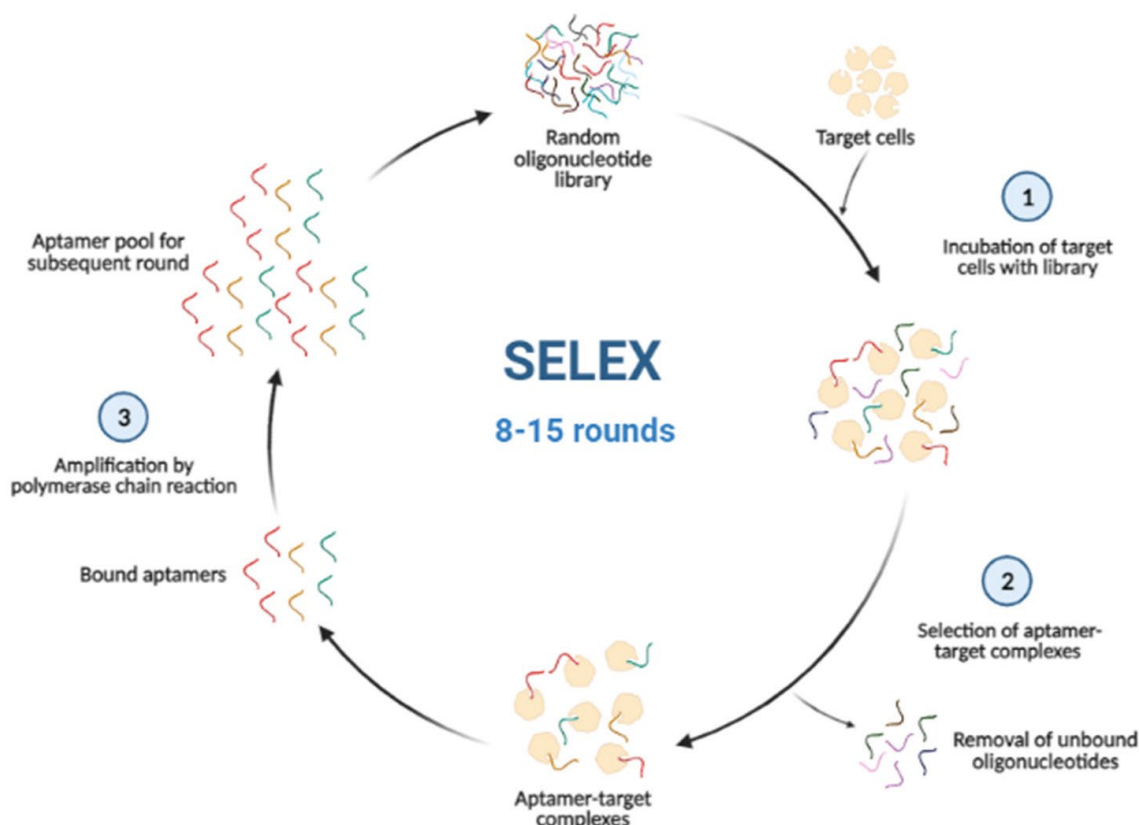
3.2 Επιλογή Απταμερών- SELEX

Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί πολλές μέθοδοι με στόχο την αξιόπιστη και αποτελεσματική παραγωγή απταμερών. Η βασική μέθοδος παραγωγής/επιλογής απταμερών καλείται “Systematic evolution of ligands by exponential enrichment” (SELEX) [20]. Η διαδικασία αυτή αναπτύχθηκε για πρώτη φορά το 1990, από δύο εργαστήρια των Ellington και Szostak και των Tuerk και Gold [19,25]. Από τότε έχει υποστεί πολλές τροποποιήσεις και βελτιώσεις, με αποτέλεσμα σήμερα να διαρκεί λίγες μόνο ώρες σε αντίθεση με παλαιότερα που διαρκούσε από λίγες εβδομάδες έως ένα μήνα [19].

Η SELEX περιλαμβάνει πολλές μεμονωμένες διαδικασίες καθεμία από τις οποίες συμβάλει στην επιτυχία ή αποτυχία δημιουργίας απταμερών [26]. Όλα τα απταμερή που επιλέγονται παρουσιάζουν υψηλή συγγένεια και ειδικότητα με τον στόχο με Kd της τάξης των μM έως nM [19,25]. Γενικότερα, η συγκεκριμένη μέθοδος αποτελείται από τρία βασικά στάδια τα οποία είναι τα εξής [25] :

1. Επώαση μορίων-στόχων με την βιβλιοθήκη μονόκλωνων νουκλεϊκών οξέων (DNA/RNA)
2. Διαχωρισμός των δεσμευμένων απταμερών με τον στόχο από τα μη δεσμευμένα
3. Ενίσχυση αυτών με τεχνική PCR

Πιο αναλυτικά, το μόριο-στόχος επωάζεται σε μία βιβλιοθήκη (pool) 10^{14} - 10^{16} με μονόκλωνα ολιγονουκλεοτίδια – απταμερή. Στη βιβλιοθήκη SELEX τα νουκλεοτίδια αποτελούνται συνήθως από 40-100 βάσεις με μία τυχαία περιοχή στη μέση και μία σταθερή περιοχή στο κάθε άκρο. Στη συνέχεια τα απταμερή που έχουν προσδεθεί με τον στόχο διαχωρίζονται από τα μη δεσμευμένα. Τέλος, τα δεσμευμένα DNA ολιγομερή εκλούνται και ενισχύονται με PCR [20]. Τα βήματα αυτά επαναλαμβάνονται για 8-15 κύκλους και η επικρατούσα «πισίνα» απταμερών κατά τον τελευταίο κύκλο αναλύεται με στόχο να καθοριστεί η αλληλουχία και το σχήμα τους [25]. Εκτός από τις DNA βιβλιοθήκες έχουν χρησιμοποιηθεί και RNA.



Σχήμα 5: Σχηματική παρουσίαση διαδικασίας SELEX [23]

Οι περισσότερες τροποποιήσεις στη SELEX έχουν ως στόχο την απλοποίηση της διαδικασίας ή την παραγωγή βελτιωμένων απταμερών και εστιάζουν σε αλλαγές στις συνθήκες πρόσδεσης, στην πλατφόρμα όπου πραγματοποιείται η επιλογή, στον τύπο του στόχου, στον σχεδιασμό της βιβλιοθήκης και στη μήτρα ακινητοποίησης [20]. Πλέον νέες προσεγγίσεις που υποστηρίζονται από τα κατάλληλα λογισμικά επιτρέπουν την πρόβλεψη της δομής του απταμερούς και της συγγένειας της δέσμευσης πριν ακόμα επιλεγεί το απταμερές, κάνοντας με αυτό τον τρόπο την διαδικασία της επιλογής περισσότερο οικονομική [19].

3.3 Απταμερή και Αντισώματα

Τα απταμερή είναι λειτουργικά συγκρίσιμα με τα αντισώματα προσφέροντας όμως μια σειρά πλεονεκτημάτων [23]. Το γεγονός αυτό ώθησε την επιστημονική κοινότητα να εξετάσει την χρήση τους σε μελέτες με μοριακούς στόχους [27]. Παρ' όλο που τα αντισώματα είναι μια σημαντική κατηγορία ενώσεων που χρησιμοποιείται σε πολλές εφαρμογές στην έρευνα για την

μοριακή ταυτοποίηση, η ανάπτυξη της SELEX βοήθησε στην απομόνωση αλληλουχιών ολιγονουκλεοτιδίων ικανών να αναγνωρίσουν οποιαδήποτε κατηγορία μορίων-στόχων, όχι μόνο με υψηλή συγγένεια αλλά και με αυξημένη ειδικότητα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τον ανταγωνισμό αντισωμάτων και απταμερών σε διαγνωστικές και θεραπευτικές εφαρμογές [27].

Έτσι, συγκριτικά με τα αντισώματα, τα απταμερή έχουν μικρό μοριακό βάρος, εύελικτη δομή, μπορούν να τροποποιηθούν με ευκολία ενώ διακρίνονται και για την υψηλή σταθερότητά τους. Επίσης, θετικό χαρακτηριστικό τους αποτελεί η εύκολη και γρήγορη παραγωγή τους στο εργαστήριο, γεγονός που ενισχύεται από την ικανότητα τους να παραμένουν σταθερά ακόμα και σε ακραίες συνθήκες όπως κατά τη διάρκεια θερμικής επεξεργασίας [18,20,23,25]. Εξίσου σημαντικό πλεονέκτημα τους είναι η υψηλή ακρίβεια και ειδικότητα με την οποία δεσμεύουν έναν στόχο, ιδιότητα που τα καθιστά εξαιρετικούς βιοδείκτες καθώς αυξάνουν την ακρίβεια της μοριακής αναγνώρισης. Είναι δεδομένο ότι σε περιπτώσεις πολλών στόχων ικανών να προσδεθούν στον ίδιο υποδοχέα, τα απταμερή προσφέρουν σχετικά υψηλή συγγένεια πρόσδεσης (binding affinity) [27]. Πιο συγκεκριμένα, η σταθερά διάστασης (dissociation constant, K_d) κυμαίνεται από nM έως και pM [25]. Επιπλέον, τα απταμερή μπορούν και διακρίνουν καλύτερα τον στόχο, δεν παρουσιάζουν διαφοροποιήσεις από παρτίδα σε παρτίδα (no batch to batch variability) και ελαχιστοποιούν τις παρενέργειες [25,27]. Τέλος δεν είναι τοξικά και χαρακτηρίζονται από έλλειψη ανοσογονικότητας [25]. Τα παραπάνω έχουν προσελκύσει τους ερευνητές να τα χρησιμοποιούν ως μοριακούς ανιχνευτές έναντι των αντισωμάτων [27].

Ωστόσο πολλές φορές τα απταμερή παρουσιάζουν μια σειρά από προκλήσεις που αποτελούν εμπόδια για την έρευνα και την εμπορευματοποίηση τους. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το γεγονός ότι λίγα απταμερή μπορούν να προσδεθούν με μικρά μόρια, τα οποία είναι ύψιστης σημασίας για την έρευνα λόγω της κλινικής και της εμπορικής τους χρήσης αλλά και των πολλών βιολογικών τους λειτουργιών [27]. Καταλήγοντας, αξίζει να σημειωθεί πως αποικοδομούνται ταχέως από τις νουκλεάσες σε βιολογικά μέσα, κάτι που είναι δυνατό να συμβάλει στον περιορισμό της χρήσης τους [27,28].

Πίνακας 2: Σύγκριση Απταμερών-Αντισωμάτων [27].

	Απταμερή	Αντισώματα
Μοριακό Βάρος	Μικρό (~ 12-30 kDa)	Σχετικά Μεγάλο (~150-180 kDa)
Δευτεροταγής Δομή	Διαφορετικές δομές (hairpin, loop, G-quadruplex, κ.α.)	β-sheet
Χρόνος Παραγωγής	Λίγες ώρες έως μήνες	Συνεχόμενοι μήνες (~ 6 μήνες)
Ποικιλία Παρτίδων	Χαμηλή	Υψηλή
Ανοσογονικότητα	Χαμηλή	Υψηλή
Ελάχιστο Μέγεθος Στόχου	Μικρό μέγεθος ~60Da	~600 Da
Στόχοι	Μεγάλη ποικιλία στόχων	Ανοσογόνο
Χρόνος Ζωής	Μεγάλος	Μικρός
Επιτρεπόμενες Χημικές Τροποποιήσεις	Πολλές	Περιορισμένες
Αποικοδόμηση Νουκλεασών	Ευαίσθητα	Ανθεκτικά
Χρόνος ημιζωής In-vivo	Μικρός (~20min)	Μεγάλος (~ένας μήνας)
Σταθερότητα	Πολύ σταθερά	Ευαίσθητα σε αλλαγές θερμοκρασίας και pH
Κόστος	Χαμηλό	Υψηλότερο

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 – ΣΥΓΓΕΝΙΑ ΑΠΤΑΜΕΡΟΥΣ- ΣΤΟΧΟΥ

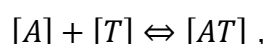
4.1 Μελέτη Συγγένειας Απταμερούς και Στόχου

Ύστερα από διαδοχικούς κύκλους της διαδικασίας SELEX, η βιβλιοθήκη των ολιγονουκλεοτιδίων που προκύπτει χρειάζεται να κλωνοποιηθεί. Τα ολιγονουκλεοτίδια που μπορούν να προσδεθούν ειδικά με τα μόρια-στόχους επιλέγονται από ένα μεγάλο αριθμό αλληλουχιών ως υποψήφια απταμερή [29]. Ανεξάρτητα από την επιδιωκόμενη εφαρμογή, η υψηλή συγγένεια με τον στόχο αποτελεί κρίσιμη παράμετρο για τα απταμερή [30]. Η διάκριση μεταξύ των αλληλουχιών που παρουσιάζουν συγγένεια με τον στόχο και αυτών που δεν παρουσιάζουν είναι σημαντικό στοιχείο της SELEX [31]. Οι περιορισμοί στην συγγένεια πρόσδεσης χρησιμοποιώντας την SELEX μπορεί να αφορούν περιορισμό στην μοριακή ποικιλομορφία στην αρχική βιβλιοθήκη, απώλεια της πιθανής υψηλής συγγένειας κατά την PCR, περιορισμούς σχετικά με τη δομή του ολιγονουκλεοτιδίου που αποτελείται από υδρόφιλες περιοχές, ελαχιστοποιώντας τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ απταμερούς και στόχου. Για την βελτίωση των παραπάνω προτείνεται βελτιστοποίηση της αλληλουχίας των απταμερών, σταθεροποίηση της δομής τους, εισαγωγή υδρόφοβων τμημάτων και σύζευξη των μοτίβων πρόσδεσης ώστε να αυξηθούν οι περιοχές επαφής μεταξύ απταμερών και μορίων-στόχων. Επιπλέον σημαντικό ρόλο παίζει η βελτιστοποίηση περιβαλλοντικών συνθηκών όπως το ρυθμιστικό διάλυμα, τα ιόντα, το pH και η θερμοκρασία [30].

Με την κατανόηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των απταμερών και των στόχων διευκρινίζονται οι μηχανισμοί δέσμευσης και βελτιώνεται ο σχεδιασμός της δομής του απταμερούς. Αυτό απαιτεί ολοκληρωμένες και λεπτομερείς μελέτες για τις ιδιότητες μοριακής αναγνώρισης, την χαρτογράφηση των περιοχών πρόσδεσης, την στοιχειομετρία της δέσμευσης και την μέτρηση των σταθερών ισορροπίας [32].

Υπάρχουν διαφορετικές μέθοδοι που καθορίζουν την συγγένεια πρόσδεσης, ωστόσο λίγες από αυτές είναι αποτελεσματικές για τον υπολογισμό πρόσδεσης απταμερούς με μικρά μόρια στόχους [31]. Σήμερα χρησιμοποιούνται διαφορετικές τεχνικές για τον χαρακτηρισμό και την βελτίωση της συγγένειας πρόσδεσης οι οποίες θα αναλυθούν στη συνέχεια [29]. Απαραίτητο είναι να

σημειωθεί πως ως μέγεθος μέτρησης της συγγένειας πρόσδεσης χρησιμοποιείται η σταθερά διάστασης K_d [31]. Πιο αναλυτικά, το K_d αντιπροσωπεύει τον βαθμό στον οποίο το σύμπλοκο μπορεί να αποσυνδεθεί και να προκύψει ελεύθερο απταμερές και στόχος, γεγονός που υποδηλώνει την συγγένεια πρόσδεσης τους. Σε κάθε περίπτωση υψηλό K_d συνεπάγεται αδυναμία σύνδεσης και υποδεικνύει χαμηλή συγγένεια, ενώ χαμηλό K_d συνεπάγεται ισχυρότερη σύνδεση άρα και υψηλή συγγένεια. Ο πιο συχνός τρόπος για τον υπολογισμό του K_d αφορά ογκομέτρηση σταθερής συγκέντρωσης απταμερούς με διαφορετικές συγκεντρώσεις του ειδικού για το απταμερές, στόχου. Αυτός ο τρόπος επιφέρει σταδιακή αύξηση των δεσμευμένων απταμερών καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του στόχου. Το κλάσμα των δεσμευμένων απταμερών f_a (fraction of bound aptamer) μπορεί να εκφραστεί ως συνάρτηση του K_d και της συγκέντρωσης T του στόχου (concentration of target). Μια τέτοια εξίσωση χρησιμεύει ως πρότυπο για τον προσδιορισμό του K_d και προκύπτει από την ενσωμάτωση δύο νέων εννοιών, την ολική συγκέντρωση του απταμερούς A_t (total aptamer concentration) και τις μέγιστες θέσεις πρόσδεσης του απταμερούς B_{max} (maximum aptamer binding sites). Όλες οι σχέσεις περιγράφονται μαθηματικά και σχηματικά παρακάτω και αφορούν μόνο περιπτώσεις μοντέλων απταμερών-στόχων με στοιχειομετρία 1:1, ενώ δεν ισχύουν στην περίπτωση απταμερούς με δύο θέσεις πρόσδεσης ή παρουσίας ανταγωνιστικών στόχων όπου εφαρμόζονται διαφορετικά μοντέλα.



$$K_d = \frac{[A][T]}{[AT]} = \frac{[A]_t - [AT] * [T]}{[AT]}$$

$$\frac{[AT]}{[A]_t} = \frac{[T]}{K_d + [T]} * B_{max} \rightarrow f_a = \frac{B_{max} * [T]}{K_d + [T]}$$

όπου $[A]$: συγκέντρωση ελεύθερων απταμερών

$[T]$: συγκέντρωση στόχου

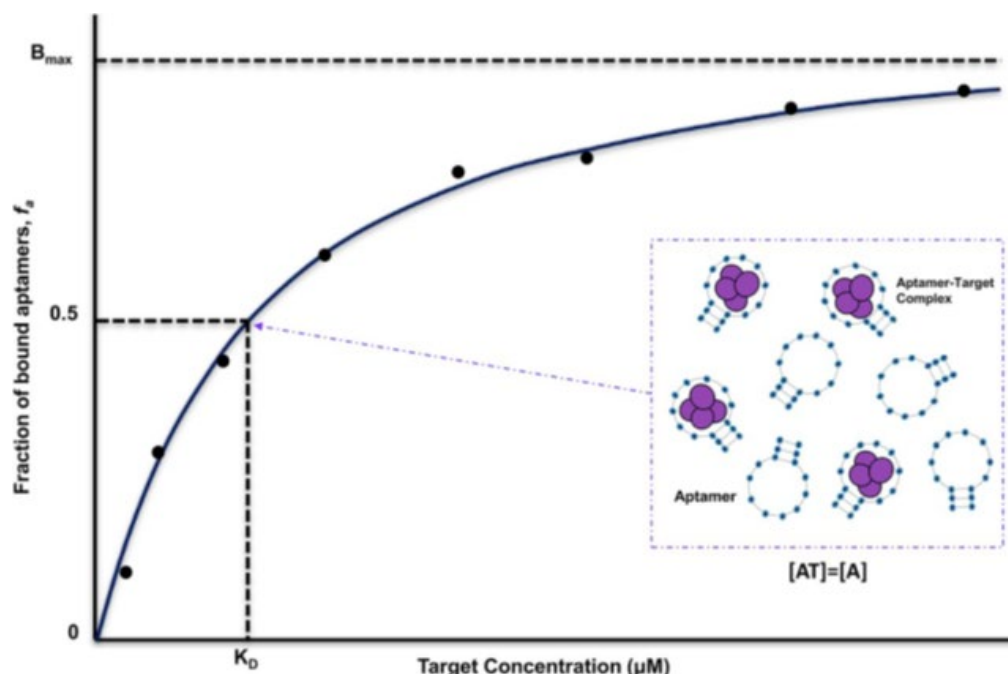
$[AT]$: συγκέντρωση συμπλόκου

$[A]_t$: ολική συγκέντρωση απταμερούς

B_{max} : μέγιστες θέσεις πρόσδεσης απταμερούς

f_a : κλάσμα δεσμευμένων απταμερών

Η εξίσωση αυτή αναπαρίσταται ως ορθογώνια υπερβολή στο πρώτο τεταρτημόριο η οποία τελειώνει με την καμπύλη να πλησιάζει επ' άπειρον μια σταθερή τιμή στο σημείο κορεσμού των θέσεων πρόσδεσης του απταμερούς (B_{max}).



Σχήμα 6: Γραφική παράσταση του κλάσματος δεσμευμένων απταμερών f_a συναρτήσει της συγκέντρωσης του στόχου T για την εκτίμηση της σταθεράς διάστασης K_d [33]

Σύμφωνα με το σχήμα, το K_d ισούται με το $[T]$ και ορίζεται ως η συγκέντρωση του στόχου κατά την οποία το 50% των απταμερών έχει προσδεθεί στον στόχο κάτω από συνθήκες ισορροπίας [33].

4.2 Τεχνικές Προσδιορισμού Συγγένειας απταμερούς και στόχου

Σύμφωνα με επιστημονικές μελέτες, μέχρι σήμερα έχει επιτευχθεί η απομόνωση πολλών απταμερών. Ωστόσο, η χρήση ακατάλληλης αναλυτικής μεθόδου καθιστά τις ιδιότητες δέσμευσης, σε κάποια από αυτά, αμφισβητήσιμες [34]. Οι χρησιμοποιούμενες τεχνικές για την μελέτη της συγγένειας πρόσδεσης μπορεί να είναι φασματοσκοπικές, διαχωρισμού, τεχνικές που βασίζονται στην μεταβολή της μάζας και άλλες [31]. Για την επιλογή της κατάλληλης τεχνικής είναι σημαντικό να ληφθούν υπόψιν εξωγενείς παράγοντες όπως το κόστος, η ευκολία χρήσης, η ανθεκτικότητα, η ευαισθησία και η ακρίβεια κάθε τεχνικής με στόχο την παραγωγή σταθερών αποτελεσμάτων. Τέλος η κατανόηση τόσο της θεωρητικής βάσης πίσω από

την εκάστοτε τεχνική όσο και των μοριακών ιδιοτήτων των αντιδρώντων (απταμερούς και αναλύτη-στόχου) που εμπλέκονται, αποτελεί προϋπόθεση για την επιλογή της καλύτερης στρατηγικής για τον υπολογισμό της συγγένειας πρόσδεσης [34].

4.2.1. Φασματοσκοπικές Τεχνικές

- Κυκλικός Διχρωισμός / Circular Dichroism (CD): Η μέθοδος αυτή αναφέρεται στην διαφορική απορρόφηση αριστερού και δεξιού κυκλικά πολωμένου φωτός. Κατά την δέσμευση του απταμερούς με τον στόχο μπορεί να παρατηρηθεί αλλαγή στο φάσμα του CD, ωστόσο για να έχει η μέθοδος καλή ευαισθησία απαιτείται σημαντική διαφορά στη δομή κατά την δέσμευση του στόχου [31]. Με τον CD παρέχεται γρήγορη ανίχνευση αλλαγών στη δομή, πολύπλοκων σχηματισμών και στοιχειομετρίας δέσμευσης. Παρόλα αυτά χρειάζονται υψηλές συγκεντρώσεις ή μεγαλύτεροι όγκοι δείγματος, καθώς παρουσιάζει μικρότερη ευαισθησία σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις αντιδρώντων. $K_d \sim 1 \mu M$ [34].

- Ένταση Φθορισμού / Fluorescence Intensity (FI): Ο φθορισμός του απταμερούς ή του στόχου είναι δυνατό να σβήσει ή να αυξηθεί με την σύζευξη. Αυτό απαιτεί είτε ένα φθορίζον μικρό μόριο είτε έναν επισημασμένο στόχο [31]. Είναι μία ευαίσθητη και ακριβής στην ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση σημάτων μέθοδος. Ωστόσο παρουσιάζει ευαισθησία σε αλλαγές των συνθηκών του ρυθμιστικού διαλύματος, όπως το pH, η συγκέντρωση των αλάτων και οι αναστολείς. $K_d \sim 1-5 \text{ nM}$ [34].

- Πόλωση Φθορισμού / Fluorescence Polarization (FA): Ένα φθοροφόρο διεγείρεται με πολωμένο φως και, λόγω της περιστροφικής διάχυσης το μέγεθος του φθοροφόρου θα ορίσει την αναλογία του πολωμένου φωτός που εκπέμπεται. Αυτό απαιτεί είτε ένα φθορίζον μικρό μόριο είτε έναν επισημασμένο στόχο με φθορίζουσα ουσία [31]. Πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι η μεγαλύτερη ακρίβεια στην ανίχνευση της δέσμευσης απταμερούς με τον στόχο καθώς και η ευαισθησία κατά την αλλαγή στην ένταση του σήματος. Όμως παράλληλα παρουσιάζει ευαισθησία σε αλλαγές των συνθηκών του ρυθμιστικού διαλύματος, και επιπλέον έχει αυξημένο λειτουργικό και οργανικό κόστος. $K_d \sim 1-80 \text{ nM}$ [34].

- Απορρόφηση Υπεριώδους-Ορατής Ακτινοβολίας / UV-Vis Absorption: Αυτή η μέθοδος απαιτεί αλλαγή στην ένταση ή στο μήκος κύματος της απορρόφησης του φάσματος είτε του απταμερούς είτε του στόχου [31]. Πρόκειται για μία σύντομη και εύκολη στη χρήση μέθοδο. Ταυτόχρονα όμως είναι λιγότερο ευαίσθητη σε χαμηλές συγκεντρώσεις αντιδρώντων και απαιτεί μεγαλύτερες συγκεντρώσεις δείγματος. $K_d \sim 1\mu\text{M}$ [34].

- Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός / Nuclear Magnetic Resonance (NMR): Συγκρίνοντας την ετεροπυρηνική απλή φασματοσκοπία κβαντικής συνοχής (HSQC) μεμονωμένων αμινικών πρωτονίων στο ελεύθερο και δεσμευμένο απταμερές, είναι δυνατό να παρατηρηθούν αλλαγές στις χημικές μετατοπίσεις των κορυφών. Για καλή ευαισθησία απαιτούνται αλλαγές διαμόρφωσης στο απταμερές [31].

4.2.2. Τεχνικές Διαχωρισμού

- Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης / High Performance Liquid Chromatography (HPLC): Η χρωματογραφία διαχωρίζει αναλύτες με βάση τις διαφορετικές αλληλεπιδράσεις του με την σταθερή φάση [32]. Στην συγκεκριμένη μέθοδο οι ζώνες διαχωρισμού του ελεύθερου απταμερούς, του στόχου και του συμπλόκου που δημιουργείται μεταξύ τους μπορούν να χρησιμοποιηθούν με στόχο την αξιολόγηση κατανομής της ισορροπίας μεταξύ αυτών των συστατικών. Η εφαρμογή της είναι δύσκολη σε περίπτωση όπου ο στόχος είναι μικρά μόρια καθώς επιδρούν λιγότερο στο διαχωρισμό μεταξύ του ελεύθερου απταμερούς και του συμπλόκου που δημιουργείται μεταξύ τους [31]. Θεωρείται μέθοδος με καλύτερη ανάλυση σε περίπτωση μοριακών διαχωρισμών και με μειωμένο χρόνο ανάλυσης. Επιπλέον δίνει ακριβείς μετρήσεις σε συγκεντρώσεις διαλυμένων ουσιών. Στα μειονεκτήματα της HPLC μπορούν να αναφερθούν η απόφραξη της στήλης, ο ακριβός εξοπλισμός όπως τα ρυθμιστικά διαλύματα, η μήτρα επίλυσης και τα όργανα, και η αυξημένη πιθανότητα συσσώρευσης νεκρού όγκου. Τέλος χρειάζονται απαραίτητα έλεγχοι και δοκιμές πριν από τις πειραματικές εκτελέσεις. $K_d \sim 1\mu\text{M}$ [34].

- Τριχοειδής Ηλεκτροφόρηση / Capillary Electrophoresis (CE): Η CE διαχωρίζει τους αναλύτες ενός διαλύματος με βάση το μέγεθος και το φορτίο [32]. Πρόκειται για μία μέθοδο παρόμοια με την HPLC με την διαφορά ότι

χρησιμοποιεί ηλεκτρικό πεδίο για τον διαχωρισμό των συστατικών του μείγματος [31]. Παρουσιάζει υψηλή ευαισθησία και παρέχει γρήγορη ανάλυση του συμπλόκου απταμερούς-στόχου, ενώ δεν επηρεάζεται από την αποσύνθεσή του. Επίσης μπορεί να λειτουργήσει αυτοματοποιημένα και να πραγματοποιήσει ανάλυση πολλαπλών δειγμάτων χρησιμοποιώντας ελάχιστο όγκο δείγματος. Τέλος η μέθοδος αυτή επηρεάζεται από τις συνθήκες του ρυθμιστικού διαλύματος. $K_d \sim 1-10\text{nM}$ [34].

- Διάλυση / Dialysis: Η διάλυση επιτρέπει στο απταμερές, το στόχο και το σύμπλοκο να εξισορροπήσουν σε μία κυψέλη δύο διαμερισμάτων με τη χρήση ημιπερατής μεμβράνης που επιτρέπει την διέλευση μόνο στα μικρότερα συστατικά. Αυτή η διαδικασία μπορεί να παρεμποδιστεί από μη ειδική προσρόφηση μικρών μορίων στόχων στη μεμβράνη [31]. Αξίζει να τονιστεί πως η εφαρμογή των παραπάνω προϋποθέτει την διαφορά μεγέθους μεταξύ στόχου και απταμερούς [32].

4.2.3 Τεχνικές που βασίζονται στην αλλαγή μάζας

- Συντονισμός Επιφανειακών Πλασμονίων / Surface Plasmon Resonance (SPR): Κατά την μέθοδο SPR πραγματοποιείται ακινητοποίηση του απταμερούς ή του στόχου σε ένα μέταλλο και με την προθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων του μη ακινητοποιημένου στοιχείου δημιουργείται σύμπλοκο και υπολογίζονται οι αλλαγές στον δείκτη διάθλασης [31]. Παρόλο που η SPR είναι εύκολη στην χρήση, παρουσιάζει μικρή ευαισθησία κατά την ανίχνευση χαμηλών συγκεντρώσεων αναλύτη. Κατά την ανάλυση χρησιμοποιούνται μικροί όγκοι δείγματος και συνεισφέρει στην κινητική ανάλυση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ στόχου και απταμερούς. Τέλος πρόκειται για υψηλού κόστους μέθοδο με δύσκολη προετοιμασία δειγμάτων. $K_d \sim 1\text{pM}$ [34].

- Μικροζυγός Κρυστάλλων Χαλαζία / Quartz Crystal Microbalance (QCM): Η QCM κάνει χρήση πιεζοηλεκτρικών κρυστάλλων με σκοπό να συσχετίσει την συσσώρευση μάζας (κατά την δέσμευση του στόχου) με την μείωση της συχνότητας συντονισμού του κρυστάλλου χαλαζία [31]. $K_d \sim 1\mu\text{M}-1\text{nM}$ [34].

4.2.4 Λοιπές Τεχνικές

- Θερμιδομετρία Ισόθερμης Τιτλοδότησης / Isothermal Titration Calorimetry (ITC): Πρόκειται για μέθοδο που επιτρέπει τον ταυτόχρονο προσδιορισμό του K_d , της στοιχειομετρίας και των θερμοδυναμικών ιδιοτήτων και βασίζεται στο γεγονός ότι ο σχηματισμός του συμπλόκου απταμερούς και στόχου είναι εξώθερμη αντίδραση [31]. Χαρακτηρίζεται από υψηλή ευαισθησία και ακρίβεια για τον υπολογισμό της συγγένειας πρόσδεσης. $K_d \sim 1-10\text{nM}$ [34].

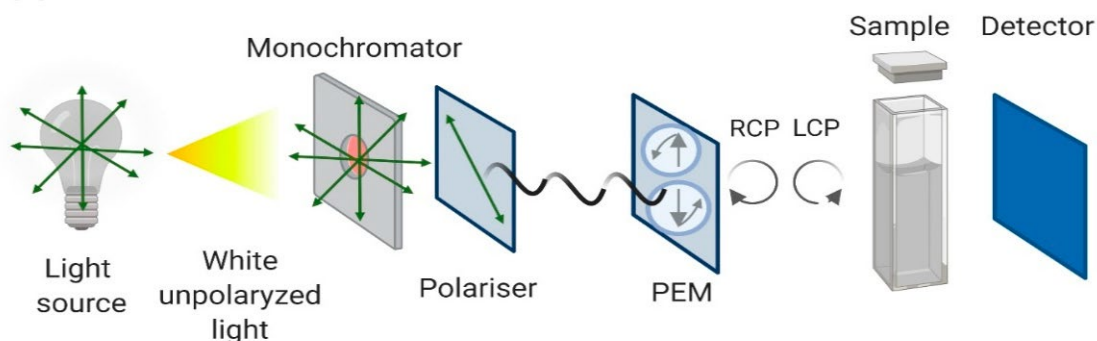
Συμπερασματικά προκύπτει ότι υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός μεθόδων που χρησιμοποιούνται με σκοπό τον υπολογισμό της συγγένειας πρόσδεσης απταμερούς και στόχου, γεγονός που δηλώνει την μεγάλη σημασία αλλά και την δυσκολία αυτού του υπολογισμού. Αξίζει να τονισθεί πως καμία μέθοδος δεν είναι κατάλληλη για όλες τις περιπτώσεις [32]. Έτσι απαιτείται να ληφθούν υπόψιν παράγοντες όπως το είδος του στόχου, ο όγκος του δείγματος, η ευαισθησία, το αναμενόμενο εύρος K_d , το ρυθμιστικό διάλυμα, η ταχύτητα και το κόστος ανάλυσης, κ.α. [32,34]. Η εγκυρότητα των υπολογισμών μπορεί να βελτιστοποιηθεί χρησιμοποιώντας μετρήσεις που δεν περιορίζονται μόνο σε μετρήσεις τιτλοδότησης αλλά και σε περαιτέρω μετρήσεις θερμοδυναμικής και κινητικής [34]. Παρακάτω θα αναλυθούν με μεγαλύτερη λεπτομέρεια δύο από τις σημαντικότερες μεθόδους για τον χαρακτηρισμό της συγγένειας πρόσδεσης αλλά και της δομής του συμπλόκου. Αυτές είναι η Φασματοσκοπία Κυκλικού Διχρωισμού (CD) και η Φθορισμομετρία πολωμένου φωτός (Fluorescence Polarization).

4.3 Φασματοσκοπία Κυκλικού Διχρωισμού (CD)

Η Φασματοσκοπία Κυκλικού Διχρωισμού (CD) είναι μία παράγωγη μέθοδος της UV-vis απορρόφησης και αφορά την διαφορά απορρόφησης δεξιόστροφου και αριστερόστροφου κυκλικά πολωμένου φωτός από μία ουσία [32,35]. Πιο αναλυτικά, η τεχνική αυτή χρησιμοποιεί κυκλικά πολωμένο φως στο οποίο το ηλεκτρικό πεδίο περιστρέφεται γύρω από τον άξονα διάδοσης με σταθερό μέγεθος. Ο τύπος του πολωμένου φωτός μπορεί να είναι είτε δεξιόστροφος είτε αριστερόστροφος. Οι οπτικά ενεργές ουσίες όπως οι πρωτεΐνες παρουσιάζουν διαφορετική απορρόφηση των συστατικών που παράγουν ελλειπτικά πολωμένο φως [36]. Ουσιαστικά αναφέρεται στην απορρόφηση του κυκλικά

πολωμένου φωτός από ασύμμετρα υπολείμματα άνθρακα στις πρωτεΐνες και στα νουκλεϊκά οξέα σε διαφορετικά μήκη κύματος [34]. Εξαιτίας λοιπόν της παρουσίας ασύμμετρων ανθράκων στα αμινοξέα και τα σάκχαρα, οι πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα απορροφούν το δεξιά και το αριστερά κυκλικά πολωμένο φως διαφορετικά, δηλαδή σε διαφορετικά μήκη κύματος [32,34]. Αυτή η διαφορά μπορεί να εκφραστεί ως διαφορά απορρόφησης ($\Delta\alpha$), ως διαφορικός συντελεστής μοριακής απόσβεσης ($\Delta\epsilon$) ή ως βαθμός ελλειπτικότητας (θ) [32]. Πρόκειται για μία μέθοδο συμπληρωματική της NMR και της X-ray κρυσταλλογραφίας [37].

Ως όργανο μέτρησης χρησιμοποιείται το Φασματόμετρο Κυκλικού Διχρωισμού, για την σωστή λειτουργία του οποίου απαιτείται καλή συντήρηση και συχνός έλεγχος βαθμονόμησης. Κατά την χρήση του πρέπει να ξεπλένεται διαρκώς με ξηρό άζωτο για την εκκένωση οξυγόνου και όζοντος από το σύστημα ώστε να μειωθεί η απορρόφηση του υποβάθρου και να επιτραπούν μετρήσεις σε περιοχές μικρότερες από 200nm [35].



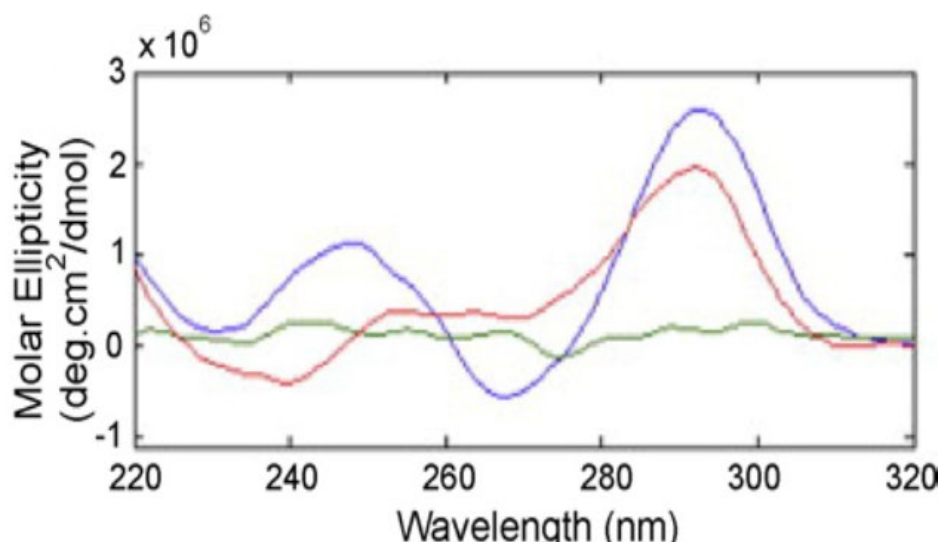
Σχήμα 7: Σχηματική παρουσίαση Φασματόμετρου Κυκλικού Διχρωισμού [36]

Η Φασματοσκοπία Κυκλικού Διχρωισμού αποτελεί ένα ισχυρό εργαλείο για την μελέτη δευτεροταγών δομών και διαμορφώσεων των πρωτεϊνών και των νουκλεϊκών οξέων [35]. Επιπλέον, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση της επίδρασης του περιβάλλοντος στην διαμόρφωση του DNA, για την μελέτη της αρχικής δομής του, για την χαρτογράφηση και ανάλυση ανωμαλιών σε επιλεγμένες περιοχές του γονιδιωματικού DNA (γεγονός σημαντικό από βιολογική και ιατρική άποψη), ενώ αποτελεί και την καταλληλότερη μέθοδο μελέτης των δομών “quadruplex” του DNA που

επηρεάζουν πολλές κυτταρικές διαδικασίες [37]. Σημαντική προϋπόθεση για την σωστή διεξαγωγή συμπερασμάτων αποτελεί η ακριβής ερμηνεία των αλλαγών στα φάσματα σε ολόκληρη την φασματική περιοχή και όχι μόνο σε ένα μέρος αυτής. Επίσης πρέπει να λαμβάνονται υπόψη μεταβολές που είναι πιθανό να προκύπτουν από αλλαγές στις συνθήκες του διαλύματος όπως θερμοκρασία, pH, άλατα [37].

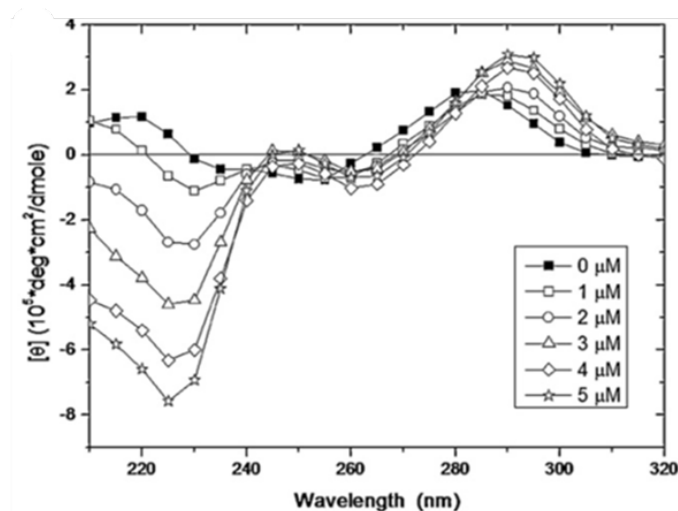
Γενικά, οι δομές DNA παρουσιάζουν μοναδικά προφίλ απορρόφησης σε μήκη κύματος μεγαλύτερα από 250nm, ενώ πρωτεΐνες με α - και β - έλικα δίνουν χαρακτηριστικό φάσμα σε μήκη κύματος μικρότερα από 250nm [32,34]. Κατά αυτό τον τρόπο είναι δυνατός ο υπολογισμός της δομής πρόσδεσης πάνω από τα 250nm τιτλοδοτώντας DNA με αυξανόμενες συγκεντρώσεις πρωτεΐνης, ενώ ταυτόχρονα παρατηρούνται δομικές αλλαγές στην πρωτεΐνη κάτω από τα 250nm [32].

Όσον αφορά τα απταμερή θα μπορούσε κανείς να προσδιορίσει με ακρίβεια την δομική τοπογραφία αυτών, παρακολουθώντας τα μοτίβα του CD. Για παράδειγμα η απουσία είτε θετικής είτε αρνητικής κορυφής από το φάσμα CD σε συγκεκριμένο μήκος κύματος είναι ενδεικτική της ύπαρξης ατελών τρισδιάστατων δομών και προέρχεται από την παρεμβολή κάποιου στόχου στη δομή του απταμερούς. Επιπλέον ο CD δίνει έμφαση στην επαλήθευση της πρόσδεσης απταμερούς-στόχου και προσφέρεται ως μία βοηθητική τεχνική που υποστηρίζει και κατ' επέκταση επικυρώνει ευρήματα που έχουν προκύψει από άλλες πιο συνήθεις τεχνικές για την μέτρηση του συντελεστή συγγένειας [34]. Για παράδειγμα, οι Gargallo et al. χρησιμοποίησαν την φασματοσκοπία Κυκλικού Διχρωισμού ως συμπληρωματική μέθοδο για τα ευρήματα που είχαν προκύψει από μετρήσεις UV-vis απορρόφησης. Έτσι, εφόσον η πορφυρίνη TmPyP4 δεν δίνει φάσμα CD στην περιοχή 200-500nm, οποιαδήποτε δομή προκύψει στην περιοχή αυτή οφείλεται στην δημιουργία συμπλόκου μεταξύ απταμερούς και στόχου [34].



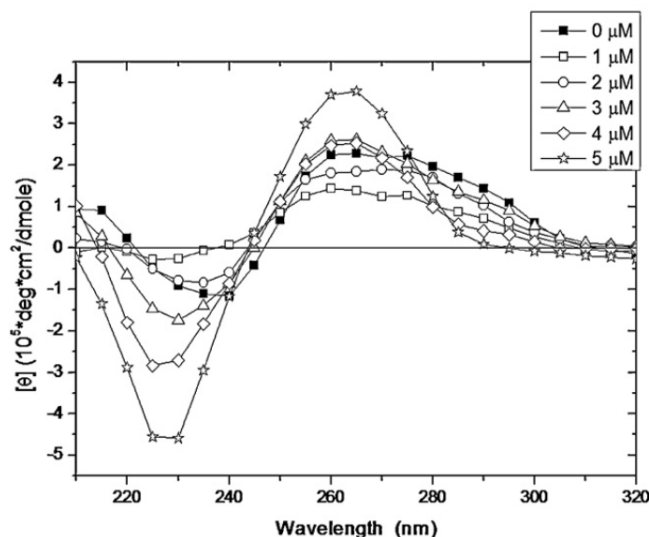
Σχήμα 8: Σχηματική απεικόνιση φάσματος απταμερούς (μπλε), στόχου (πράσινο), συμπλόκου (κόκκινο) [32]

Σε άλλη μελέτη οι Po-Hsun Lin et al. χρησιμοποίησαν, μεταξύ άλλων τεχνικών, τον κυκλικό διχρωισμό για να μελετήσουν τον μηχανισμό πρόσδεσης της θρομβίνης με δύο απταμερή (15-mer, 29-mer). Όπως φαίνεται και στα παρακάτω διαγράμματα το φάσμα του απταμερούς 15-mer χωρίς θρομβίνη παρουσιάζει αρνητική κορυφή στα 245nm και θετική κορυφή στα 280nm γεγονός που υποδηλώνει την ύπαρξη δίκλωνης B-μορφής DNA. Με την προσθήκη αυξανόμενης συγκέντρωσης θρομβίνης οι κορυφές αυτές μετατοπίζονται στα 260 και 295nm αντίστοιχα, ενώ εμφανίζεται άλλη μία θετική κορυφή στα 254nm γεγονός που υποδεικνύει την δημιουργία G-quadruplex δομής [38].



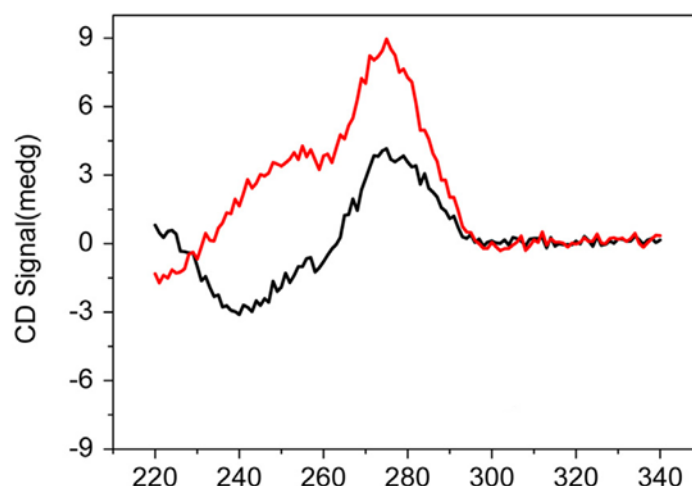
Σχήμα 9: Φάσμα κυκλικού διχρωισμού απταμερούς 15-mer με διαφορετικές συγκεντρώσεις θρομβίνης [38]

Στην περίπτωση του απταμερούς 29-mer παρατηρείται αρνητική κορυφή στα 240nm και μία επίπεδη θετική περιοχή από τα 260-285nm όπου με την προσθήκη θρομβίνης θα δημιουργηθεί θετική κορυφή στα 265nm. Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι από B-μορφή DNA δημιουργήθηκε σύμπλοκο με A-μορφή [38].



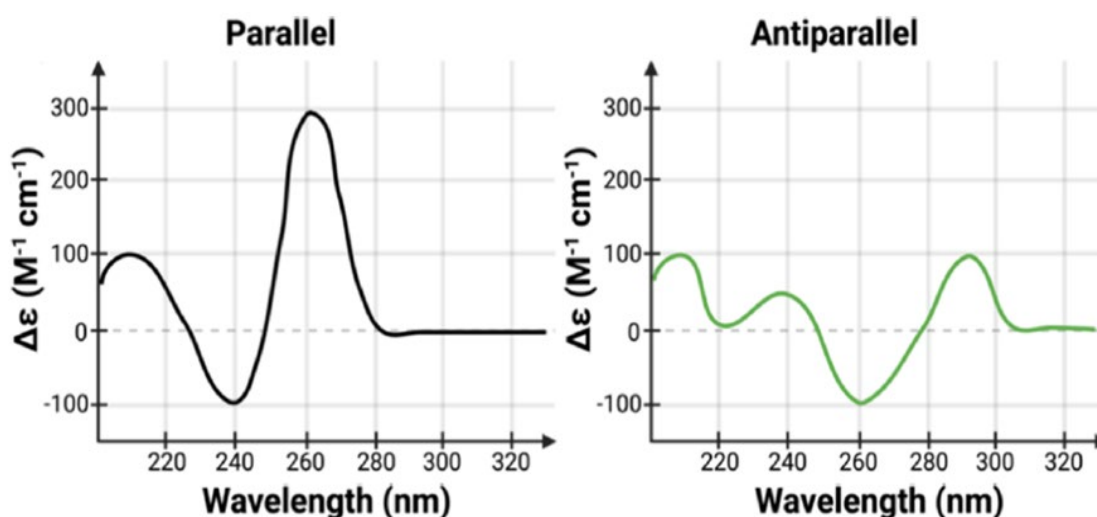
Σχήμα 10: Φάσμα κυκλικού διχρωισμού απταμερούς 29-mer με διαφορετικές συγκεντρώσεις θρομβίνης [38]

Τέλος σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τους Hongyan Wang et al. με στόχο την κατασκευή βιοαισθητήρα που θα ανιχνεύει κάδμιο (Cd), απομονώθηκε απταμερές με υψηλή εκλεκτικότητα για αυτό. Η επιλογή απταμερούς έγινε με χρήση φασματοσκοπίας κυκλικού διχρωισμού, κατά την οποία η προσθήκη του μετάλλου προκαλούσε αλλαγές στη διαμόρφωση του απταμερούς, όπως φαίνεται και παρακάτω. Αρχικά το φάσμα του απταμερούς παρουσιάζει μια αρνητική κορυφή στα 240nm και μία θετική στα 280nm. Με την προσθήκη Cd, η θετική κορυφή στα 280nm αυξάνεται ενώ δημιουργείται επιπλέον μια στα 250nm [39].



Σχήμα 11: Φάσμα κυκλικού διχρωισμού απταμερούς, απουσία (μαύρο) και παρουσία καδμίου (κόκκινο) [39]

Σύμφωνα με τα παραπάνω τα κυριότερα φάσματα κυκλικού διχρωισμού υποδηλώνουν δομές όπως α-δομή DNA, β-δομή DNA με θετική κορυφή ~280nm και αρνητική κορυφή ~250nm, antiparallel G-quadruplex με δύο θετικές κορυφές στα ~290 και ~240nm και μία αρνητική κορυφή στα 260nm και parallel G-quadruplex δομή με θετική κορυφή στα ~260nm και αρνητική κορυφή στα ~240nm [38, 40-42]



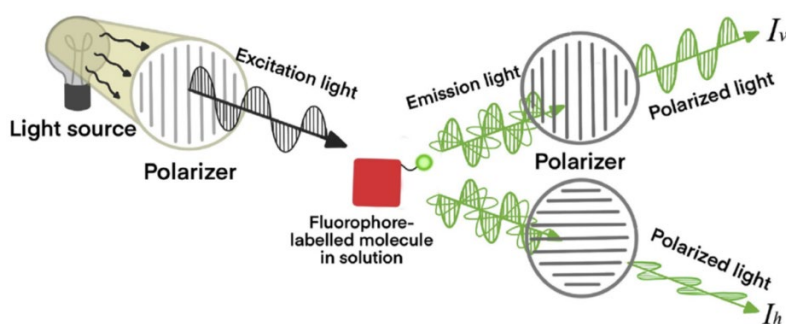
Σχήμα 12: Φάσμα κυκλικού διχρωισμού για parallel, antiparallel G-quadruplex δομή [40]

Καταλήγοντας, αξίζει να σημειωθεί πως η φασματοσκοπία CD αποτελεί πολύτιμο εργαλείο για την έρευνα και λόγω των πολλών πλεονεκτημάτων της συμμετέχει σε όλα τα σημαντικά ευρήματα για την διαμόρφωση του DNA [37]. Επιπλέον για την σωστή διεξαγωγή αποτελεσμάτων κρίνεται απαραίτητη η

καλή προετοιμασία των δειγμάτων, συμπεριλαμβανομένης της εξάλειψης μολυσματικών ουσιών σε αυτά με τον κατάλληλο καθαρισμό αλλά και η βαθμονόμηση του οργάνου [35]. Τέλος θεωρείται μια εξαιρετικά ευαίσθητη αλλά και σχετικά φθηνή μέθοδος [37]. Ωστόσο με την τακτική συντήρηση των φασμάτων ενώσεων αναφοράς, των μεγάλων ποσοτήτων αντιδρώντων για την αξιολόγηση πρόσδεσης και των συνεχών ελέγχων για την διατήρηση της καθαρότητας και της σταθερότητας των αναλυτών, το κόστος χρήσης της μπορεί να αυξηθεί [34].

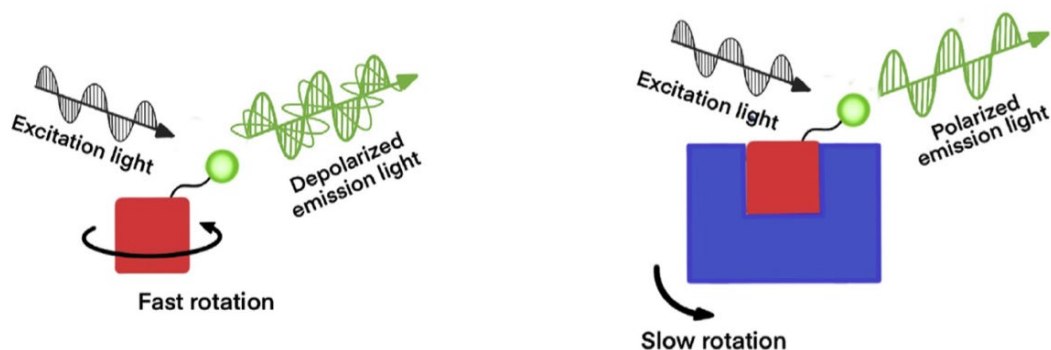
4.4 Φθορισμομετρία Πολωμένου Φωτός (Fluorescence Polarization)

Η φθορισμομετρία πολωμένου φωτός (FP) και η ανισοτροπία φθορισμού (FA) είναι ισχυρές τεχνικές βασισμένες στον φθορισμό, που χρησιμοποιήθηκαν αρχικά ως εργαλεία διαλογής στον τομέα ανακάλυψης φαρμάκων και στη βιοιατρική για την μελέτη πρόσδεσης, μοριακών αλληλεπιδράσεων και ενζυμικής δραστηριότητας. Πρόκειται για αλληλένδετες και σχεδόν ισοδύναμες μεθόδους [43]. Η αρχή των FP/ FA πηγάζει από το γεγονός ότι ο βαθμός πόλωσης ενός φθοροφόρου, υπό σταθερές συνθήκες διαλύματος (π.χ. θερμοκρασία, ιξώδες), σχετίζεται αντίστροφα με την μοριακή περιστροφή [43-45]. Τα φαινόμενα αυτά παρατηρούνται όταν το φθοροφόρο διεγείρεται από πολωμένο φως. Συνεπώς αποτελεί μία μετρήσιμη ιδιότητα των φθορίζοντων μορίων [46]. Οι τιμές ανισοτροπίας και πόλωσης προσδιορίζονται με βάση την ένταση φθορισμού σε δύο επίπεδα πόλωσης [46,47]. Πιο αναλυτικά, λαμβάνονται διεγείροντας φθορίζοντα μόρια με πολωμένο φως και υπολογίζοντας τον φθορισμό που εκπέμπεται σε κάθετο και οριζόντιο επίπεδο πόλωσης [44,47-48].



Σχήμα 13: Σχηματική απεικόνιση του φαινομένου του φθορισμού πόλωσης [47]

Είναι μεγέθη ανεξάρτητα της συγκέντρωσης του φθοροφόρου και της συνολικής έντασης του δείγματος [46]. Η πόλωση και η ανισοτροπία φθορισμού αντανακλούν την ταχύτητα περιστροφής των φθοροφόρων ή των επισημασμένων μορίων στο διάλυμα σε σχέση με την διάρκεια ζωής του φθορισμού. Όταν η περιστροφή πραγματοποιείται γρήγορα, το επίπεδο στο οποίο εκπέμπεται φθορισμός αποκλίνει από το επίπεδο διέγερσης προκαλώντας εκπόλωση φθορισμού. Αντίθετα, στην περίπτωση που περιστρέφονται αργά, το επίπεδο στο οποίο εκπέμπεται φθορισμός αποκλίνει λιγότερο από το επίπεδο διέγερσης με αποτέλεσμα την ενίσχυση του φαινομένου [47]. Ο ρυθμός περιστροφής των φθοριζόντων μορίων στο διάλυμα εξαρτάται από δύο εγγενείς ιδιότητες τους, τον όγκο και το σχήμα τους, και από περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως η θερμοκρασία και το ιξώδες του διαλύματος. Επίσης, η σύνδεση, η απόσπαση, ο σχισμός και η αλλαγή στο σχήμα των φθοριζόντων μορίων είναι δυνατόν να συμβάλουν σε αλλαγή του ρυθμού περιστροφής και της διάρκειας ζωής φθορισμού οδηγώντας τελικά σε αλλαγή της ανισοτροπίας. Πιο συγκεκριμένα, η σύνδεση ενός μικρού μορίου με ένα μεγαλύτερο, αυξάνει τον μοριακό όγκο, επιβραδύνοντας την περιστροφή, περιορίζοντας την κίνηση του φθοροφόρου και τελικά αυξάνει τον φθορισμό [46].



Σχήμα 14: Σχηματική απεικόνιση φαινομένων εκπόλωσης και πόλωσης [46]

Γενικά, η χρήση των απταμερών στην ανάπτυξη βιοαισθητήρων, σε μεθόδους μελέτης συγγένειας, σε διαγνωστικούς ελέγχους και σε θεραπείες έχει μελετηθεί εκτενώς. Σε κάθε περίπτωση η επιλογή και εφαρμογή τους απαιτεί χαρακτηρισμό της πρόσδεσης με τον στόχο, γεγονός που επιτυγχάνεται με ποικιλία μεθόδων που αφορά μελέτη μεταξύ των μοριακών αλληλεπιδράσεων [47]. Η σύνδεση των απταμερών με τους στόχους και η ανίχνευσή της με FP/FA

εκμεταλλεύονται συμπληρωματικά τα χαρακτηριστικά των απταμερών και των τεχνικών φθορισμού [47]. Τα απταμερή παρουσιάζουν πολλά πλεονεκτήματα όπως η ευκολία σήμανσης με φθοροφόρο σε συγκεκριμένη θέση, που διευκολύνει την παραγωγή σημάτων ανισοτροπίας φθορισμού. Επιπρόσθετα οι αλλαγές στη δομή τους και στο μέγεθός τους λόγω πρόσδεσης με κάποιο στόχο, η δυνατότητα υβριδισμού τους ως νουκλεϊκά οξέα με συμπληρωματικές αλληλουχίες και η εκλεκτική απορρόφηση τους από κάποια νανοϋλικά συμβάλουν στην αλλαγή των τιμών των FA και FP [46-47]. Με τον τρόπο αυτό δίνονται πληροφορίες που αφορούν μοριακές αλληλεπιδράσεις όπως η συγγένεια πρόσδεσης και η θέση δέσμευσης [47].

Οι Qiang Zhao et al. μελέτησαν την επίδραση της συγγένειας μεταξύ απταμερούς και ανοσοσφαιρίνης E (IgE). Οι ερευνητές χρησιμοποίησαν την φθοροφόρο ουσία FAM για την επισήμανση του απταμερούς σε διαφορετικές θέσεις, στενής και απομακρυσμένης επαφής. Κατέληξαν έτσι στο συμπέρασμα ότι στην περίπτωση των θέσεων στενής επαφής η ανισοτροπία του συμπλόκου αυξήθηκε [48].

Ένα άλλο παράδειγμα χρήσης της FA αφορά την διερεύνηση της αλληλεπίδρασης της ωχρατοξίνης A (OTA) με απταμερή. Το σύμπλοκο με απταμερές 36-mer προκάλεσε αύξηση της FA, με τον περιορισμό της OTA και την αύξηση του μοριακού όγκου. Μελετήθηκε επίσης η επιρροή της σύστασης του ρυθμιστικού διαλύματος στη συγγένεια πρόσδεσης. Παρατηρήθηκε έτσι πως αυτή βελτιώνεται με την παρουσία ιόντων ασβεστίου και νατρίου, μειώνεται με την παρουσία μόνο ασβεστίου, ενώ χάνεται στην περίπτωση που το τελευταίο βρίσκεται σε αφθονία [50].

Καταλήγοντας, αξίζει να τονιστεί πως οι παραπάνω τεχνικές είναι δυνατό να εφαρμοστούν σε βιοχημικές, κλινικές, περιβαλλοντικές και φαρμακολογικές αναλύσεις καθώς είναι ανεκτικές σε διακυμάνσεις που αφορούν σε αποκλίσεις του οργάνου και στην ένταση του φθορισμού, δεν απαιτούν διαχωρισμό των συστατικών του δείγματος και καταναλώνουν μικρό όγκο δειγμάτων [43,46-47]. Διακρίνονται επίσης για την εύκολη λειτουργία τους, την υψηλή απόδοση και ευαισθησία, την ταχεία μέτρηση, την αναπαραγωγικότητα των αποτελεσμάτων και το χαμηλό κόστος [47-49].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 – ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ

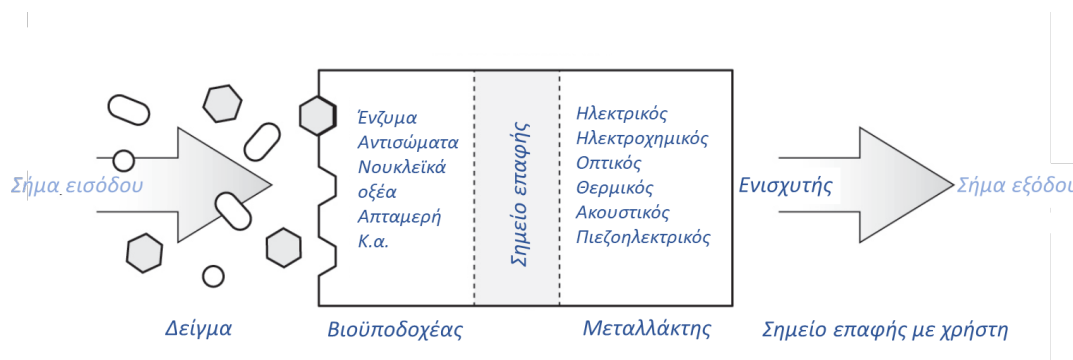
5.1 Γενικά για τους βιοαισθητήρες

Η ιστορία των βιοαισθητήρων χρονολογείται από το 1906 όταν ο ερευνητής M. Cremer απέδειξε πως η συγκέντρωση ενός οξέος σε ένα υγρό είναι ανάλογη του ηλεκτρικού δυναμικού που προκύπτει μεταξύ τμημάτων του ρευστού που βρίσκονται σε απέναντι πλευρές μιας γυάλινης μεμβράνης [51-52]. Ο πρώτος βιοαισθητήρας εφευρέθηκε το 1962 από τους Clark και Lyons με στόχο την μέτρηση γλυκόζης σε βιολογικά δείγματα ύστερα από ηλεκτροχημική ανίχνευση οξυγόνου ή υπεροξειδίου του υδρογόνου χρησιμοποιώντας ακινητοποιημένο ηλεκτρόδιο οξειδάσης της γλυκόζης [51,53-54]. Από τότε έχει πραγματοποιηθεί μεγάλη πρόοδος σε αυτό το πεδίο έρευνας [52]. Πρόκειται για έναν πολυεπιστημονικό τομέα που γεφυρώνει τις αρχές επιστημών όπως φυσική, χημεία και βιολογία με θεμελιώδεις αρχές της μικρο/νάνο τεχνολογίας, της ηλεκτρονικής και της εφαρμοσμένης ιατρικής [51].

Με την έννοια βιοαισθητήρας αναφερόμαστε σε μία συσκευή που μετρά βιολογικές ή χημικές αντιδράσεις δημιουργώντας σήματα ανάλογα με την συγκέντρωση του αναλύτη της αντίδρασης [51]. Πιο συγκεκριμένα, η αναλυτική αυτή συσκευή περιλαμβάνει ένα βιολογικό ή βιολογικά προερχόμενο στοιχείο αναγνώρισης το οποίο είναι ενσωματωμένο ή συνδεδεμένο σε έναν φυσικοχημικό υποδοχέα [55].

Κάθε βιοαισθητήρας αποτελείται από τρία βασικά μέρη: έναν βιοϋποδοχέα-στοιχείο αναγνώρισης, έναν μεταλλάκτη και έναν ενισχυτή σήματος [51,55-56]. Αναλυτικότερα, ως βιοϋποδοχέας καλείται το μόριο που θα αναγνωρίσει την προς ανάλυση ουσία. Τέτοια μόρια μπορεί να είναι ένζυμα, κύτταρα, αντισώματα, απταμερή, DNA. Η διαδικασία παραγωγής σήματος με τη μορφή φωτός, θερμότητας, pH, φορτίου, αλλαγής μάζας, κ.α. κατά την αλληλεπίδραση του υποδοχέα με την αναλυόμενη ουσία ονομάζεται βιοαναγνώριση [51]. Το στοιχείο αναγνώρισης είναι το βασικότερο συστατικό ενός αισθητήρα, καθώς είναι αυτό που ανταποκρίνεται επιλεκτικά σε έναν ή περισσότερους αναλύτες ανάμεσα σε έναν μεγάλο αριθμό άλλων ουσιών [56]. Στη συνέχεια ο μεταλλάκτης καλείται να μετατρέψει το σήμα της βιοαναγνώρισης σε μετρήσιμο σήμα [51]. Συνήθως παράγεται οπτικό ή ηλεκτρικό σήμα, ανάλογο της

αλληλεπίδρασης του υποδοχέα με την προς ανάλυση ουσία [51,56]. Τέλος, σημαντική είναι η συνεισφορά του φωτοευαίσθητου ή ηλεκτρονικού συστήματος που ενισχύει και μετράει το σήμα [51,56]. Το αποτελέσματα της ανίχνευσης πρέπει να παρουσιάζονται με κατανοητό προς τον χρήστη τρόπο. Συνήθως το σήμα εξόδου μπορεί να είναι αριθμητικό, γραφικό, πίνακας ή εικόνα [51].



Σχήμα 15: Τυπική διάταξη ενός βιοαισθητήρα [55]

Τα βασικά χαρακτηριστικά που χρειάζεται να έχει ένας βιοαισθητήρας και η βελτιστοποίηση των οποίων αντανακλά στην απόδοση του είναι τα εξής:

- **Εκλεκτικότητα**, το πιο σημαντικό χαρακτηριστικό του αισθητήρα. Υποδηλώνει την ικανότητα του να αναγνωρίζει έναν αναλύτη σε ένα δείγμα με διαφορετικά συστατικά.
- **Αναπαραγωγιμότητα**, που είναι η ικανότητα του αισθητήρα να παράγει παρόμοιες αποκρίσεις σε ίδιο πείραμα που εξάγεται δύο φορές. Χαρακτηρίζεται από την πιστότητα και την ακρίβεια του μεταλλάκτη και του ενισχυτή.
- **Σταθερότητα**, αφορά τον βαθμό ευαισθησίας σε διαταραχές στο περιβάλλον του αισθητήρα. Είναι το πιο κρίσιμο χαρακτηριστικό σε εφαρμογές που απαιτούνται μεγάλα βήματα επώασης ή συνεχής παρακολούθηση.
- **Ευαισθησία**, η ελάχιστη ποσότητα του αναλύτη που μπορεί να ανιχνευθεί από τον βιοαισθητήρα. Σε πολλές ιατρικές και περιβαλλοντικές εφαρμογές απαιτείται ευαισθησία σε συγκεντρώσεις ng/ml ή fg/ml ώστε να επιβεβαιωθεί η παρουσία ίχνους ενός αναλύτη.

- Γραμμικότητα, η οποία δείχνει την ακρίβεια της μετρούμενης απόκρισης, για ένα σύνολο μετρήσεων με διαφορετικές συγκεντρώσεις της αναλυόμενης ουσίας, σε ευθεία γραμμή [51]

5.2 Κατηγορίες Βιοαισθητήρων

Οι βιοαισθητήρες μπορούν να χωριστούν σε δύο βασικές κατηγορίες. Η διαφοροποίηση αυτή αφορά πρώτον το είδος του στοιχείου βιοαναγνώρισης και δεύτερον το είδος του μεταλλάκτη [54,56,58]. Στη βιβλιογραφία αναφέρονται και επιπλέον διακρίσεις που γίνονται μεταξύ των βιοαισθητήρων. Για παράδειγμα, μπορούν να διαχωριστούν με βάση το αν μετρούν απευθείας την αναλυόμενη ουσία ή αν συμμετέχουν σε κάποια ανταγωνιστική δοκιμασία. Στην δεύτερη περίπτωση ο βιοαισθητήρας δεν παράγει απευθείας δεδομένα από τον ίδιο τον αναλύτη, αλλά αυτά βασίζονται σε ανταγωνιστική δέσμευση ή αναστολή μιας δευτερεύουσας διαδικασίας [58]. Τέλος, ένα άλλο παράδειγμα απευθύνεται σε κατηγοριοποίηση με βάση την χρήση ή όχι ιχνηθετών/δεικτών σε έναν βιοαισθητήρα. Με την χρήση ιχνηθέτη (label-based), η ανίχνευση του στόχου βασίζεται στις ειδικές ιδιότητες του πρώτου. Πρόκειται για αξιόπιστους αισθητήρες, οι οποίοι όμως απαιτούν συνδυασμό ειδικού παράγοντα βιοαναγνώρισης κατασκευασμένο με ακινητοποιημένη πρωτεΐνη-στόχο. Από την άλλη μεριά, οι βιοαισθητήρες χωρίς δείκτη (label-free) επιτρέπουν την ανίχνευση μορίων-στόχων που δεν είναι επισημασμένα ή είναι δύσκολα να επισημανθούν. Η επιστημονική κοινότητα στοχεύει στην ανάπτυξη τέτοιων βιοαισθητήρων που θα βρίσκουν εφαρμογή σε τομείς όπως οι περιβαλλοντικές επιστήμες και η ιατρική [53].

5.2.1. Ταξινόμηση με βάση το είδος του στοιχείου βιοαναγνώρισης

Όπως έχει ήδη αναφερθεί μία από τις δύο βασικές κατηγορίες βιοαισθητήρων σχετίζεται με τη φύση του στοιχείου βιοαναγνώρισης [56], δηλαδή του μορίου που αναγνωρίζει ειδικά τον αναλύτη [51]. Στην κατηγορία αυτή γίνεται μία επί μέρους διαφοροποίηση μεταξύ καταλυτικών αισθητήρων και αισθητήρων συγγένειας [58]. Στους καταλυτικούς αισθητήρες ανήκουν οι ενζυμικοί, ενώ στους αισθητήρες συγγένειας υπάγονται όσοι χρησιμοποιούν για δέσμευση πρωτεΐνες και νουκλεοτίδια [58]. Έτσι τελικά προκύπτουν οι τρεις πιο συχνές κατηγορίες: οι ενζυμικοί, οι ανοσοαισθητήρες και οι βιοαισθητήρες DNA [54].

5.2.1.1 Ενζυμικοί Βιοαισθητήρες

Μεταξύ των διαφορετικών τύπων βιοαισθητήρων, οι ενζυμικοί φαίνεται να έχουν βελτιωμένη «αισθητικότητα» (sensing), εξαιτίας των πολύ ειδικών ενζυμικών αντιδράσεων με μικρά χημικά μόρια. Τυπικά αποτελούνται από ένα ένζυμο που καταλύει την αντίδραση με το μόριο-στόχο και έναν μεταλλάκτη που μετατρέπει την αντίδραση σε μετρήσιμο σήμα [59].

Ο απλούστερος ενζυμικός βιοαισθητήρας χρησιμοποιείται όταν το υπόστρωμα ή το προϊόν της ενζυμικής αντίδρασης είναι ηλεκτροχημικά ενεργό, ικανό να οξειδώνεται και να ανάγεται γρήγορα και αναστρέψιμα σε ένα ηλεκτρόδιο με εφαρμογή κατάλληλου δυναμικού. Ανάλογα με την λειτουργία τους μπορούν να χωριστούν σε ενζυμικούς βιοαισθητήρες υποστρώματος που προορίζονται για τον προσδιορισμό συγκεκριμένου υποστρώματος μιας ενζυμικής αντίδρασης και σε ενζυμικούς βιοαισθητήρες αναστολείς που προσδιορίζουν ουσίες που μειώνουν την δραστηριότητα ενός ενζύμου [56].

Οι ενζυμικοί βιοαισθητήρες παρέχουν αξιόπιστα και ακριβή αποτελέσματα για πολλούς αναλύτες υπό διαφορετικές συνθήκες. Ένα από τα πλεονεκτήματα τους είναι η σταθερότητα τους σε διακυμάνσεις της θερμοκρασίας και του pH, γεγονός που τους καθιστά κατάλληλους για χρήση σε διαφορετικά περιβάλλοντα, εντός και εκτός του εργαστηρίου. Επίσης χαρακτηρίζονται από υψηλή ειδικότητα και ευαισθησία, παρουσιάζουν χαμηλό όριο και ευρύ φάσμα ανίχνευσης και έχουν χαμηλό κόστος [59].

Από όλους τους βιοαισθητήρες που διαθέτουν ως παράγοντα βιοαναγνώρισης ένα ένζυμο, ο βιοαισθητήρας γλυκόζης είναι ο περισσότερο μελετημένος και αναγνωρισμένος. Η σημασία και η επιτυχία του έγκειται στην κλινική του συσχέτιση με τον διαβήτη [55]. Τέλος, ένας ακόμα κοινός αισθητήρας τέτοιου είδους είναι ο βιοαισθητήρας ουρίας [56].

5.2.1.2 Ανοσοαισθητήρες

Οι ανοσοσφαιρίνες γνωστές και ως αντισώματα, είναι προστατευτικές πρωτεΐνες που εκκρίνονται από το ανοσοποιητικό σύστημα ως απάντηση στην είσοδο ξένων βιολογικών ενώσεων (αντιγόνα) στον οργανισμό [56]. In vivo λοιπόν, αυτές οι πρωτεΐνες παίζουν κρίσιμο ρόλο δεσμεύοντας αντιγόνα, όπως οι παθογόνοι μικροοργανισμοί [60]. Έτσι, χάρη στην ικανότητα τους να

δημιουργούν με τα αντιγόνα ισχυρά σύμπλοκα, τα αντισώματα χρησιμοποιούνται ως στοιχείο βιοαναγνώρισης στους ανοσοαισθητήρες. Πιθανολογείται πως είναι η πιο σημαντική και γνωστή κατηγορία των στοιχείων βιοαναγνώρισης, εξαιτίας της φυσικής τους ιδιότητας να δεσμεύουν τον αναλύτη με υψηλή συγγένεια και ειδικότητα [60].

Συνεπώς, ο όρος ανοσοαισθητήρας αναφέρεται σε μια ειδική κατηγορία βιοαισθητήρων που χρησιμοποιούν ειδικά αντισώματα ως στοιχείο βιοαναγνώρισης, τα οποία ύστερα από ειδική αναγνώριση και δέσμευση του αναλύτη-στόχου, προκαλούν μία σειρά φυσικών ή/και χημικών αλλαγών, οι οποίες μετατρέπονται σε ανιχνεύσιμα σήματα από κατάλληλο μεταλλάκτη [61].

Αυτή η τεχνολογία πλεονεκτεί λόγω της υψηλής ειδικότητας κατά την δέσμευση του αντισώματος με το αντιγόνο, παρέχοντας ευαισθησία κατά την ανίχνευση μιας σειράς βιομορίων, όπως βακτήρια, ιοί, πρωτεΐνες, βιοδείκτες, νουκλεϊκά οξέα και άλλα μικρά μόρια, ενώ αποτελεί σημαντικό κλινικό εργαλείο για την ανίχνευση αναλυτών σε χαμηλές συγκεντρώσεις [62]. Ένα επιπλέον πλεονέκτημα τους είναι ότι το αντιγόνο-στόχος, δεν χρειάζεται καθαρισμό πριν την ανίχνευση [55]. Τέλος, βασικός τους στόχος είναι η παροχή γρήγορων, αξιόπιστων και υψηλής ευαισθησίας αποτελεσμάτων με χαμηλό κόστος [62].

5.2.1.3 Βιοαισθητήρες DNA

Τα βιοχημικά στοιχεία των αισθητήρων DNA είναι τα νουκλεϊκά οξέα (DNA). Συνήθως, δεν αφορούν φυσικά συστατικά που απομονώνονται από ζωντανό οργανισμό, αλλά θραύσματα αυτών που καλούνται DNA ανιχνευτές (probes) ή DNA εκκινητές (primers). Η επιλογή τους αντικατοπτρίζει την ειδικότητα της δομής του DNA στο σύνολό της. Οι DNA ανιχνευτές συντίθενται ύστερα από ενίσχυση του DNA με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Επίσης με την τροποποίηση τους ενισχύεται η σταθερότητά τους και διευκολύνεται η χρήση τους σε έναν σε έναν βιοαισθητήρα [56].

Συγκριτικά με τις πρωτεΐνες, το DNA διακρίνεται για την πολύ υψηλότερη σταθερότητα και τις χαρακτηριστικές δομές του. Επιπλέον όπως ήδη αναφέρθηκε, είναι εφικτή η χημική σύνθεση και τροποποίηση του [63]. Λόγω της τεράστιας βιοσυμβατότητας, της θερμικής σταθερότητας και της λειτουργικότητας του, το δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ (DNA) αποτελεί ένα

εξαιρετικό βιολογικό υλικό για χρήση σε βιοαισθητήρα. Είναι ευρέως αποδεκτό ότι το DNA και ο τρόπος συναρμολόγησής του, το καθιστούν ικανό να ανιχνεύει συγκεκριμένους στόχους, όπως νουκλεϊκά οξέα, πρωτεΐνες, ιόντα μετάλλων και μικρά βιολογικά μόρια. Με την ανάπτυξη της νανοτεχνολογίας DNA, δυναμικά δίκτυα που βασίζονται στον υβριδισμό του μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ενίσχυση των σημάτων των βιοαισθητήρων [64].

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί πως αλληλουχίες ολιγονουκλεοτιδίων χωρίς φυσική αναλογία μπορούν να επιλεγθούν σύμφωνα με την ικανότητα τους να αλληλοεπιδρούν με συγκεκριμένα βιομόρια και να χρησιμοποιηθούν σε έναν βιοαισθητήρα. Τέτοιου είδους νουκλεϊκοί υποδοχείς βιοαισθητήρων είναι τα απταμερή και θα αναλυθούν περεταίρω σε επόμενη παράγραφο [56]

5.2.2 Ταξινόμηση με βάση το είδος του μεταλλάκτη

Ως δεύτερο κριτήριο για την κατηγοριοποίηση των βιοαισθητήρων είναι το είδος του μεταλλάκτη. Κατά αυτό τον τρόπο μπορούν να χωριστούν σε ηλεκτροχημικούς, οπτικούς, πιεζοηλεκτρικούς, θερμικούς, κ.α. [54,56,58,65].

5.2.2.1 Ηλεκτροχημικοί Βιοαισθητήρες

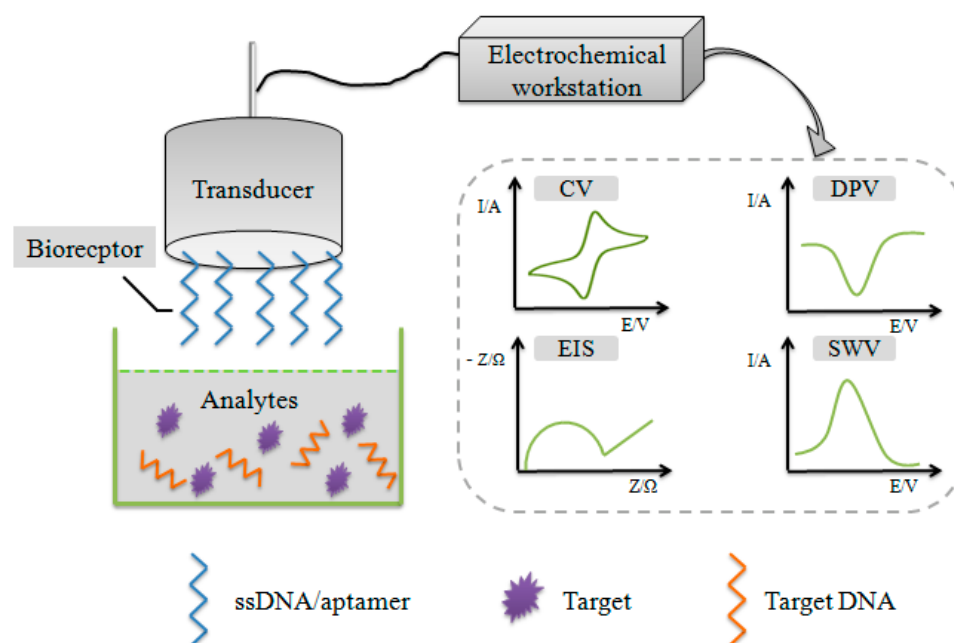
Τα τελευταία χρόνια, οι ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες παρασκευάζονται κυρίως, ύστερα από τροποποίηση της επιφάνειας ηλεκτροδίου μετάλλου ή άνθρακα χρησιμοποιώντας βιομόρια, όπως ένζυμα, αντισώματα ή DNA [53,66]. Τα μέταλλα που χρησιμοποιούνται περισσότερο στα ηλεκτρόδια και την ηλεκτροαναλυτική χημεία είναι ο χρυσός και ο λευκόχρυσος (πλατίνα) εξαιτίας της καθαρότητας, της εύκολης κατασκευής τους, αφού σχηματίζουν ομοιοπολικούς δεσμούς με ενώσεις θείου και της «αδράνειας» τους έναντι της παρουσίας άλλων αντιδραστηρίων [66].

Το σήμα εξόδου του βιοαισθητήρα έρχεται ως αποτέλεσμα ειδικής πρόσδεσης ή καταλυτικής αντίδρασης του βιομορίου στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου [53,66].

Ο ηλεκτροχημικός βιοαισθητήρας είναι από τους πιο συνηθισμένους, όχι μόνο εξαιτίας της υψηλής ευαισθησίας και ειδικότητας, της ακρίβειας, των χαμηλών ορίων ανίχνευσης και της δυνατότητας ανάλυσης πραγματικών δειγμάτων αλλά και λόγω της γρήγορης απόκρισής του ως αποτέλεσμα των μικρών

χρόνων ανίχνευσης, του χαμηλού κόστους, της δυνατότητας μεταφοράς του και της εύκολης λειτουργίας του [65-66].

Κατά την ηλεκτροχημική ανίχνευση, λαμβάνουν χώρα τεχνικές όπως αμπερομετρία, ποτενσιομετρία, βολταμετρία, φασματοσκοπία εμπέδησης, αγωγιμομετρία, φωτοηλεκτροχημεία, ηλεκτροχημιοφωταύγεια με στόχο την μετατροπή του σήματος σε μετρήσιμο [66]. Έτσι οι ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες χωρίζονται σε αμπερομετρικούς, ποτενσιομετρικούς, βολταμετρικούς κ.α. [56,54].



Σχήμα 16: Ηλεκτροχημικός Βιοαισθητήρας DNA [67]

5.2.2.2 Οπτικοί Βιοαισθητήρες

Ως οπτικός βιοαισθητήρας καλείται μία αναλυτική συσκευή που περιέχει ενσωματωμένο ένα στοιχείο βιοαναγνώρισης με σύστημα οπτικού μετατροπέα [68]. Επιπλέον, χρησιμοποιούν ως στοιχεία βιοαναγνώρισης μια πληθώρα βιοϋλικών όπως ένζυμα, αντισώματα, αντιγόνα, νουκλεϊκά οξέα, ολόκληρα κύτταρα και ιστούς [68].

Οι οπτικοί μεταλλάκτες μπορεί να βασίζονται σε τεχνικές όπως η απορρόφηση, ο φθορισμός, η φωταύγεια, η εσωτερική ανάκλαση, ο συντονισμός επιφανειακών πλάσμονίων και φασματοσκοπία σκέδασης φωτός [56].

Γενικά, χαρακτηρίζονται από υψηλή ταχύτητα ανίχνευσης, ευαισθησία, ανθεκτικότητα και ικανότητα ανίχνευσης πολλαπλών αναλυτών [65]. Επίσης, θεωρούνται αισθητήρες χαμηλού κόστους και μικρού μεγέθους [68].

Ένα παράδειγμα οπτικής τεχνικής που χρησιμοποιείται συνήθως στην κατασκευή βιοαισθητήρων είναι ο συντονισμός επιφανειακών πλάσμονίων (SPR), κατά την οποία προσδιορίζεται μια χημική ουσία χωρίς την χρήση επισημασμένων μορίων [65].

5.2.2.3 Πιεζοηλεκτρικοί και Θερμικοί Βιοαισθητήρες

Οι πιεζοηλεκτρικοί αισθητήρες χρησιμοποιούν κρυστάλλους που υφίστανται ελαστική παραμόρφωση υπό την επίδραση ηλεκτρικού δυναμικού. Εναλλασσόμενο δυναμικό σε συγκεκριμένη συχνότητα δημιουργεί ένα στάσιμο κύμα στον κρύσταλλο. Η απορρόφηση του αναλύτη από την επιφάνεια του κρυστάλλου, η οποία είναι επικαλυμμένη με ένα στοιχείο βιοαναγνώρισης, μεταβάλλει τη συχνότητα συντονισμού, και αυτό αποτελεί ένδειξη για τη δέσμευση [56]. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι ακουστικοί και οι βιοαισθητήρες υπερήχων [54].

Οι θερμικοί βιοαισθητήρες διαθέτουν ένα ευαίσθητο θερμίστορ για την μέτρηση θερμότητας και τελικά τον προσδιορισμό της αναλυόμενης συγκέντρωσης του αναλύτη. Η κατηγορία αυτή είναι αρκετά ασυνήθης [56].

5.3 Βιοαισθητήρες και Απταμερή

Τα τελευταία χρόνια, η τεχνολογία των βιοαισθητήρων έχει σημειώσει σπουδαία πρόοδο στην βελτίωση διαφόρων τομέων όπως η ασφάλεια, ο έλεγχος τροφίμων, η ιατρική, η βιοεπιστήμη και ο περιβαλλοντικός έλεγχος [66]. Στο πλαίσιο της παραπάνω εξέλιξης και λόγω της εύκολης προσαρμοστικότητας τους σε διαφορετικές πλατφόρμες, αναπτύχθηκαν βιοαισθητήρες που χρησιμοποιούν ως στοιχεία αναγνώρισης τα απταμερή. Σκοπός τους είναι είτε η ποσοτική είτε η ημι-ποσοτική ανάλυση βιολογικών στόχων [66,69]. Ο όρος “aptasensors” περιγράφει αυτού του είδους τους αισθητήρες [55-56,66,69].

Ο μηχανισμός λειτουργίας τους στηρίζεται στο γεγονός ότι κατά την παρουσία του αναλύτη στο διάλυμα, αυτός προσδένεται με το απταμερές προκαλώντας δομικές ανακατατάξεις και τροποποιήσεις στη διαμόρφωση με αποτέλεσμα να

αποτελεί φυσικό τμήμα του νουκλεοτιδίου [55,69]. Τελικά, παρατηρείται αλλαγή σήματος [69].

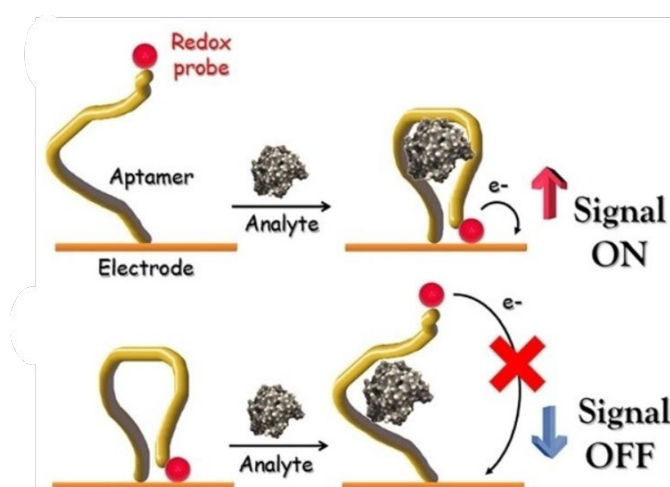
Ένα από τα πιο ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των απταμερών είναι η δυνατότητα τροποποίησής τους με χρήση επισημαντών φθορισμού, παραγόντων που προκαλούν μείωση στον φθορισμό (quencher), δεικτών, νανοϋλικών ή ενζύμων [69]. Για παράδειγμα, η ανίχνευση ενός βιομορίου από ένα απταμερές μπορεί να επιτευχθεί ύστερα από τροποποίηση του δεύτερου με ένα μόριο αναφοράς [πχ. σιδηροκένιο(ferrocene), μπλε του μεθυλενίου (methylene blue)] στο 5' άκρο και με ακινητοποίηση ενός μορίου (πχ. θειόλη, αλκυλαμίνες, στρεπταβιδίνη, υδραζωτικά) στο 3' άκρο. Η τροποποίηση αυτή προκαλεί ηλεκτροχημική αλλαγή στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Επιπλέον, τα πολυμερή χρησιμοποιούνται ευρέως ως στοιχεία αναφοράς σε φθορίζοντες και χρωματομετρικούς βιοαισθητήρες εξαιτίας των οπτοηλεκτρικών τους ιδιοτήτων. Με την δέσμευση του στόχου, η αλλαγή στη διαμόρφωση του απταμερούς, διαφοροποιεί την δομή του πολυμερούς, επηρεάζοντας τελικά την απορρόφηση και το μήκος κύματος εκπομπής του [64].

Οι αισθητήρες απταμερών ανταγωνίζονται τους ανοσοαισθητήρες [55,66]. Βασικά γνωρίσματα των πρώτων είναι η υψηλή δεσμευτική συγγένεια, η απλή σύνθεση, η εύκολη αποθήκευση και η ευρεία εφαρμογή [55]. Υπερέχουν επίσης σε χαρακτηριστικά όπως η εκλεκτικότητα, η επαναχρησιμοποίηση, η σταθερότητα, η επισημάνση χωρίς να επηρεάζεται η συγγένεια και το χαμηλό κόστος [64,66]. Επίσης τα απταμερή συγκριτικά με τα αντισώματα είναι πιο ανθεκτικά σε εξαιρετικά υψηλές τιμές θερμοκρασίας, pH και συγκέντρωσης ιόντων [64]. Με βάση όλα τα παραπάνω οι "aptasensors" παρέχουν την δυνατότητα προσδιορισμού μεγάλου αριθμού αναλυτών [66]. Κατ' επέκταση, στο συγκεκριμένο τομέα έχουν αναπτυχθεί διαφορετικές τεχνικές για τη δημιουργία ενός ανιχνεύσιμου σήματος όπως οπτικού, ηλεκτροχημικού, πιεζοηλεκτρικού κ.λπ..[18]. Με κριτήριο το είδος του μεταλλάκτη, οι βιοαισθητήρες απταμερών ταξινομούνται σε ηλεκτροχημικούς, οπτικούς, χρωματομετρικούς, ευαίσθητους σε αλλαγές μάζας ή θερμικούς [69].

Μεταξύ των διαφορετικών τύπων μεταλλάκτη που έχουν χρησιμοποιηθεί έως τώρα, οι επικρατέστεροι είναι οι ηλεκτροχημικοί και οι οπτικοί [66].

5.3.1 Ηλεκτροχημικοί Αισθητήρες Απταμερών

Οι ηλεκτροχημικοί αισθητήρες απταμερών παρουσιάστηκαν για πρώτη φορά το 2004. Η μοριακή αναγνώριση του στόχου από το συγγενές απταμερές προϋποθέτει ακινητοποίηση του δεύτερου στο ηλεκτρόδιο. Η διαδικασία αυτή επιτυγχάνεται χάρη στην δημιουργία ομοιοπολικού δεσμού μεταξύ του απταμερούς και της επιφάνειας του ηλεκτροδίου [70]. Τα ηλεκτρόδια χρυσού χρησιμοποιούνται ευρέως για την κατασκευή τέτοιων αισθητήρων, λόγω της εύκολης ακινητοποίησης απταμερών συνδεδεμένα με θειόλες (thiolated aptamers) [66].



Σχήμα 17: Παραδείγματα αναδιάταξης της δομής του απταμερούς σε ηλεκτροχημικό βιοαισθητήρα και τροποποίηση του ηλεκτρικού σήματος [69]

Μέχρι τώρα, τα απταμερή που έχουν μελετηθεί εκτενέστερα είναι αυτά που δεσμεύουν τη θρομβίνη [70].

Οι ηλεκτροχημικοί “aptasensors” επιτρέπουν την παρακολούθηση της αλληλεπίδρασης με τον αναλύτη σε πραγματικό χρόνο χρησιμοποιώντας μικρή ποσότητα δείγματος με ασήμαντη επίδραση στην ευαισθησία μέτρησης. Επιπλέον, ένα από τα μεγαλύτερα πλεονεκτήματα τους είναι η δυνατότητα σμίκρυνσης των μικροηλεκτρικών, μειώνοντας έτσι και το συνολικό μέγεθος συσκευής [66]. Σημαντικά στοιχεία τους είναι και η ικανότητα τους για ανίχνευση πολλαπλών στόχων και η ταχεία και χαμηλού κόστους ανάλυση [69]

Ως εκ τούτων, οι ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες απταμερών έχουν αποδειχθεί ως ένα ισχυρό αναλυτικό εργαλείο που χρησιμοποιείται τα τελευταία χρόνια σε

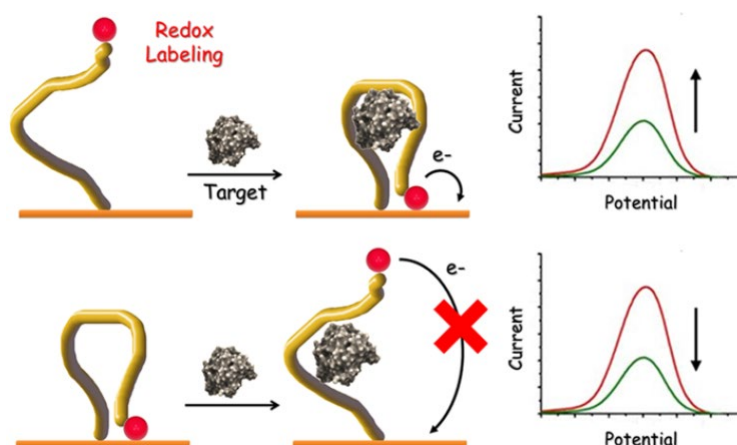
πληθώρα κλινικών αναλύσεων καθώς και σε συσκευές με στόχο την έγκαιρη διάγνωση ασθένειας [66,69]

Η συμβολή τους σε αυτό το πλαίσιο συνδέεται με την ανίχνευση ορμονών, ενζύμων, πρωτεϊνών, γονιδίων, βιοδεικτών, βιολογικών μορίων και ειδικών κυττάρων μέσω της πρόσδεσης τους σε αυτά [66,69]. Οι μεταβολές που προκαλούνται στη δομή τους κατά τη δέσμευση επηρεάζουν την ικανότητα μεταφοράς ηλεκτρονίων μεταξύ των οξειδοαναγωγικών μορίων καθώς και την επιφάνεια του ηλεκτροδίου με συνέπεια την πρόκληση αλλαγών στο δυναμικό, στο ρεύμα, στην αγωγιμότητα και στην αντίσταση.

Με τις ηλεκτροχημικές μεθόδους λοιπόν και την μελέτη των ηλεκτρικών σημάτων, μπορούν να δοθούν πληροφορίες για τη συγκέντρωση, τις κινητικές αντιδράσεις και τους μηχανισμούς, την χημική κατάσταση και την συμπεριφορά συστατικών ενός διαλύματος καθώς μετρούν ρεύμα, δυναμικό, αγωγιμότητα ή αντίσταση [66,69]. Οι τεχνικές που εφαρμόζονται είναι οι εξής: αμπερομετρία, ποτενσιομετρία, εμπέδηση και αγωγιμομετρία [69].

- Με την αμπερομετρία υπολογίζονται οι διαφορές δυναμικού μεταξύ ενός δείκτη και του ηλεκτροδίου αναφοράς υπό σταθερό δυναμικό. Τα χημικά μόρια είτε οξειδώνονται είτε ανάγονται σε αδρανή ηλεκτρόδια υπό σταθερό δυναμικό. Χρησιμοποιούνται γενικά σε ενζυμικούς αισθητήρες κατά τους οποίους το ένζυμο καταλύει μια αντίδραση οξειδοαναγωγής.
- Η βολταμετρία μετρά το προκύπτον ρεύμα ενός ηλεκτροχημικού στοιχείου ως συνάρτηση ενός χρονικά εξαρτώμενου δυναμικού. Το εφαρμοζόμενο δυναμικό μπορεί να αλλάξει και καταγράφεται το ρεύμα που λαμβάνεται σε μια χρονική περίοδο. Σε αυτή την περίπτωση, χρησιμοποιείται κυρίως ένα σύστημα τριών ηλεκτροδίων και δίνονται ποσοτικές και ποιοτικές πληροφορίες για οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις τόσο άμεσα όσο και έμμεσα. Στις βολταμετρικές μεθόδους υπάγονται οι εξής: Κυκλική Βολταμετρία (CV), Διαφορική Παλμική Βολταμετρία (DPV), Βολταμετρία Εναλλασσόμενου Ρεύματος (ACV), Βολταμετρία Γραμμικής Σάρωσης (LSV), Ανοδική και Καθοδική Αναδιαλυτική Βολταμετρία (ASW,CSW) και Βολταμετρία Τετραγωνικού Παλμού (SWV).

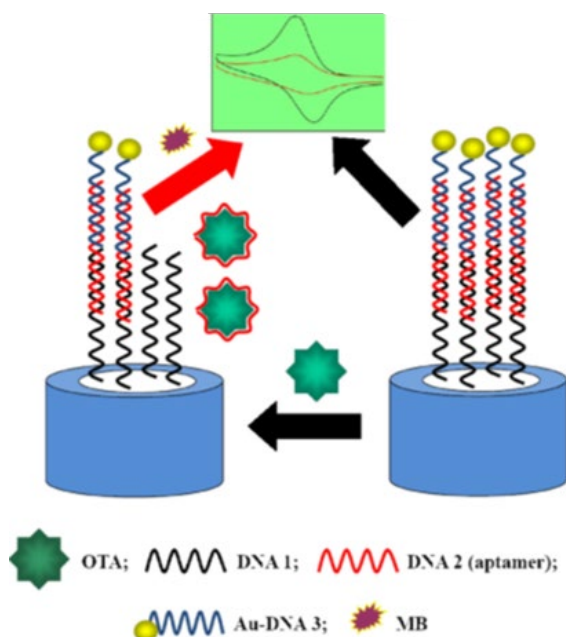
- Η ποτενσιομετρία μετρά δυναμικό σε ένα σύστημα δύο ηλεκτροδίων κατά την απουσία ροής ρεύματος. Ως αποτέλεσμα της απουσίας αυτής η σύνθεσή του παραμένει αμετάβλητη.
- Η Ηλεκτροχημική Φασματοσκοπία Εμπέδησης (EIS), υπολογίζει την απόκριση εναλλασσόμενου ρεύματος (AC) συναρτήσει της συχνότητας. Τα δεδομένα EIS αναλύονται παρατηρώντας τις αλλαγές στο ρεύμα/δυναμικό στις μετρούμενες συχνότητες, προσδιορίζοντας έτσι την ηλεκτροχημική συμπεριφορά των ηλεκτροδίων. Η EIS είναι μία μη καταστροφική τεχνική, που έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως σε διάφορες αντιδράσεις και επιφάνειες, καθώς ελαχιστοποιεί την ανάγκη για επισημασμένες ηλεκτρενεργές ομάδες ή δείκτες. Ωστόσο, πρόκειται για μια συμπληρωματική τεχνική και απαιτεί και άλλες μεθόδους για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.



Σχήμα 18 : Παράδειγμα πρόσδεσης απταμερούς και στόχου όπως αποτυπώνεται με διαφορική παλμική βολταμετρία (DPV) [66]

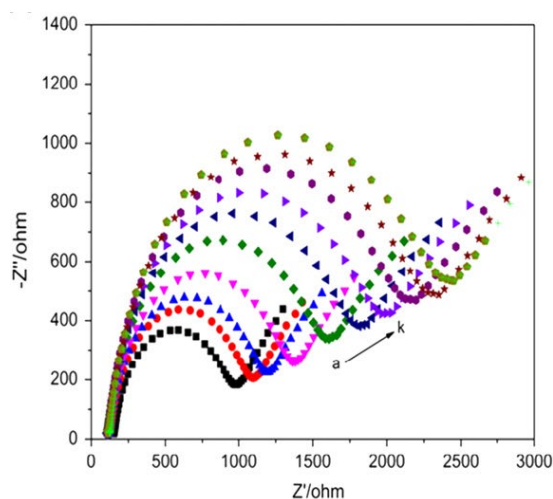
Στην βιβλιογραφία υπάρχουν αρκετά δεδομένα σχετικά με τη χρήση ηλεκτροχημικών αισθητήρων απταμερών. Αρχικά οι Hua Kuang et al., ανέπτυξαν έναν ηλεκτροχημικό αισθητήρα με στόχο την ανίχνευση ωχρατοξίνης Α (OTA). Για την ακινητοποίηση του απταμερούς (DNA2) στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου άνθρακα χρησιμοποιήθηκε ένα μονόκλωνο μόριο DNA συνδεδεμένο με αμινομάδα (DNA1), ενώ για την ενίσχυση του σήματος ένα μονόκλωνο μόριο DNA με νανοσωματίδια χρυσού-AuNPs (DNA3). Στη συνέχεια τοποθετήθηκε η OTA και ακολούθως μπλε του μεθυλενίου (MB). Το

σήμα μετρήθηκε με CV. Όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα η προσθήκη της ΟΤΑ προκάλεσε μείωση του ρεύματος οξειδοαναγωγής του MB [71].



Σχήμα 19 : Ηλεκτροχημικός βιοαισθητήρας απταμερούς για ανίχνευση ΟΤΑ [71]

Επίσης, οι Fan et al. ανέπτυξαν έναν απλό αισθητήρα για ανίχνευση του εντομοκτόνου “acetamiprid” με EIS. Για την ενίσχυση της ευαισθησίας του βιοαισθητήρα χρησιμοποιήθηκαν AuNPs. Με την προσθήκη του αναλύτη και την δημιουργία του συμπλόκου acetamiprid-απταμερούς αυξήθηκε η αντίσταση μεταφοράς ηλεκτρονίων στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου [72].



Σχήμα 20 : Διαγραμματική απεικόνιση αντίστασης υπό αυξανόμενες συγκεντρώσεις acetamiprid [72]

Σε άλλη μελέτη, αποδείχθηκε πως η χρήση του αμινοξέος L-τρυπτοφάνη για την ανάπτυξη βιοαισθητήρα χρήσιμου στη διάγνωση μεταβολικών ασθενειών, προκαλούσε μείωση του ηλεκτροχημικού σήματος. Για την επίτευξη αυτού του στόχου χρησιμοποιήθηκε απταμερές τροποποιημένο με ομάδαθειόλης στο 5' άκρο και μπλε του μεθυλενίου στο 3' άκρο [73]. Τέλος, ένα ακόμα παράδειγμα χρήσης απταμερών για την ανάπτυξη ηλεκτροχημικού αισθητήρα από τους ερευνητές Ying Liu et al., αφορά την ανίχνευση της ιντερφερόνης-γ (IFN-γ). Κατά την διαδικασία αυτή ένα ειδικό απταμερές για την IFN-γ που περιείχε ομάδαθειόλης, τροποποιήθηκε με μπλε του μεθυλενίου το οποίο λειτουργεί ως επισημαντής για την οξειδοαναγωγή. Το απταμερές ακινητοποιήθηκε στην επιφάνεια ενός ηλεκτροδίου χρυσού και δημιούργησε σύμπλοκο με την IFN-γ. Το γεγονός αυτό είχε σαν αποτέλεσμα την μείωση του ηλεκτρικού σήματος [74].

5.4 Εφαρμογές Βιοαισθητήρων

Η ολοένα αυξανόμενη έρευνα στον τομέα των βιοαισθητήρων έχει συντελέσει στην δημιουργία αποτελεσματικών συσκευών ανίχνευσης και μέτρησης. Οι συσκευές αυτές συναντώνται σε πληθώρα εφαρμογών καθώς γίνεται λόγος για ευκολία στην χρήση, σχετικά χαμηλό κόστος λειτουργίας, υψηλή ευαισθησία και ακρίβεια [75].

Οι βιοαισθητήρες λοιπόν, έχουν ευρύ φάσμα εφαρμογών που στοχεύουν στη βελτίωση της ποιότητας ζωής [51]. Στις εφαρμογές αυτές συμπεριλαμβάνονται ο έλεγχος τροφίμων, η περιβαλλοντική παρακολούθηση, η βιομηχανία καθώς και οι κλινικές μελέτες και εφαρμογές. [51,53,58,75-78]. Όσον αφορά την βιομηχανία τροφίμων διασφαλίζουν τον ποιοτικό έλεγχο και την ασφάλεια τους [51,75-77]. Συμμετέχουν επίσης στην παρακολούθηση της ιχνηλασιμότητας και της θρεπτικής αξίας των τροφίμων [51]. Πολύ σημαντικός είναι ο ρόλος τους στον τομέα της ιατρικής για την πρόληψη, τη διάγνωση, τον έλεγχο και τη θεραπεία ασθενειών [53,78]. Λειτουργούν ανιχνεύοντας βιομόρια, που είναι είτε δείκτες ασθένειας είτε στόχοι φαρμάκου [51,75]. Παραδείγματα τέτοιων περιπτώσεων αποτελούν η ανίχνευση και η παρακολούθηση του καρκίνου, η ανίχνευση καρδιαγγειακών νοσημάτων και ο έλεγχος του διαβήτη [76]. Επιπλέον, ανιχνεύοντας χημικούς παράγοντες, οργανικούς ρυπαντές, τοξικά στοιχεία και παθογόνα στο έδαφος, στον αέρα και στο νερό περιορίζουν την

ρύπανση του περιβάλλοντος και συμβάλλουν στην παρακολούθηση του [75-76]. Στην βιομηχανία επιτρέπουν την δειγματοληψία σε μεγάλη κλίμακα [75].



Εικόνα 2 : Εφαρμογές Βιοαισθητήρων [51]

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί πως ανάλογα με τη χρησιμότητα τους ορισμένοι βιοαισθητήρες λειτουργούν ως εργαλεία ανάλυσης μίας χρήσης, ενώ άλλοι συμμετέχουν σε μακροπρόθεσμες αναλύσεις όπου χρειάζονται από ώρες έως αρκετές ημέρες [77].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 – ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κατά το πειραματικό μέρος της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης με στόχο την ανάπτυξη ενός ηλεκτροχημικού βιοαισθητήρα για την ανίχνευση της οξυτετρακυκλίνης σε τρόφιμα όπως το γάλα, με στοιχεία αναγνώρισης τα απταμερή, πραγματοποιήθηκαν τα εξής: i) χαρακτηρισμός των απταμερών ως προς την αλλαγή της δομής τους κατά την πρόσδεση τους με τον αναλύτη και εκτίμηση της συγγένειας πρόσδεσης και ii) ανάπτυξη βιοαισθητήρα με χρήση ηλεκτροδίων χρυσού.

6.1 Επιλογή Απταμερών

Η αρχική επιλογή των απταμερών που είναι ικανά να προσδεθούν εκλεκτικά με την οξυτετρακυκλίνη βασίστηκε στην ήδη υπάρχουσα βιβλιογραφία ενώ στην συνέχεια αξιολογήθηκε μέσω της πειραματικής διαδικασίας [79-81]. Για τον σκοπό αυτό κρίθηκε αναγκαία η κατανόηση της διαμόρφωσης των απταμερών στο χώρο και η αποσαφήνιση της διαδικασίας πρόσδεσης με το αντιβιοτικό-στόχο και της τελικής δομής του συμπλόκου. Στο πλαίσιο αυτό έγινε προσπάθεια προσδιορισμού της σταθεράς διάστασης (K_d).

Έτσι, επιλέχθηκαν τα κάτωθι απταμερή:

- **OTC-APT1-71:** 5'- GGA ATT CGC TAG CAC GTT GAC GCT GGT GCC CGG TTG TGG TGC GAG TGT TGT GTG GAT CCG AGC TCC ACG TG-3'
- **OTC-APT2-40:** 5'-ACG TTG ACG CTG GTG CCC GGT TGT GGT GCG AGT GTT GTG T-3'
- **OTC-APT3:** 5'-GGA ATT CGC TAG CCG AGT TGA GCC GGG CGC GGT ACG GGT ACT GGT ATG TGT GGG GAT CCG AGC TCC ACG TG-3'
- **OTC-APT4:** 5'-CGA GTT GAG CCG GGC GCG GTA CGG GTA CTG GTA TGT GTG G-3'
- **OTC-APT5:** 5'-ACG ACA TTC CGT TGA TCT CTC CCT TTT GGG TTG GTG TCG T-3'

- **OTC-APT6:** 5'-GGG GGC ACA CAT GTA GGT GCT GTC CAG GTG
TGG TTG TGG T-3'

Όλα τα απταμερή που χρησιμοποιήθηκαν ήταν της εταιρείας Intergrated DNA Technologies.

6.2 Κυκλικός Διχρωισμός

Η χρήση του Κυκλικού Διχρωισμού αποσκοπεί τόσο στην κατανόηση της δομής των απταμερών και των τροποποιήσεων αυτής ύστερα από την πρόσδεση με τον στόχο όσο και στον χαρακτηρισμό της. Όπως αποδείχθηκε πειραματικά, πρόκειται για μια μέθοδο υψηλής ευαισθησίας που επηρεάζεται από παραμέτρους όπως η θερμοκρασία μέτρησης, η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος, η χρήση γαλακτωματοποιητή. Το μήκος διαδρομής (path length), η ταχύτητα σάρωσης (scanning speed), ο αριθμός σαρώσεων σε ένα δείγμα (accumulation), το εύρος ζώνης φωτός (bandwidth) αποτελούν επίσης παραμέτρους του οργάνου που είναι δυνατόν να ασκήσουν επιρροή κατά τη μέτρηση.

6.2.1 Παρασκευή Διαλυμάτων

- Ρυθμιστικό Διάλυμα

Η βάση του ρυθμιστικού διαλύματος που χρησιμοποιήθηκε για τις μετρήσεις κυκλικού διχρωισμού ήταν το τρις-αμινομεθάνιο (TRIS). Στο διάλυμα προστέθηκαν επίσης τα εξής άλατα: χλωριούχο νάτριο (NaCl), χλωριούχο κάλιο (KCl), χλωριούχο μαγνήσιο (MgCl₂) και χλωριούχο ασβέστιο (CaCl₂). Ως γαλακτωματοποιητής χρησιμοποιήθηκε Tween20. Το pH ρυθμίστηκε με προσθήκη μικροποσότητας υδροχλωρικού οξέος (HCl).

Κάτωθι, περιγράφεται αναλυτικά η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος:

20mM Tris, 100mM NaCl, 5mM KCl, 2mM MgCl₂, 1mM CaCl₂, Tween20

Η περιεκτικότητα του διαλύματος σε Tween20 διαφοροποιήθηκε ανάλογα με το απταμερές. Πιο συγκεκριμένα για τα απταμερή OTC-APT1-71, OTC-APT4, OTC-APT6 η συγκέντρωση του ήταν 0.1% και για τα απταμερή OTC-APT2-40, OTC-APT3 και APT-APT5 ήταν 0.05%.

Όλα τα αντιδραστήρια ήταν της εταιρείας Sigma-Aldrich.

- Διάλυμα Απταμερούς

Τα αρχικά “stock” διαλύματα όλων των απταμερών προέκυψαν ύστερα από διάλυση τους σε νερό απαλλαγμένο από νουκλεάσες (nuclease free molecular water) με τελική συγκέντρωση 100uM. Τα “stock” διατηρήθηκαν στους -19°C.

Κατά την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις απταμερών. Για τα OTC-APT1-71, OTC-APT3, OTC-APT5 και OTC-APT6 η συγκέντρωση ήταν 2uM και για τα OTC-APT2-40, OTC-APT4 η συγκέντρωση 1uM ($OD_{260} \sim 0.8$). Για την δημιουργία των παραπάνω διαλυμάτων μικρή ποσότητα από το αρχικό “stock” διάλυμα τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο και θερμάνθηκε στους 95°C για 5min. Στη συνέχεια το απταμερές μεταφέρθηκε σε πάγο όπου παρέμεινε για 2min με στόχο να αποκτήσει θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, για την χρήση τους στην πειραματική διαδικασία, πραγματοποιήθηκε αραίωση με το ρυθμιστικό διάλυμα.

- Διάλυμα Οξυτετρακυκλίνης (OTC)

Για το διάλυμα της OTC χρησιμοποιήθηκε υδροχλωρική οξυτετρακυκλίνη (OTC-HCl, MW 496,89) της εταιρίας Sigma-Aldrich, η οποία είναι διαλυτή στο νερό και διατίθεται σε στερεή μορφή. Το αρχικό “stock” διάλυμα είχε συγκέντρωση 8mM. Για την δημιουργία του ζυγίστηκε η απαραίτητη ποσότητα και διαλύθηκε σε στείρο υπερκάθαρο νερό (4mg/ml). Οι επιθυμητές συγκεντρώσεις OTC παρασκευάστηκαν από διαδοχικές αραιώσεις με το ρυθμιστικό διάλυμα.

6.2.2 Οργανολογία

Για τα πειράματα κυκλικού διχρωισμού χρησιμοποιήθηκε το φασματόμετρο J-1500 Cd spectrometer της εταιρείας Jasco.

Το εύρος του μήκος κύματος που λήφθηκαν τα φάσματα ήταν από 200nm έως 320nm σε θερμοκρασία 25 °C.

Ύστερα από διαφορετικές δοκιμές οι υπόλοιπες παράμετροι του οργάνου ρυθμίστηκαν ως εξής: μήκος διαδρομής διάφανης κυψελίδας 10mm, ταχύτητα σάρωσης 100nm/min, αριθμός σαρώσεων 2, εύρος ζώνης φωτός 2nm.

6.2.3 Πειραματική Διαδικασία

Η πειραματική διαδικασία αποτελείται από την λήψη του φάσματος του απταμερούς, των φασμάτων του συμπλόκου απταμερούς-στόχου υπό διαφορετικές συγκεντρώσεις OTC και του φάσματος της OTC απουσία απταμερούς για τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις, σε μήκος κύματος 200-320nm. Τελικά, τα διαφορετικά φάσματα της OTC αφαιρούνται από τα φάσματα του συμπλόκου για τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις με στόχο την ελαχιστοποίηση της επίδρασης της μήτρας.

Πιο αναλυτικά, στην αρχή του πειράματος προστίθενται 1000μl ρυθμιστικού διαλύματος στην κυψελίδα 10mm και λαμβάνεται το αντίστοιχο φάσμα. Η μέτρηση αυτή λειτουργεί ως “baseline” και αφαιρείται αυτόματα από το όργανο και πριν από κάθε μέτρηση για την αποφυγή επιπλέον θορύβου. Στην συνέχεια η κυψελίδα ξεπλένεται και στεγνώνεται με ξηρό αέρα N₂(g). Η επόμενη μέτρηση αφορά την λήψη φάσματος του απταμερούς όγκου 1000μl. Το πρώτο μέρος του πειράματος ολοκληρώνεται με την προσθήκη διαδοχικών ποσοτήτων μικρού όγκου OTC στο ήδη υπάρχον διάλυμα απταμερούς και με την καταγραφή των αντίστοιχων φασμάτων. Η διαδικασία αυτή έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης OTC στο μετρούμενο διάλυμα και την πιθανή δημιουργία συμπλόκου μεταξύ απταμερούς και στόχου. Πολύ σημαντική είναι η επώαση απταμερούς και OTC για 5min πριν από κάθε μέτρηση.

Παρόμοια γίνεται και η λήψη φάσματος της OTC απουσία απταμερούς. Η μόνη διαφορά έγκειται στο γεγονός ότι οι διαφορετικοί όγκοι OTC προστίθενται κατευθείαν στο ρυθμιστικό διάλυμα (απουσία απταμερούς).

Το πείραμα ολοκληρώνεται με την αφαίρεση των παραπάνω φασμάτων για κάθε συγκέντρωση OTC, ώστε να ακολουθήσει η επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

Η προσθήκη OTC πραγματοποιήθηκε ανάλογα με την αρχική συγκέντρωση του απταμερούς και σύμφωνα με τους πίνακες.

Πίνακας 3: Σειρά προσθήκης διαλύματος OTC υπό διαφορετικές συγκεντρώσεις στο μετρούμενο διάλυμα απταμερούς 1uM.

Τελική συγκέντρωση OTC (uM)	Συνολικός όγκος διαλύματος στην κυψελίδα (ul)	Προστιθέμενος όγκος OTC στην κυψελίδα (ul)	Συγκέντρωση «stock» διαλύματος OTC (uM)
0	1000		
0,5	1002	2	250
1	1004	2	250
2	1006	2	500
3	1008	2	500
4	1010	2	500
6	1012	2	1000
8	1014	2	1000
16	1016	2	4000
24	1018	2	4000
32	1020	2	4000
48	1022	2	8000
64	1024	2	8000

Πίνακας 4: Σειρά προσθήκης διαλύματος OTC υπό διαφορετικές συγκεντρώσεις στο μετρούμενο διάλυμα απταμερούς 2Um.

Τελική συγκέντρωση OTC (uM)	Συνολικός όγκος διαλύματος στην κυψελίδα (ul)	Προστιθέμενος όγκος OTC στην κυψελίδα (ul)	Συγκέντρωση «stock» διαλύματος OTC (uM)
0	1000		
1	1002	2	500
2	1004	2	500
4	1006	2	1000
8	1008	2	2000
16	1010	2	4000
32	1012	2	8000
48	1014	2	8000
64	1016	2	8000
128	1024	8	8000

Τέλος, στο πλαίσιο περαιτέρω μελέτης και αξιολόγησης της δομής των απταμερών χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό πρόγραμμα “m-Fold”, μέσα από το οποίο δίνεται η δυνατότητα πρόβλεψης των πιθανών δευτεροταγών δομών του απταμερούς.

6.3 Ένταση Φθορισμού- Φθορισμός Πόλωσης

Οι τεχνικές φθορισμού στοχεύουν στη μελέτη της συγγένειας πρόσδεσης απταμερούς με το μόριο-στόχο και κατ’ επέκταση στον προσδιορισμό του συντελεστή διάστασης K_d . Προϋπόθεση για την εφαρμογή των τεχνικών αποτελεί η ύπαρξη φθορίζουσας ένωσης. Ο εγγενής φθορισμός της OTC

καθιστά δυνατή την χρήση φθορισμού πόλωσης για την μελέτη πρόσδεσης της με το απταμερές. Ο FP υπολογίζει την έκταση κίνησης της φθορίζουσας ουσίας κατά την διέγερση. Η κινητικότητα της OTC αυξάνεται κατά την δημιουργία συμπλόκου με το απταμερές και μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση του FP.

6.3.1 Παρασκευή Διαλυμάτων

- Ρυθμιστικό Διάλυμα

Η βάση του ρυθμιστικού διαλύματος που χρησιμοποιήθηκε για τις μετρήσεις φθορισμού ήταν το τρις-αμινομεθάνιο (TRIS). Στο διάλυμα προστέθηκαν επίσης τα εξής άλατα: χλωριούχο νάτριο (NaCl), χλωριούχο κάλιο (KCl), χλωριούχο μαγνήσιο ($MgCl_2$) και χλωριούχο ασβέστιο ($CaCl_2$). Ως γαλακτωματοποιητής χρησιμοποιήθηκε Tween20. Το pH ρυθμίστηκε με προσθήκη μικροποσότητας υδροχλωρικού οξέος (HCl).

Κάτωθι, περιγράφεται αναλυτικά η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος:

20mM Tris, 100mM NaCl, 5mM KCl, 2mM $MgCl_2$, 1mM $CaCl_2$, Tween20

Η περιεκτικότητα του διαλύματος σε Tween20 διαφοροποιήθηκε ανάλογα με το απταμερές. Πιο συγκεκριμένα για τα απταμερή OTC-APT1-71, OTC-APT4, OTC-APT6 η συγκέντρωση του ήταν 0.1% και για τα απταμερή OTC-APT2-40, OTC-APT3 και OTC-APT5 ήταν 0.05%.

- Διάλυμα Απταμερούς

Τα αρχικά “stock” διαλύματα όλων των απταμερών προέκυψαν ύστερα από διάλυση τους σε νερό απαλλαγμένο από νουκλεάσες (nuclease free molecular water) με τελική συγκέντρωση 100uM. Τα “stock” διατηρήθηκαν στους $-19^{\circ}C$.

Κατά την πειραματική διαδικασία, μικρή ποσότητα από το αρχικό «stock» διάλυμα τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο και θερμάνθηκε στους $95^{\circ}C$ για 5min. Στη συνέχεια το απταμερές μεταφέρθηκε σε πάγο όπου παρέμεινε για 2min με στόχο να αποκτήσει θερμοκρασία δωματίου.

Τα διαλύματα του απταμερούς που χρησιμοποιήθηκαν τελικά στην πειραματική διαδικασία προέκυψαν από διαδοχικές αραιώσεις με το ρυθμιστικό διάλυμα. Συνολικά δημιουργήθηκαν δεκαοχτώ διαλύματα απταμερούς συγκέντρωσης 4, 8, 16, 40, 80, 160, 320, 400, 800, 1200, 1600, 2400, 3200, 4000, 8000, 16000, 32000, 40000nM

- Διάλυμα Οξυτετρακυκλίνης (OTC)

Για το διάλυμα της OTC χρησιμοποιήθηκε υδροχλωρική οξυτετρακυκλίνη (OTC-HCl, MW 496,89) της εταιρίας Sigma-Aldrich, η οποία είναι διαλυτή στο νερό και διατίθεται σε στερεή μορφή. Το αρχικό “stock” διάλυμα είχε συγκέντρωση 2mM. Για την δημιουργία του ζυγίστηκε η απαραίτητη ποσότητα και διαλύθηκε σε στείρο υπερκάθαρο νερό (1mg/ml). Η επιθυμητή συγκέντρωση διαλύματος OTC παρασκευάστηκε με διαδοχική αραίωση του «stock» με το ρυθμιστικό διάλυμα και ήταν 400nM.

6.3.2 Οργανολογία

Για τα πειράματα φθορισμού χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο Spark® Multimode Microplate Reader by Tecan.

Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε πλάκα μικροπιλοδότησης (microplate) 96 θέσεων και μαύρου χρώματος (96-well plate flat black) της εταιρείας Greiner.



Εικόνα 3 : Πλάκα μικροπιλοδότησης 96 θέσεων

Για τις μετρήσεις έντασης και πόλωσης φθορισμού πραγματοποιήθηκε διέγερση (excitation) στα 370nm με εκπομπή (emission) στα 530nm. Τα δεδομένα αυτά προέκυψαν από την υπάρχουσα βιβλιογραφία.

6.3.3 Πειραματική Διαδικασία

Με την ολοκλήρωση της παρασκευής των διαλυμάτων, αυτά μεταφέρονται με χρήση πολυκάναλης πιπέτας (multichannel pipette) στην πλάκα μικροπιλοδότησης. Έτσι κάθε θέση (well) περιέχει 50μl διαλύματος OTC και 50μl διαλύματος απταμερούς. Με αυτόν τον τρόπο τα αρχικά διαλύματα αραιώνονται 1:1 και προκύπτουν οι εξής νέες συγκεντρώσεις:

- Διάλυμα OTC : 200nM
- Διαλύματα Απταμερούς: 2, 4, 8, 20, 40, 80, 160, 200, 400, 600, 800, 1200, 1600, 2000, 4000, 8000, 16000, 20000nM

Για την μέτρηση φθορισμού της οξυτετρακυκλίνης απουσία απταμερούς προστίθενται 50μl OTC και 50μl ρυθμιστικού διαλύματος.

Με στόχο τον έλεγχο της επαναληψιμότητας, κάθε τελικό διάλυμα που προκύπτει σύμφωνα με την παραπάνω διαδικασία, δημιουργείται δύο φορές σε δύο ξεχωριστές θέσεις της πλάκας μικροτιτλοδότησης.

6.4 Ανάπτυξη Ηλεκτροχημικού Βιοαισθητήρα

Τελικός σκοπός της παρούσας διπλωματικής μελέτης ήταν η ανάπτυξη ηλεκτροχημικού βιοαισθητήρα για την ανίχνευση οξυτετρακυκλίνης, χρησιμοποιώντας ως στοιχείο βιοαναγνώρισης απταμερή που προσδένονται εκλεκτικά με το αντιβιοτικό. Οι αλληλουχίες των απταμερών που χρησιμοποιήθηκαν για τον σκοπό αυτό επιλέχθηκαν με βάση την αξιολόγηση των προηγούμενων πειραματικών δεδομένων.

Για την επίτευξη της ακινητοποίησης τους στην επιφάνεια ηλεκτροδίου χρυσού, τα επιλεγμένα απταμερή τροποποιήθηκαν είτε με θειολική ομάδα είτε με αμινομάδα, από την εταιρεία Intergrated DNA Technologies. Οι αλληλουχίες που προέκυψαν ήταν οι εξής:

OTC-APT1-71-Thio: 5' GGA ATT CGC TAG CAC GTT GAC GCT GGT GCC CGG TTG TGG TGC GAG TGT TGT GTG GAT CCG AGC TCC ACG TG/3ThioMC3-D/-3'

OTC-APT2-40-Thio: 5'-/5ThioMC6-D/ACG TTG ACG CTG GTG CCC GGT TGT GGT GCG AGT GTT GTG T-3'

OTC-APT5-Thio3: 5'-ACG ACA TTC CGT TGA TCT CTC CCT TTT GGG TTG GTG TCG T/3ThioMC3-D/-3'

OTC-APT5-Thio5: 5'-/5ThioMC6-D/ACG ACA TTC CGT TGA TCT CTC CCT TTT GGG TTG GTG TCG T-3'

OTC-APT5-Amino: 5'- ACG ACA TTC CGT TGA TCT CTC CCT TTT GGG TTG GTG TCG T/3AmMO/-3'

OTC-APT7-Thio: 5'/5*ThioMC6-D*/CGT ACG GAA TTC GCT AGC CCC CCG
GCA GGC CAC GGC TTG GGT TGG TCC CAC TGC GCG TGG ATC CGA
GCT CCA CGT G-3'

Η θειολική ομάδα συμβάλει στην ακινητοποίηση του απταμερούς στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου δημιουργώντας ισχυρούς δεσμούς με τα μόρια χρυσού. Στην περίπτωση χρήσης τροποποιημένου ηλεκτροδίου χρυσού με N-υδροξυ-ηλεκτρικό εστέρα του α-λιποϊκού οξέος (α-lipoic acid-NHS), που λειτουργεί ως μόριο-συνδέτης (linker), η ακινητοποίηση του απταμερούς ενισχύεται παρουσία αμινομάδας στο 3' άκρο του.

Τελικά η δομική αλλαγή στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου κατά την πρόσδεση του ακινητοποιημένου απταμερούς με την οξυτετρακυκλίνη μετρήθηκε ηλεκτροχημικά υπολογίζοντας την μεταβολή της οξειδοαναγωγικής κορυφής διαλύματος $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ (Ferri/Ferro).

6.4.1 Παρασκευή Διαλυμάτων

- Διάλυμα $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$

Για τις ηλεκτροχημικές μετρήσεις χρησιμοποιήθηκε διάλυμα $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$, το οποίο περιείχε KCl σε συγκέντρωση 0.1M. Οι συγκεντρώσεις $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ διαφοροποιήθηκαν μεταξύ των δοκιμών και ήταν οι εξής: 0.1mM, 0.5mM, 1mM, 10mM.

- Διάλυμα Απταμερούς

Για την παρασκευή κάθε διαλύματος απταμερούς ποσότητα από το αρχικό «stock» διάλυμα (200uM) που φυλάσσεται στους -19°C, θερμάνθηκε στους 80-90°C για 5min. Τα τελικά διαλύματα απταμερούς δημιουργήθηκαν ύστερα από αραίωση του παραπάνω με φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (PBS) συγκέντρωσης 10mM που περιείχε MgCl_2 1mM.

Στο πλαίσιο της μελέτης της επίδρασης του ρυθμιστικού διαλύματος στην πρόσδεση του απταμερούς με τον στόχο χρησιμοποιήθηκε επιπλέον το κάτωθι διάλυμα: 20mM Tris/ 2mM MgCl_2 /100mM NaCl / 5mM KCl / 1mM CaCl_2 .

Συνολικά, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές με τις εξής συγκεντρώσεις απταμερούς: 20uM, 40uM, 80uM

Όλα τα αντιδραστήρια ήταν της εταιρείας Sigma-Aldrich.

- Διάλυμα Οξυτετρακυκλίνης

Για το διάλυμα της OTC χρησιμοποιήθηκε υδροχλωρική οξυτετρακυκλίνη (OTC-HCl, MW 496,89) της εταιρείας Duchefa Biochemie, η οποία είναι διαλυτή στο νερό και διατίθεται σε στερεή μορφή. Το αρχικό “stock” διάλυμα είχε συγκέντρωση 2mM και για την δημιουργία του ζυγίστηκε η απαραίτητη ποσότητα και διαλύθηκε σε υπερκάθαρο νερό (1mg/ml). Όλες οι επιμέρους συγκεντρώσεις OTC που μελετήθηκαν παρασκευάστηκαν από αραιώση του “stock” με το ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10mM /MgCl₂ 1mM.

- Λοιπά Διαλύματα

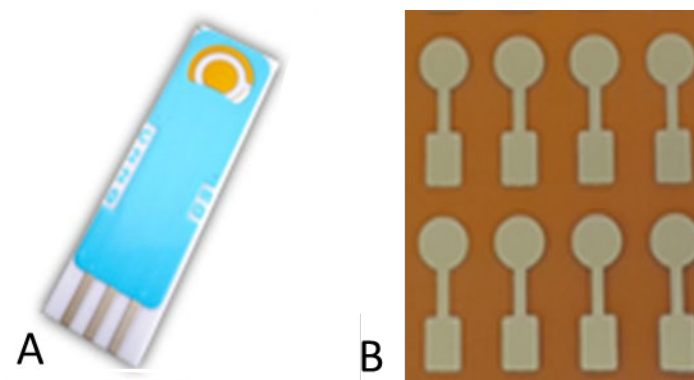
Διάλυμα Μερκαπτοαιθανόλης (MCE): Η MCE διαλύθηκε σε απιονισμένο νερό. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα απουσία MCE καθώς και παρουσία δ/τος συγκεντρώσεως 1mM, 0.25mM

Διάλυμα Linker: Για το διάλυμα του linker χρησιμοποιήθηκε N-υδροξυ-ηλεκτρικός εστέρας του α-λιποϊκού οξέος (α-lipoic acid-NHS) της εταιρείας MedChemExpress και αραιώθηκε σε διάλυμα αιθανόλης EtOH 50% (v/v) με τελική συγκέντρωση 2mM.

6.4.2 Οργανολογία

Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με χρήση του ποτενσιοστάτη/γαλβανοστάτη Metrohm Autolab PGSTAT12 εξοπλισμένου με GPES λογισμικό. Για την ανάπτυξη του ηλεκτροχημικού αισθητήρα χρησιμοποιήθηκε επίσης τυπική ηλεκτροχημική κυψέλη αποτελούμενη από ένα ηλεκτρόδιο αναφοράς Ag/AgCl (reference), ένα βοηθητικό ηλεκτρόδιο Pt (counter) και ένα ηλεκτρόδιο χρυσού ως εργασίας (working).

Πιο συγκεκριμένα για τα ηλεκτρόδια χρυσού, χρησιμοποιήθηκαν κυρίως ηλεκτρόδια κατασκευασμένα με ιοντοβολή (sputtered electrodes), ωστόσο πραγματοποιήθηκαν πειράματα και σε ηλεκτρόδια κατασκευασμένα με εκτύπωση μέσω πλέγματος (screen-printed electrodes-SPE) που διατίθενται στο εμπόριο από την εταιρεία DropSense (220AT).

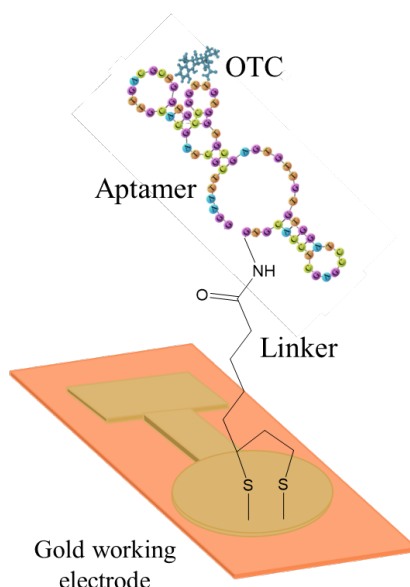


**Εικόνα 4: Ηλεκτρόδια χρυσού: A) Screen-printed της εταιρείας DropSense
B) Sputtered**

Για την πραγματοποίηση της μέτρησης όλα τα ηλεκτρόδια τοποθετήθηκαν εντός της κυψελίδας που περιείχε 15ml διαλύματος $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$.

6.4.3 Πειραματική Διαδικασία

Για την κατασκευή του αισθητήρα αναπτύχθηκαν δύο βασικές διαφορετικές διατάξεις στην επιφάνεια του. Στην πρώτη περίπτωση μετά την ακινητοποίηση του απταμερούς στο ηλεκτρόδιο, τοποθετήθηκε διάλυμα MCE. Η MCE λειτουργεί ως παράγοντας παρεμπόδισης (blocking agent) με στόχο την αποφυγή πρόσδεσης μη επιθυμητών μορίων στο ηλεκτρόδιο, βελτιώνοντας κατ' αυτό τον τρόπο την εκλεκτικότητα του αισθητήρα. Στην δεύτερη περίπτωση για την ενίσχυση της ακινητοποίησης του απταμερούς χρησιμοποιήθηκε ως «συνδέτης» (linker) διάλυμα N-υδροξυ-ηλεκτρικού εστέρα του α-λιποϊκού οξέος. Πρόκειται για μία δυνητικά αντιρρυπαντική ένωση πάνω στην οποία ακινητοποιήθηκε απταμερές τροποποιημένο με αμινομάδα στο 3' άκρο δημιουργώντας ομοιοπολικό δεσμό.



Εικόνα 5: Αναλυτική συσκευή ανίχνευσης με χρήση linker

Πριν την έναρξη των μετρήσεων πραγματοποιήθηκε ενεργοποίηση του ηλεκτροδίου με κυκλική βολταμετρία (5 κύκλοι στο μη τροποποιημένο ηλεκτρόδιο (bare), από -1V έως 0.6V και προς τις δύο κατευθύνσεις).

Τα αποτελέσματα ελήφθησαν ύστερα από μετρήσεις CV (εύρος -0.4V- +0.6V, ταχύτητα σάρωσης 0.01V/sec), DPV(εύρος -0.4V- +0.6V, ταχύτητα σάρωσης 0.01V/sec) και EIS (δυναμικό +0.25V, εύρος συχνότητας 100000Hz έως 0.1Hz) για καθένα από τα παρακάτω βήματα.

1^η περίπτωση:

- Μέτρηση μη τροποποιημένου (bare) ηλεκτροδίου
- Ακίνητοποίηση 10μl απταμερούς στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου και επώαση για 12h στους 4°C
- Τοποθέτηση 5μl διαλύματος MCE στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου και επώαση για 30min σε θερμοκρασία δωματίου
- Τοποθέτηση 5μl διαλύματος OTC (εύρος συγκεντρώσεων 50-500ng/ml) στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου και επώαση για 30min σε θερμοκρασία δωματίου

2^η περίπτωση:

- Μέτρηση μη τροποποιημένου (bare) ηλεκτροδίου

- Τοποθέτηση 5μl διαλύματος linker (2mM) στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου και επώαση για 2h στους 4°C
- Ακίνητοποίηση 10μl απταμερούς στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου και επώαση για 2.5h σε θερμοκρασία δωματίου
- Τοποθέτηση 10μl διαλύματος OTC (εύρος συγκεντρώσεων 50-500ng/ml) και επώαση για 30min σε θερμοκρασία δωματίου

Στην δεύτερη περίπτωση πραγματοποιήθηκε επιπλέον μελέτη για την ανίχνευση OTC σε γάλα. Για το σκοπό αυτό κατά την προετοιμασία των διαφορετικών διαλυμάτων OTC χρησιμοποιήθηκε διάλυμα γάλακτος 1:10 (0.01g σκόνη γάλακτος/10 ml διαλύματος PBS 10mM/MgCl₂ 1mM) κατόπιν φυγοκέντρησης (950 rpm-15 min).

Τέλος σημαντικό είναι να τονιστεί πως καθ' όλη την διάρκεια των πειραμάτων ελέγχθηκαν παράμετροι όπως οι συγκεντρώσεις των επιμέρους διαλυμάτων, η χρήση αναγωγικών διαλυμάτων, τα είδη ρυθμιστικών διαλυμάτων και οι χρόνοι επώασης με στόχο την βελτιστοποίησή τους.

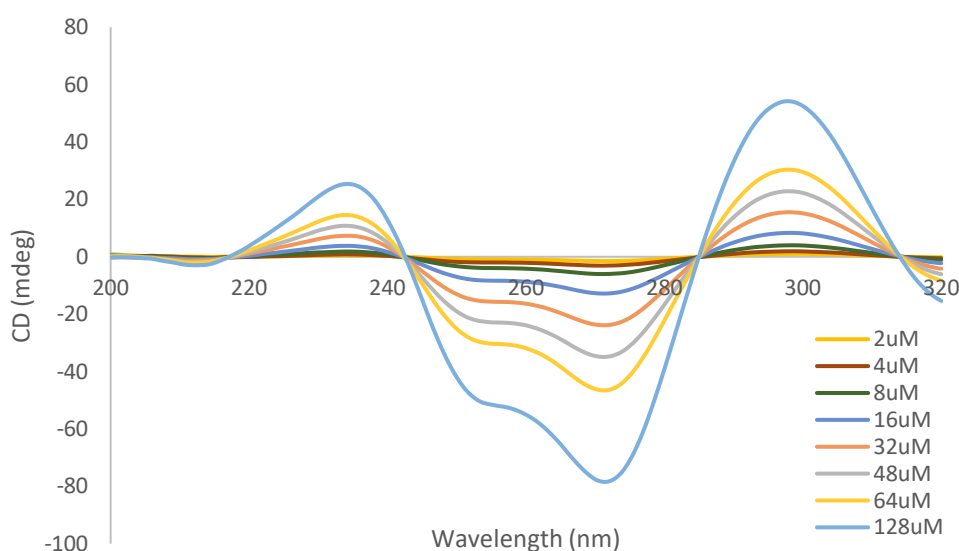
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 – ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

7.1 Αποτελέσματα Φασματομετρίας Κυκλικού Διχρωισμού

Με στόχο την βελτιστοποίηση των συνθηκών της πειραματικής διαδικασίας και τελικά την αξιολόγηση της διαμόρφωσης του απταμερούς και του συμπλόκου απταμερούς-οξυτετρακυκλίνης ελέγχθηκαν διαφορετικές παράμετροι.

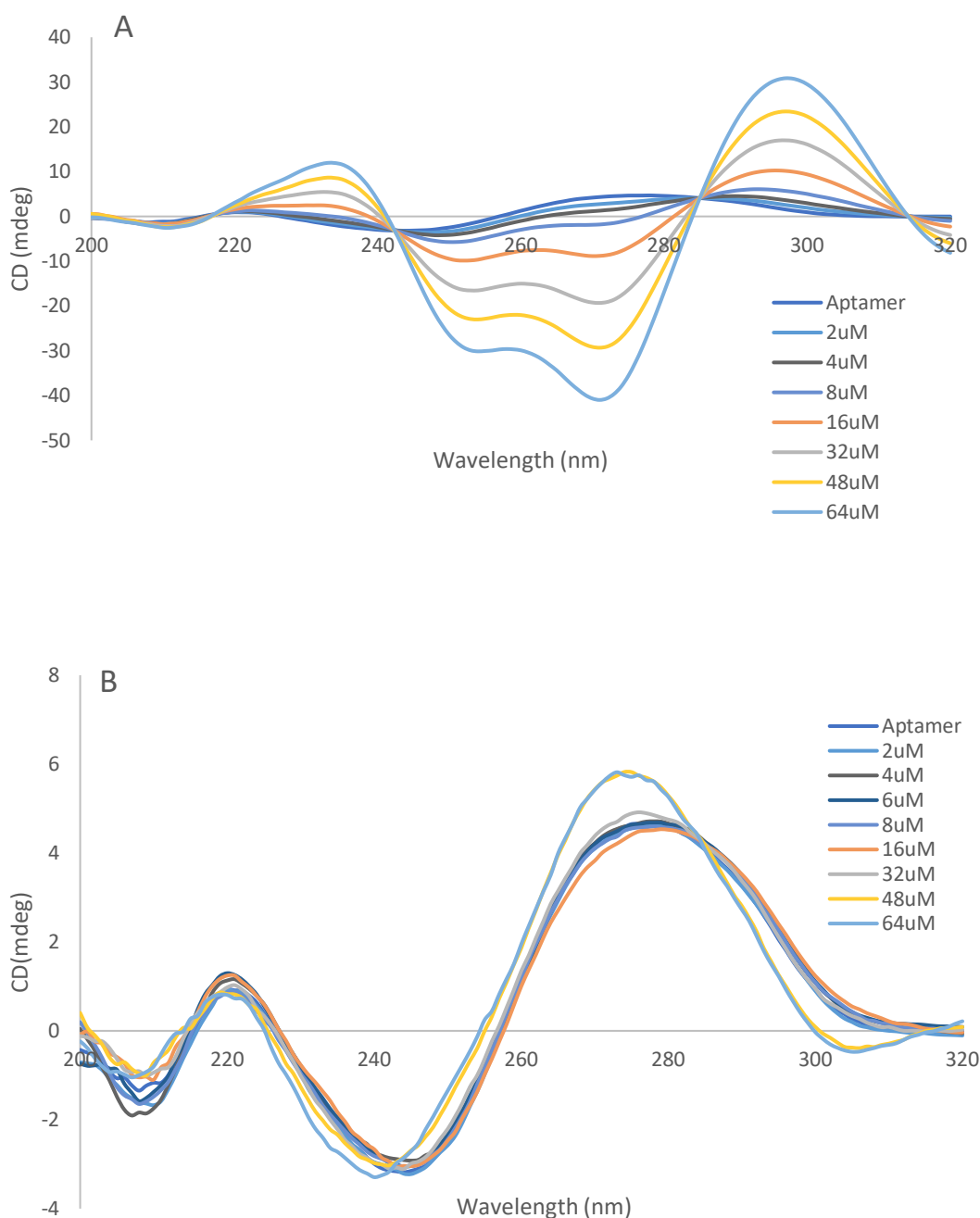
Η λήψη των κάτωθι φασμάτων πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 25°C, μήκος διαδρομής διάφανης κυψελίδας 10mm, ταχύτητα σάρωσης 100nm/min, αριθμό σαρώσεων 2, εύρος ζώνης φωτός 2nm και ρυθμιστικό διάλυμα TRIS 20mM (100mM NaCl, 5mM KCl, 2mM MgCl₂, 1mM CaCl₂, Tween20).

Για την διεξαγωγή ασφαλέστερων αποτελεσμάτων κρίθηκε απαραίτητη η λήψη φάσματος της OTC απουσία απταμερούς για μήκος κύματος 200-320nm. Παρατηρήθηκε κατά αυτό τον τρόπο ότι η OTC παρουσιάζει φάσμα σε εκείνη την περιοχή (Σχήμα 21), το οποίο αφαιρέθηκε από το φάσμα απταμερούς-OTC για τις επιμέρους συγκεντρώσεις της με στόχο την λήψη του τελικού φάσματος του εκάστοτε απταμερούς (Σχήμα 22).



Σχήμα 21: Φάσματα CD διαλύματος OTC διαφορετικών συγκεντρώσεων, απουσία απταμερούς.

Όπως γίνεται αντιληπτό από το Σχήμα 22, το φάσμα της OTC είναι δυνατόν να αλλοιώσει το τελικό αποτέλεσμα οδηγώντας σε εσφαλμένα συμπεράσματα.



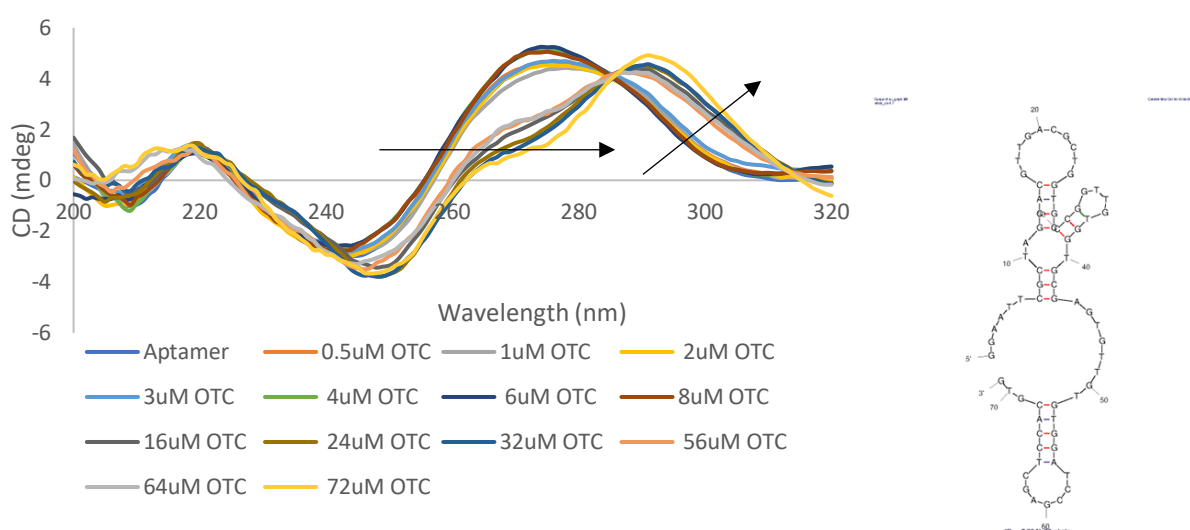
Σχήμα 22: Φάσματα CD διαλύματος απταμερούς OTC-APT1-71 2uM απουσία και παρουσία OTC (2-64uM) πριν (A) και μετά (B) την αφαίρεση του φάσματος OTC.

Συνεπώς, για την αξιολόγηση της δομής απταμερούς απουσία και παρουσία στόχου και πιο συγκεκριμένα OTC, όλα τα διαγράμματα που παρατίθενται παρακάτω έχουν προέλθει ύστερα από αφαίρεσή του.

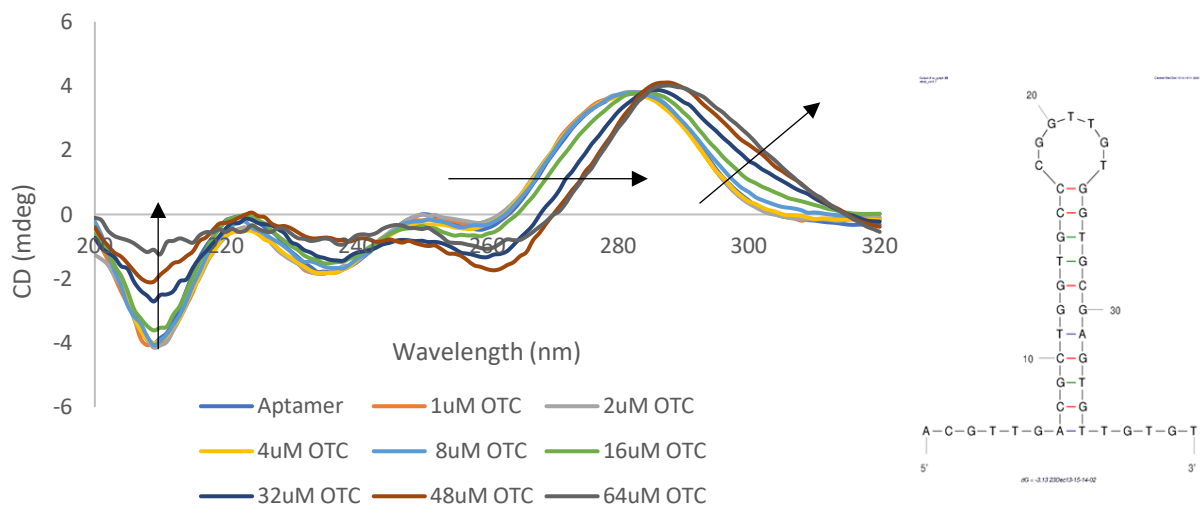
Τα απταμερή OTC-APT1-71 και OTC-APT2-40 αποτελούνται από παρόμοια αλληλουχία βάσεων. Η διαφορά στο μήκος τους έγκειται στο γεγονός ότι η δεύτερη αλληλουχία έχει τροποποιηθεί με αφαίρεση των επιπλέον βάσεων που στην πρώτη περίπτωση λειτουργούν ως εκκινήτες. Οι παραπάνω βάσεις είναι υπεύθυνες για την διαφορετική αρχική δομή των δύο απταμερών.

Το απταμερές OTC-APT1-71 σχηματίζει δομή B-form DNA, καθώς παρουσιάζει θετική και αρνητική κορυφή στα 280nm και 240nm, αντίστοιχα. Η προσθήκη OTC προκαλεί μετατόπιση των κορυφών, δημιουργώντας δομή που μπορεί να χαρακτηριστεί ως hybrid G-quadruplex (Σχήμα 23).

Από την άλλη μεριά οι επιμέρους κορυφές στο φάσμα του απταμερούς OTC-APT2-40 υποδηλώνουν δομή A-form DNA, ωστόσο με την προσθήκη OTC καθίσταται αμφίβολος ο χαρακτηρισμός της δομής (Σχήμα 24).



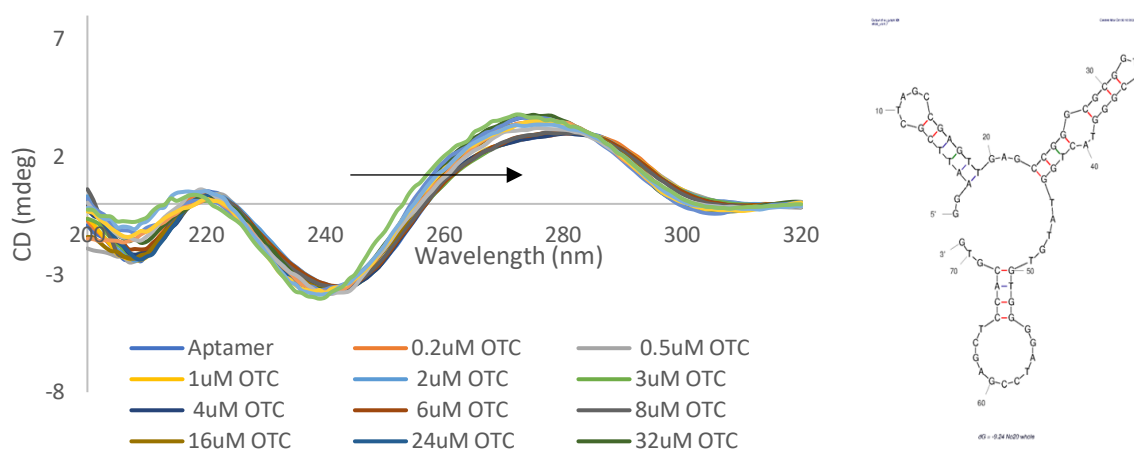
Σχήμα 23: Α. Φάσματα CD για το απταμερές OTC-APT1-71 απουσία και παρουσία OTC. Β. Πιθανή δευτεροταγής δομή OTC-APT1-71.



Σχήμα 24: Α. Φάσματα CD για το απταμερές OTC-APT2-40 απουσία και παρουσία OTC. Β. Πιθανή δευτεροταγής δομή OTC-APT2-40.

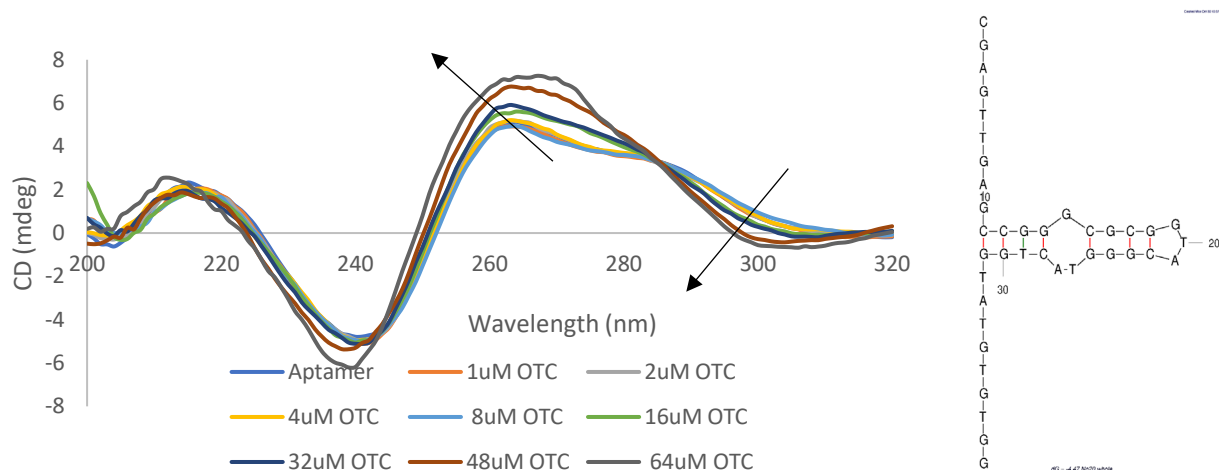
Όσον αφορά, τα απταμερή OTC-APT3 και OTC-APT4, των Σχημάτων 25 και 26 αντίστοιχα, η μεταξύ τους διαφοροποίηση εξαρτάται και πάλι από την παρουσία ή μη, βάσεων που λειτουργούν ως εκκινητές.

Παρατηρώντας την μετατόπιση των κορυφών στην πρώτη περίπτωση (Σχήμα 25) καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η προσθήκη OTC, πιθανώς μετατρέπει την δομή του OTC-APT3 από B-form DNA σε hybrid G-quadruplex.



Σχήμα 25: Α. Φάσματα CD για το απταμερές OTC-APT3 απουσία και παρουσία OTC. Β. Πιθανή δευτεροταγής δομή OTC-APT3.

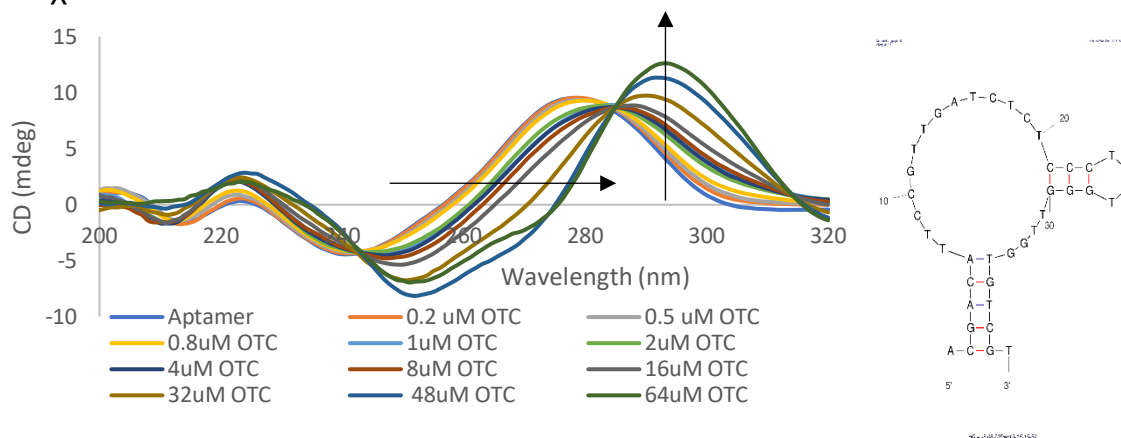
Στην περίπτωση του απταμερούς OTC-APT4 (Σχήμα 26) απουσία OTC παρατηρείται δομή hybrid G-quadruplex, η οποία με την σταδιακή προσθήκη OTC μετατρέπεται σε parallel G-quadruplex.



Σχήμα 26: Α. Φάσματα CD για το απταμερές OTC-APT4 απουσία και παρουσία OTC.

Β. Πιθανή δευτεροταγής δομή OTC-APT4.

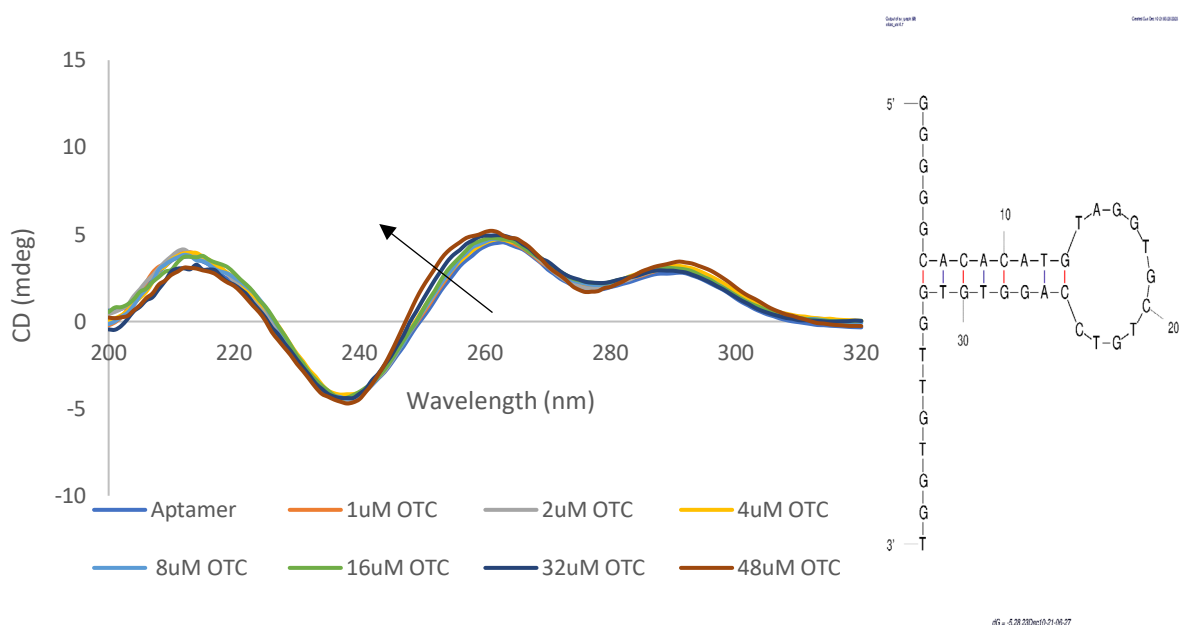
Σύμφωνα με το Σχήμα 27 το φάσμα του απταμερούς OTC-APT5 πριν την προσθήκη OTC στο διάλυμα παρουσιάζει θετική κορυφή στα 280nm και αρνητική κορυφή στα 240nm. Καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση της OTC παρατηρείται μετατόπιση των κορυφών προς τα 300nm και τα 280nm αντίστοιχα. Το αρχικό φάσμα υποδηλώνει B-form DNA, ενώ στη συνέχεια πιθανολογείται ότι δημιουργείται antiparallel G-quadruplex χωρίς όμως σαφή στοιχεία.



Σχήμα 27: Α. Φάσματα CD για το απταμερές OTC-APT5 απουσία και παρουσία OTC.

Β. Πιθανή δευτεροταγής δομή OTC-APT5.

Τέλος με βάση το Σχήμα 28, η προσθήκη OTC στο διάλυμα απταμερούς OTC-APT6 δεν φαίνεται να επηρεάζει την δομή του. Παρατηρείται μία μικρή αύξηση της θετικής κορυφής στα 260nm, χωρίς όμως αυτή να μετατοπίζεται. Κατά αυτό τον τρόπο διατηρείται ως hybrid G-quadruplex.



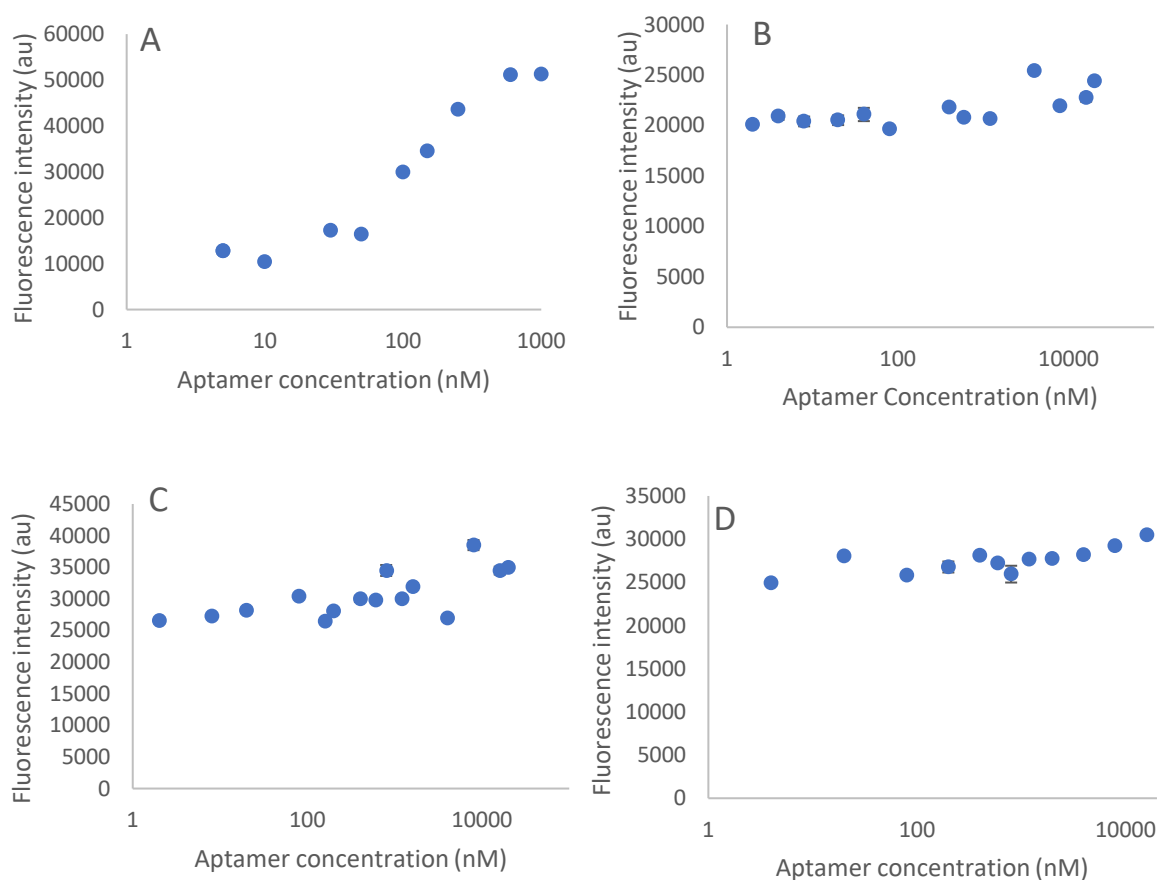
Σχήμα 28: Α. Φάσματα CD για το απταμερές OTC-APT6 απουσία και παρουσία στόχου.

Β. Πιθανή δευτεροταγής δομή OTC-APT6.

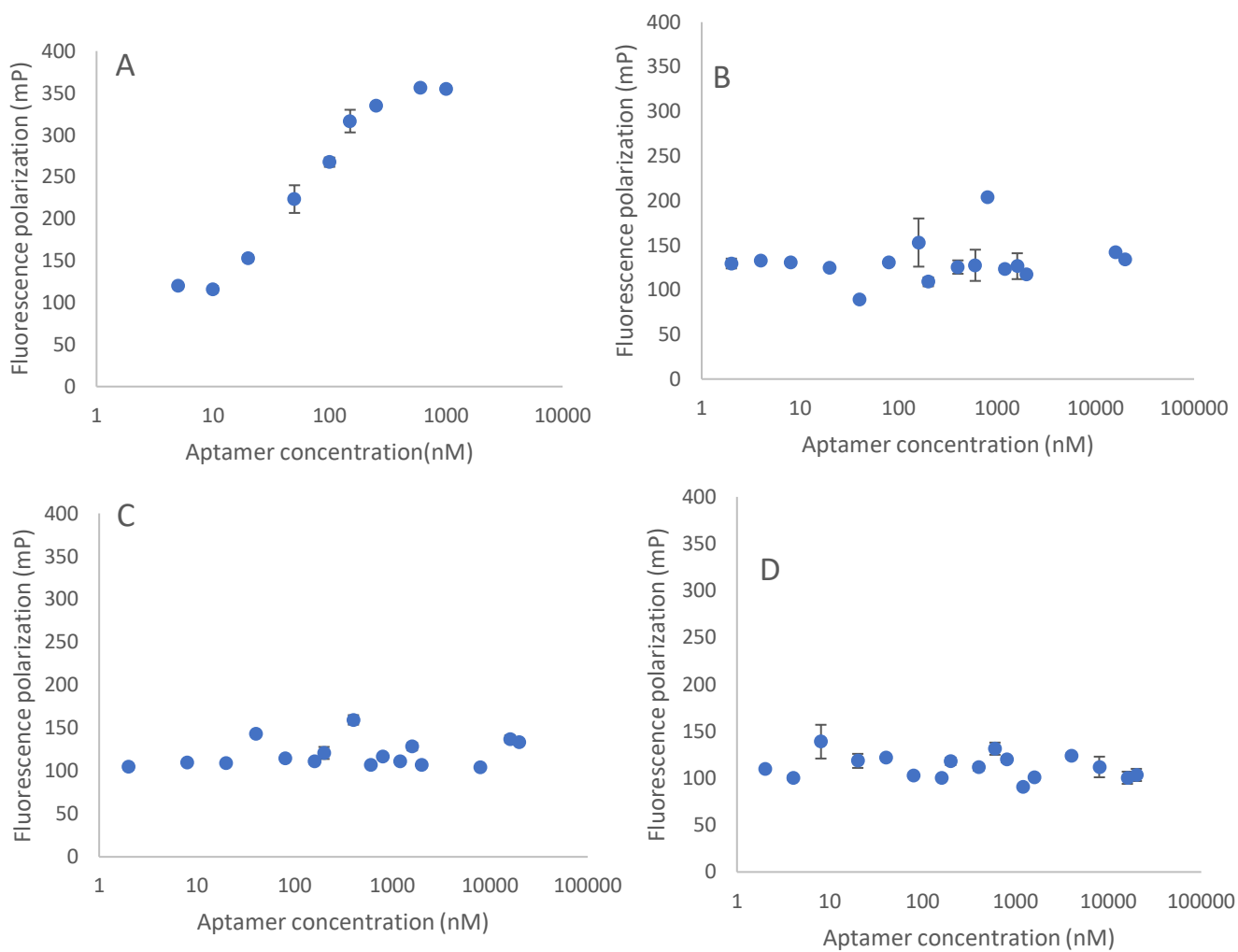
7.2 Αποτελέσματα Φθορισμομετρίας

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, κατά τη διάρκεια του πειράματος έγινε προσπάθεια εκτίμησης του βαθμού συγγένειας του απταμερούς με τον στόχο, εκτιμώντας τον συντελεστή διάστασης K_d . Η χρήση των τεχνικών FI και FP, στόχευε στην παρατήρηση μεταβολών του εγγενούς φθορισμού της οξυτετρακυκλίνης ύστερα από προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων απταμερούς. Από τα απταμερή που μελετήθηκαν, μόνο κατά την χρήση του OTC-APT5 παρατηρήθηκε αύξηση της έντασης φθορισμού (Σχήμα 29) και του φθορισμού πόλωσης (Σχήμα 30) και τελικά υπολογίσθηκε ο συντελεστής K_d (Σχήματα 31

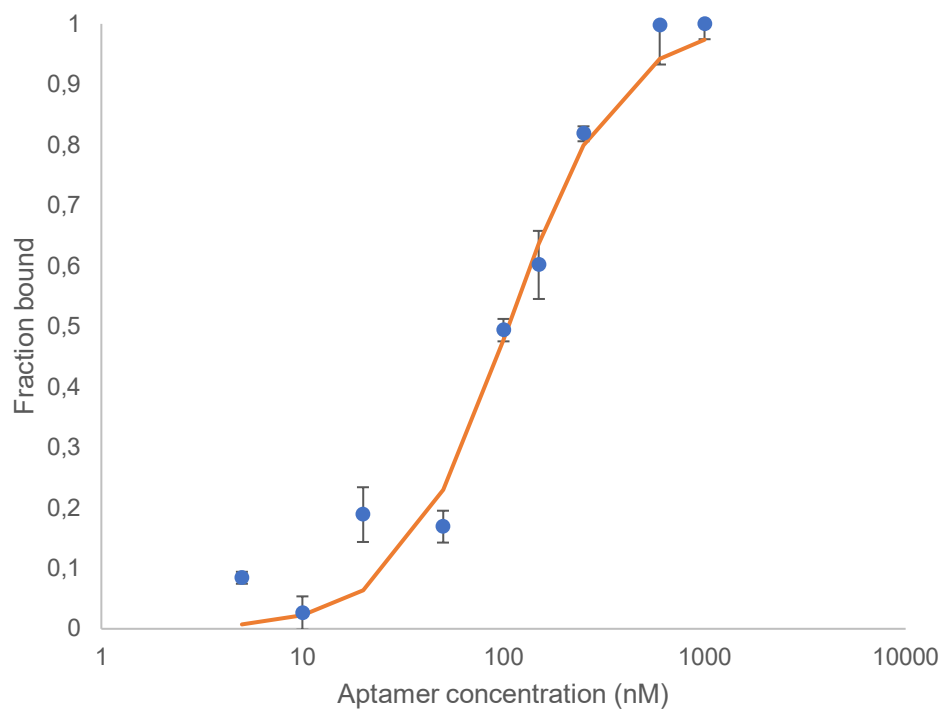
και 32). Σε κάθε άλλη περίπτωση δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές στον φθορισμό, γι' αυτό και κατέστη αδύνατος ο προσδιορισμός του Kd.



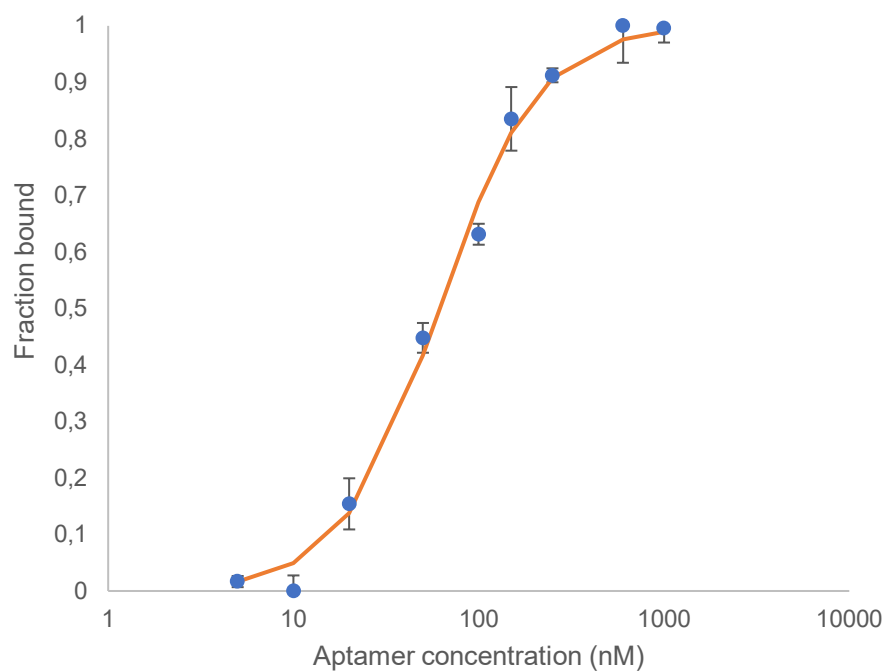
Σχήμα 29: Διάγραμμα έντασης φθορισμού (FI) της OTC παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων του απταμερούς A) OTC-APT5, B) OTC-APT1-71, C) OTC-APT6, D) OTC-APT2-40



Σχήμα 30: Διάγραμμα φθορισμού πόλωσης (FP) της OTC παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων του απταμερούς A) OTC-APT5, B) OTC-APT1-71, C) OTC-APT6, D) OTC-APT2-40



**Σχήμα 31: FI της OTC παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων OTC-APT5.
Kd=105.87nM**



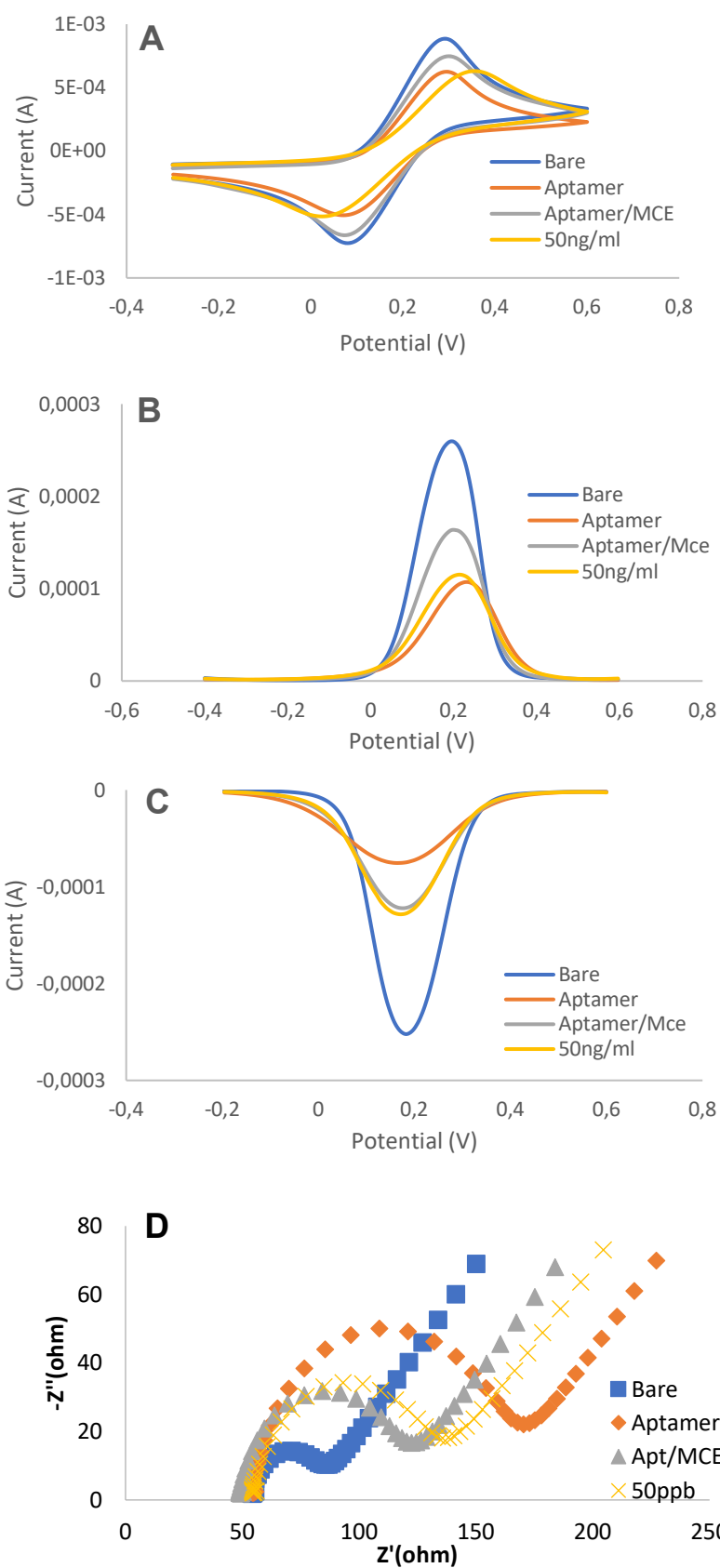
**Σχήμα 32: FP της OTC παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων OTC-APT5.
Kd=61.53nM**

7.3 Ηλεκτροχημικός Αισθητήρας για την ανίχνευση OTC

Ύστερα από την αξιολόγηση των απταμερών ως προς τη δομή και τον βαθμό συγγένειας με τον στόχο, μελετήθηκε τελικά η ανάπτυξη ηλεκτροχημικού βιοαισθητήρα με CV, DPV και EIS. Κατά την διαδικασία αυτή έγινε προσπάθεια βελτιστοποίησης διαφόρων πειραματικών παραμέτρων. Με βάση τα μέχρι τώρα αποτελέσματα η ανάπτυξη βιοαισθητήρα με χρήση MCE βασίστηκε στην ακινητοποίηση του απταμερούς OTC-APT5-Thio, ενώ με χρήση linker στην ακινητοποίηση του απταμερούς OTC-APT5-Amino. Τα δύο αυτά απταμερή λειτούργησαν ως στοιχείο βιοαναγνώρισης για την OTC.

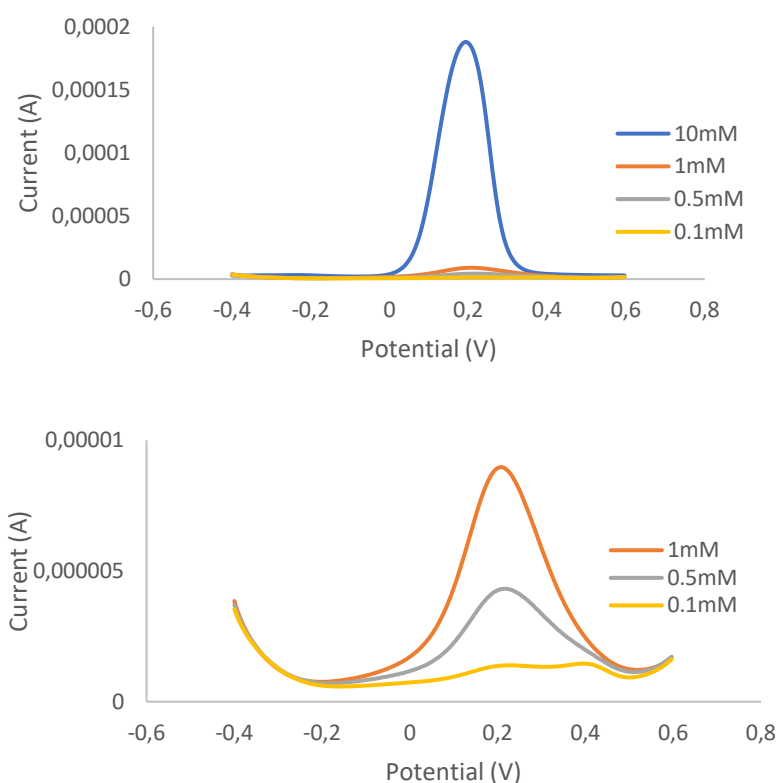
Πιο αναλυτικά, και σύμφωνα με το παρακάτω Σχήμα 33, κατά την ανάπτυξη αισθητήρα με χρήση CV και DPV παρατηρείται μείωση του σήματος κατά το στάδιο επώασης του απταμερούς, συγκριτικά με το σήμα στο στάδιο του μη τροποποιημένου ηλεκτροδίου (Bare), γεγονός που υποδηλώνει την επιτυχή ακινητοποίηση του απταμερούς στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Στην συνέχεια παρατηρείται μείωση του σήματος από το στάδιο επώασης MCE, στο τελικό στάδιο επώασης της OTC. Με αυτό τον τρόπο γίνεται αντιληπτή η πρόσδεση της OTC στο απταμερές.

Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνονται και με την χρήση της τεχνικής EIS, κατά την οποία διαπιστώνεται αύξηση του σήματος, δηλαδή της αντίστασης, σε κάθε ένα από τα στάδια.



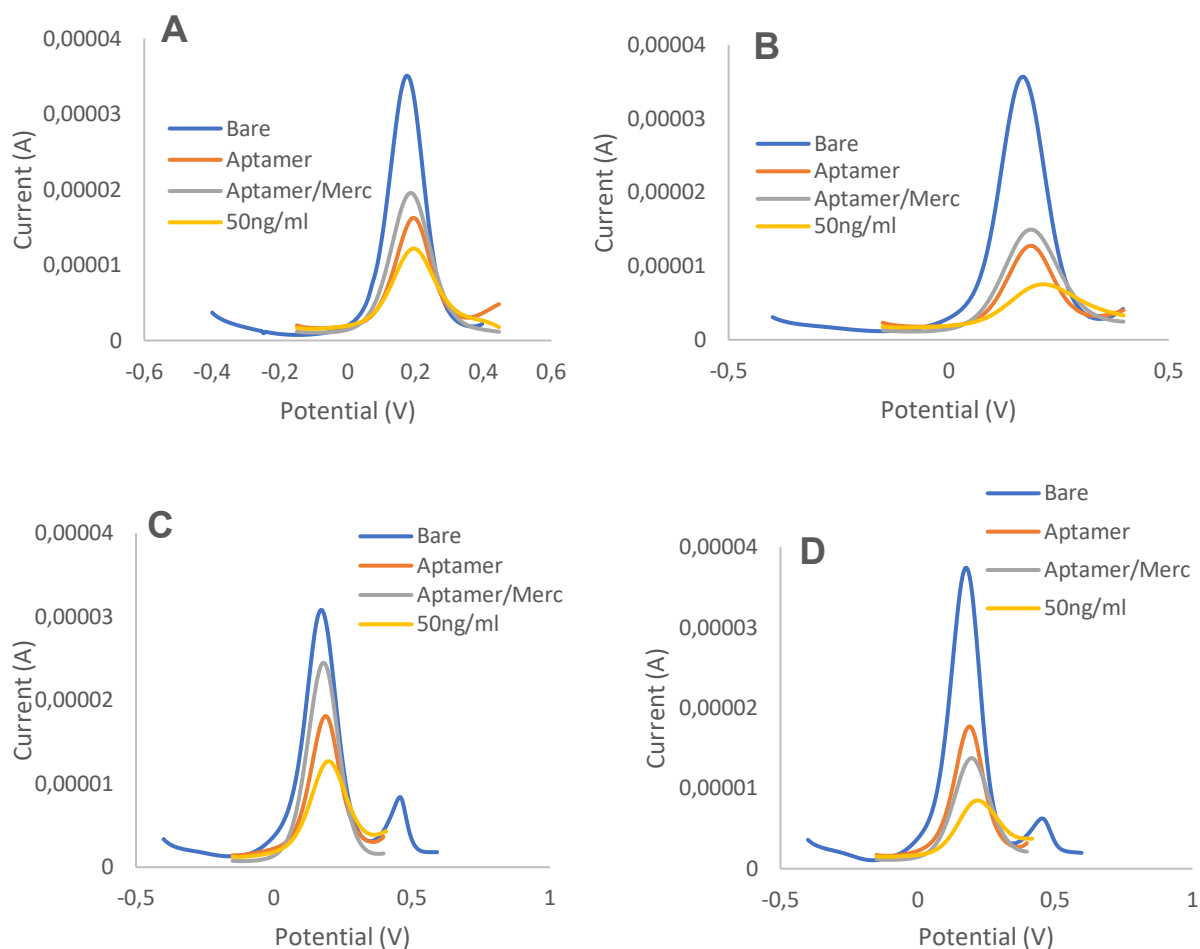
Σχήμα 33: Στάδια ανάπτυξης ηλεκτροχημικού αισθητήρα σε επιφάνεια Au-Sputtered ηλεκτροδίου για το απταμερές OTC-APT5-Thio με τεχνική A) CV, B) DPV οξείδωση, C) DPV αναγωγή, D) EIS

Στο πλαίσιο της πειραματικής διαδικασίας μελετήθηκε η συγκέντρωση του μετρούμενου διαλύματος Ferri/Ferro, όπως φαίνεται στο Σχήμα 34. Με βάση την ποσοτική διαφορά που προέκυψε στο ύψος των κορυφών μεταξύ των διαφορετικών συγκεντρώσεων χρησιμοποιήθηκε τελικά διάλυμα Ferri/Ferro συγκεντρώσεων 1mM και 10mM.



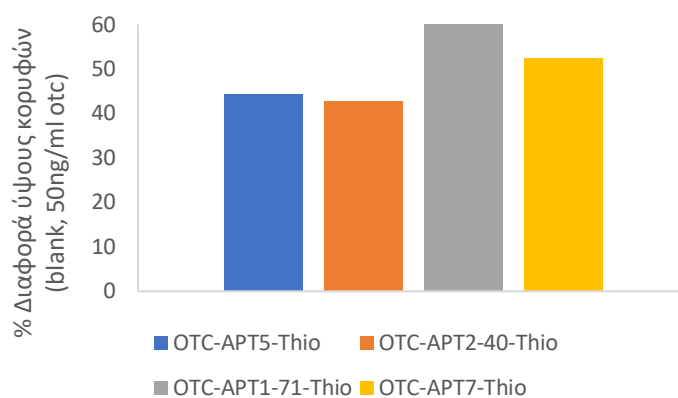
Σχήμα 34: Γραφήματα οξείδωσης DPV μη τροποποιημένου Au-Sputtered ηλεκτροδίου υπό διαφορετικές συγκεντρώσεις διαλύματος Ferri/Ferro

Στο Σχήμα 35, απεικονίζονται τα στάδια α) μη τροποποιημένου ηλεκτροδίου (bare), β) επώασης απταμερούς, γ) επώασης MCE και δ) επώασης OTC 50ng/ml για τέσσερα διαφορετικά απταμερή. Οι πειραματικές συνθήκες στην εν λόγω περίπτωση αφορούσαν διάλυμα Ferri/Ferro 1mM, Au-Sputtered ηλεκτρόδια, διάλυμα απταμερούς συγκέντρωσης 40uM, MCE 0.25mM, PBS 1X/1mM $MgCl_2$.



Σχήμα 35: Γραφήματα οξείδωσης DPV κατά την ανάπτυξη ηλεκτροχημικού αισθητήρα επί της επιφάνειας Au-Sputtered ηλεκτροδίου με ακινητοποίηση απταμερούς: A) OTC-APT5-Thio, B) OTC-APT2-40-Thio, C) OTC-APT1-71-Thio και D) OTC-APT7

Η διαφορά στο ύψος των κορυφών μεταξύ του σταδίου επώασης του απταμερούς και του σταδίου επώασης OTC 50ng/ml, παρουσιάζεται στο Σχήμα 36.

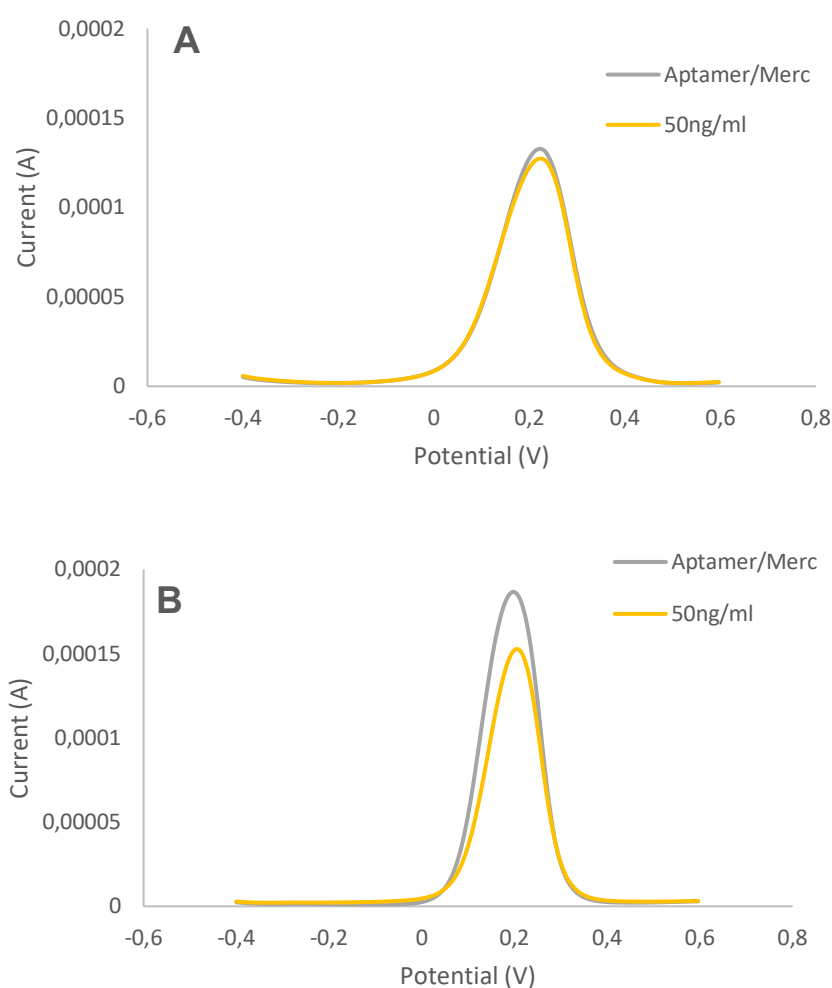


Σχήμα 36: Ανάπτυξη αισθητήρα για κάθε απταμερές

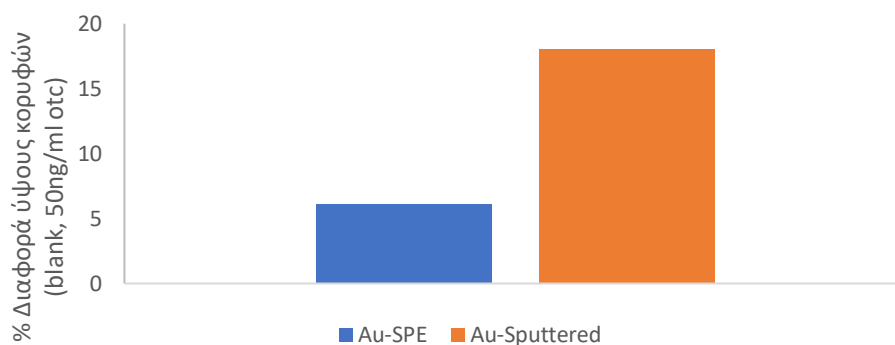
Οι υπόλοιπες πειραματικές παράμετροι που εξετάστηκαν και τα αποτελέσματα που προέκυψαν παρουσιάζονται στα παρακάτω διαγράμματα. Σημαντικό είναι να τονιστεί πως μεταξύ των διαγραμμάτων, η μελέτη γίνεται επί του σταδίου επώασης του απταμερούς και επί του σταδίου επώασης διαλύματος οξυτετρακυκλίνης (50ng/ml).

- Είδος ηλεκτροδίων Au

Στο παρών πείραμα (20μM OTC-APT5, TCEP, 1mM MCE, PBS 1X/1mM MgCl₂, Ferri/Ferro 10mM/ KCl 0.1M) μελετήθηκε η επίδραση του είδους του ηλεκτροδίου κατά την ακινητοποίηση του απταμερούς και κατά την επώαση διαλύματος OTC 50 ng/ml. Η διαφορά του ύψους των κορυφών οξείδωσης πριν και μετά την προσθήκη OTC σε κάθε ηλεκτρόδιο, φαίνονται πιο αναλυτικά στα Σχήματα 37 και 38. Προκύπτει λοιπόν το συμπέρασμα πως στην περίπτωση χρήσης “Sputtered” ηλεκτροδίου η μεταβολή είναι μεγαλύτερη.



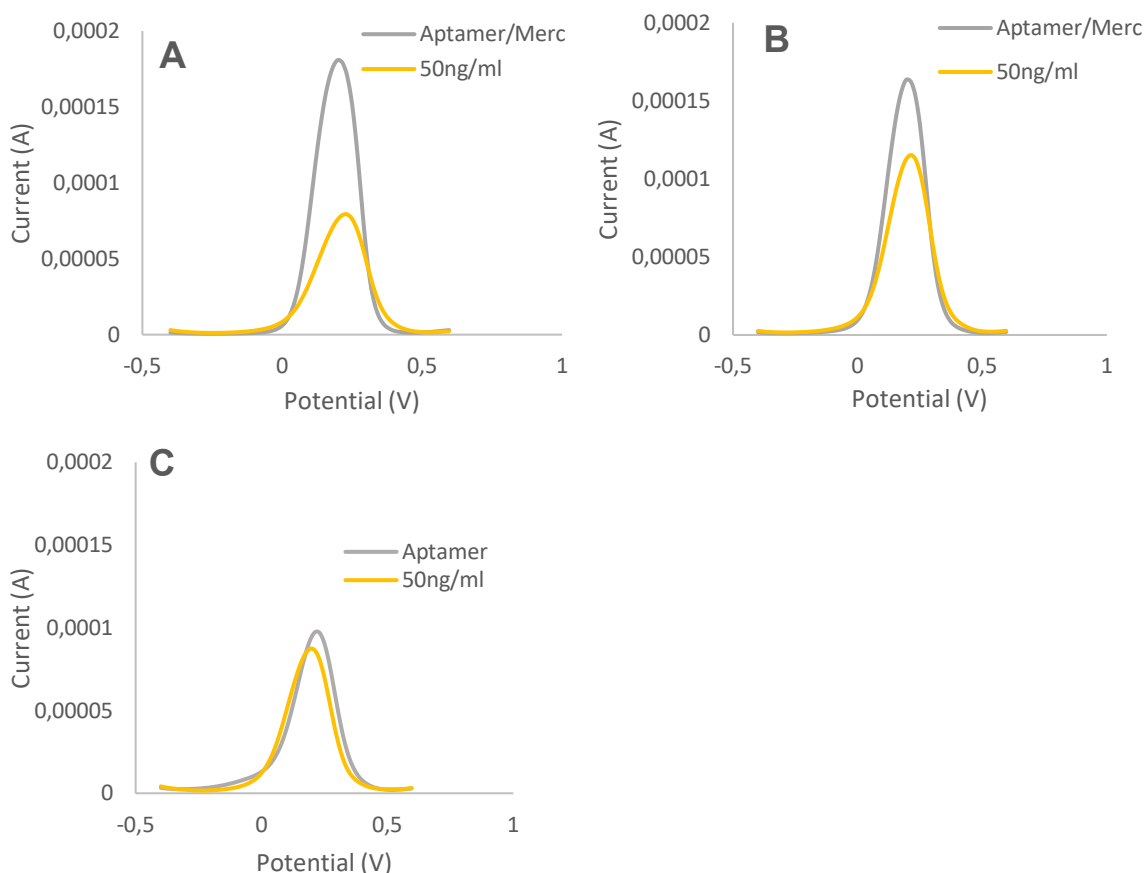
Σχήμα 37: Γραφήματα οξείδωσης DPV σε επιφάνεια ηλεκτροδίου: A)SPE, B) Sputtered



Σχήμα 38: Ανάπτυξη αισθητήρα σε ηλεκτρόδια A)SPE B) Sputtered

- MCE σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 39, μελετήθηκε η επίδραση της MCE στην ανάπτυξη του αισθητήρα κατά την χρήση PBS ως ρυθμιστικό διάλυμα. Οι υπόλοιπες συνθήκες του πειράματος ήταν οι εξής: Au-Sputtered ηλεκτρόδιο, 20μM OTC-APT5-Thio, TCEP, PBS 1X/1mM MgCl₂, Ferri/Ferro 10 mM/KCl 0.1M).



Σχήμα 39: Γραφήματα οξειδωσης DPV σε επιφάνεια Au-Sputtered ηλεκτροδίου με διάλυμα MCE: A)1mM, B) 0.25mM, C) απουσία MCE

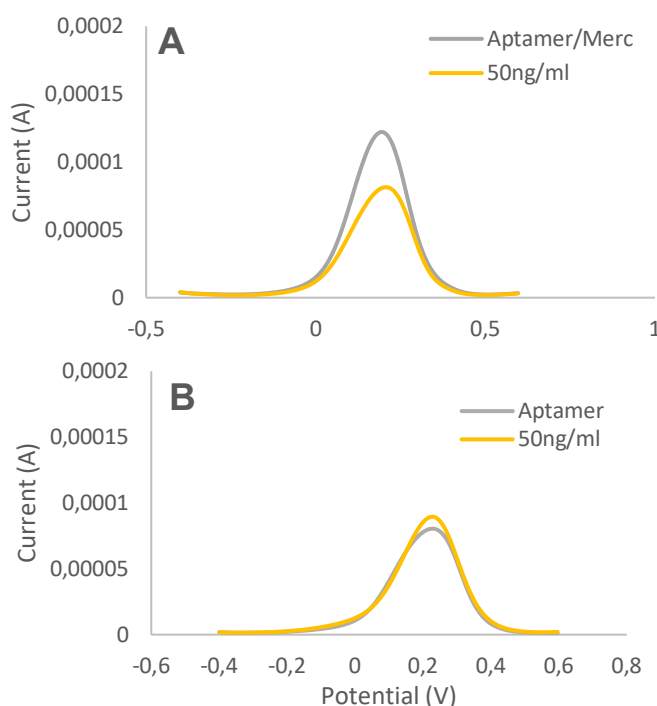
Σύμφωνα με τις διαφορές που προέκυψαν και οι οποίες φαίνονται στο Σχήμα 40, η MCE χρησιμοποιήθηκε σε διάλυμα συγκέντρωσης 1mM για την ανάπτυξη του αισθητήρα καθώς παρουσιάζει τη μεγαλύτερη διαφορά.



Σχήμα 40: Ανάπτυξη αισθητήρα υπό διαφορετικές συγκεντρώσεις διαλύματος MCE σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS

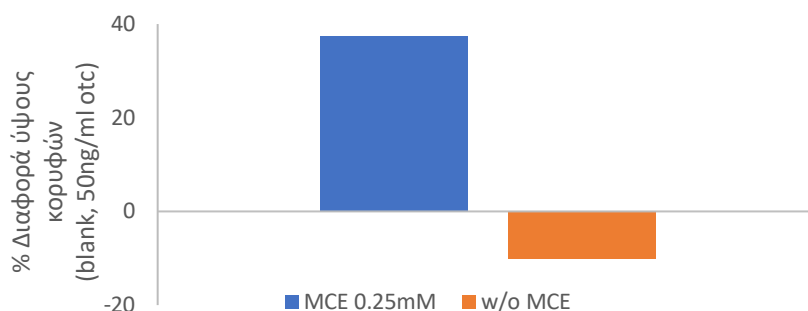
- MCE σε ρυθμιστικό διάλυμα TRIS

Η επίδραση της συγκέντρωσης διαλύματος MCE, ελέγχθηκε επιπλέον και σε ρυθμιστικό διάλυμα TRIS (Au-Sputtered ηλεκτρόδιο, 20μM OTC-APT5-Thio, TCEP, 20mM Tris/2mM $MgCl_2$ /100mM NaCl/ 5mM KCl/ 1mM $CaCl_2$, Ferri/Ferro 10 mM/KCl 0.1M). Τα επιμέρους αποτελέσματα φαίνονται στο Σχήμα 41.



Σχήμα 41: Γραφήματα οξειδωσης DPV σε επιφάνεια Au-Sputtered ηλεκτροδίου με διάλυμα MCE: A) 0.25mM, B) απουσία MCE

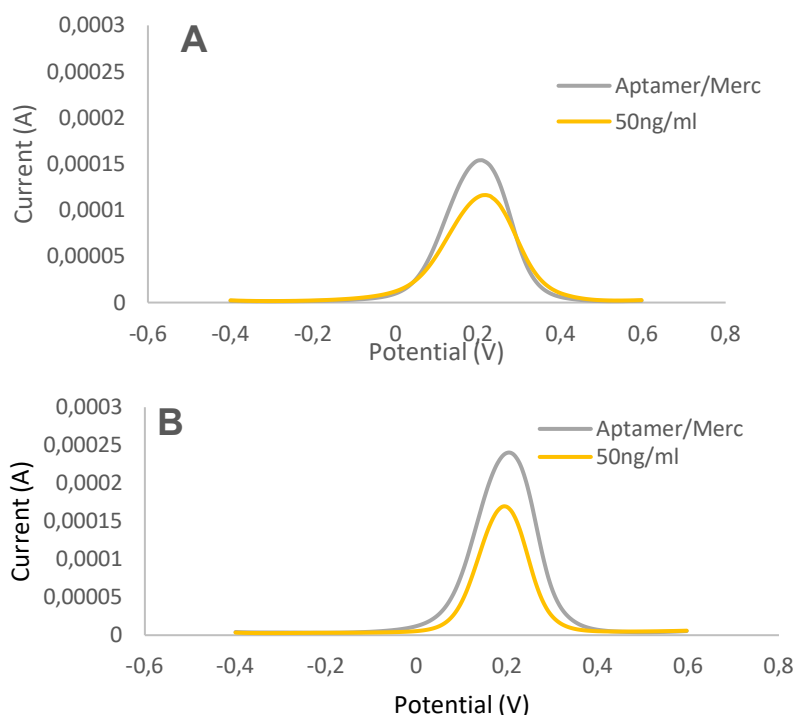
Με βάση το Σχήμα 42, γίνεται αντιληπτό πως και στην περίπτωση του TRIS ως ρυθμιστικό διάλυμα, η χρήση MCE ευνοεί την ανάπτυξη του αισθητήρα.



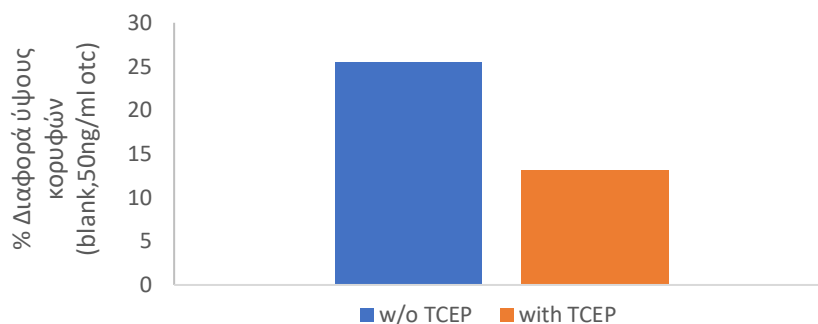
Σχήμα 42: Ανάπτυξη αισθητήρα υπό διαφορετικές συγκεντρώσεις διαλύματος MCE σε ρυθμιστικό διάλυμα TRIS

- Αναγωγικό αντιδραστήριο TCEP

Σε διαφορετικό πείραμα εξετάστηκε η χρήση αναγωγικού αντιδραστήριου TCEP στο διάλυμα του απταμερούς. Οι υπόλοιπες συνθήκες του πειράματος ήταν οι εξής: Au-Sputtered ηλεκτρόδιο, 20uM OTC-APT1-Thio, 0.25mM MCE, PBS 1X/1mM $MgCl_2$, Ferri/Ferro 10mM/KCl 0.1M. Τα αποτελέσματα της μελέτης φαίνονται στα Σχήματα 43 και 44. Κατά την πειραματική διαδικασία διαπιστώθηκε πως η χρήση αντιδραστήριου TCEP, δεν ενισχύει σημαντικά το αποτέλεσμα.



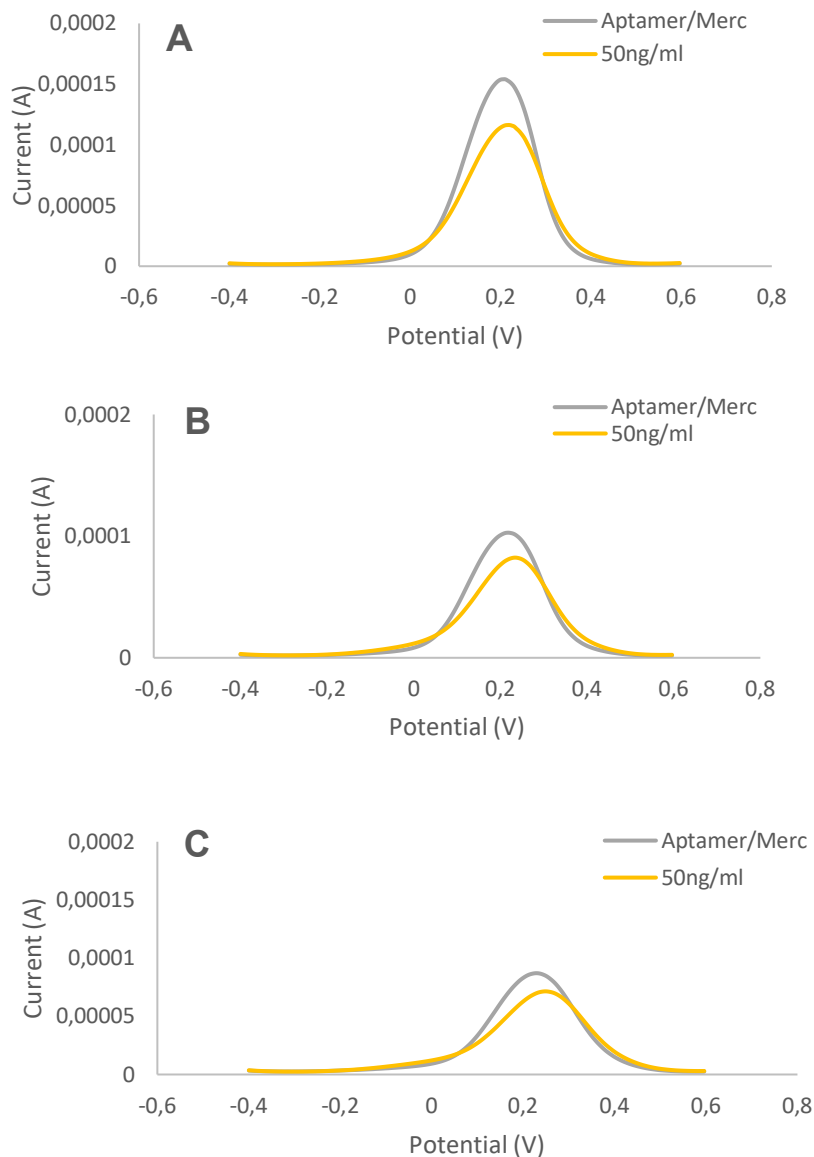
Σχήμα 43: Γραφήματα οξείδωσης DPV σε επιφάνεια Au-Sputtered ηλεκτροδίου: A) παρουσία και B) απουσία αναγωγικού διαλύματος TCEP



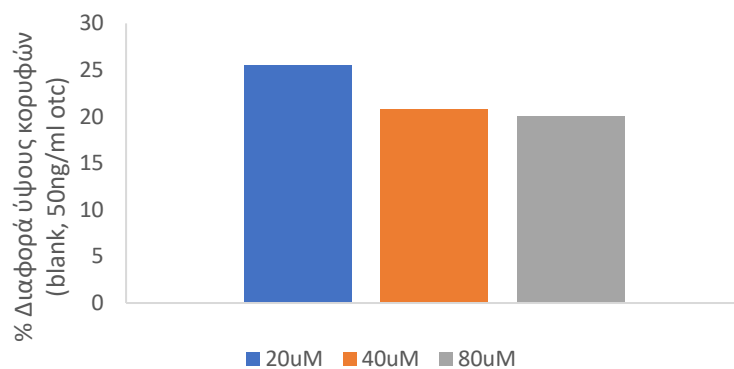
Σχήμα 44: Ανάπτυξη αισθητήρα παρουσία ή απουσία αναγωγικού διαλύματος TCEP

- Συγκεντρώσεις απταμερούς

Χρησιμοποιώντας τις ίδιες συνθήκες πειράματος και πιο αναλυτικά Au-Sputtered ηλεκτρόδιο, 20uM OTC-APT5-Thio, 0.25mM MCE, PBS 1X/1mM $MgCl_2$, Ferri/Ferro 10 mM/KCl 0.1M, μελετήθηκε η ανάπτυξη ηλεκτροχημικού αισθητήρα με στόχο την εύρεση της βέλτιστης συγκέντρωσης απταμερούς. Κατά αυτό τον τρόπο πραγματοποιήθηκαν δοκιμές με διαλύματα απταμερούς 20uM, 40uM και 80uM. Οι κορυφές οξείδωσης DPV που αφορούν σε επώαση των διαφορετικών συγκεντρώσεων απταμερούς και στη συνέχεια επώαση OTC 50 ng/ml παρουσιάζονται στο Σχήμα. 45. Σύμφωνα με το Σχήμα 46 η μεγαλύτερη διαφορά μεταξύ των δύο σταδίων αντιστοιχεί στην περίπτωση συγκέντρωσης 20uM, ενώ η μικρότερη στα 80uM.



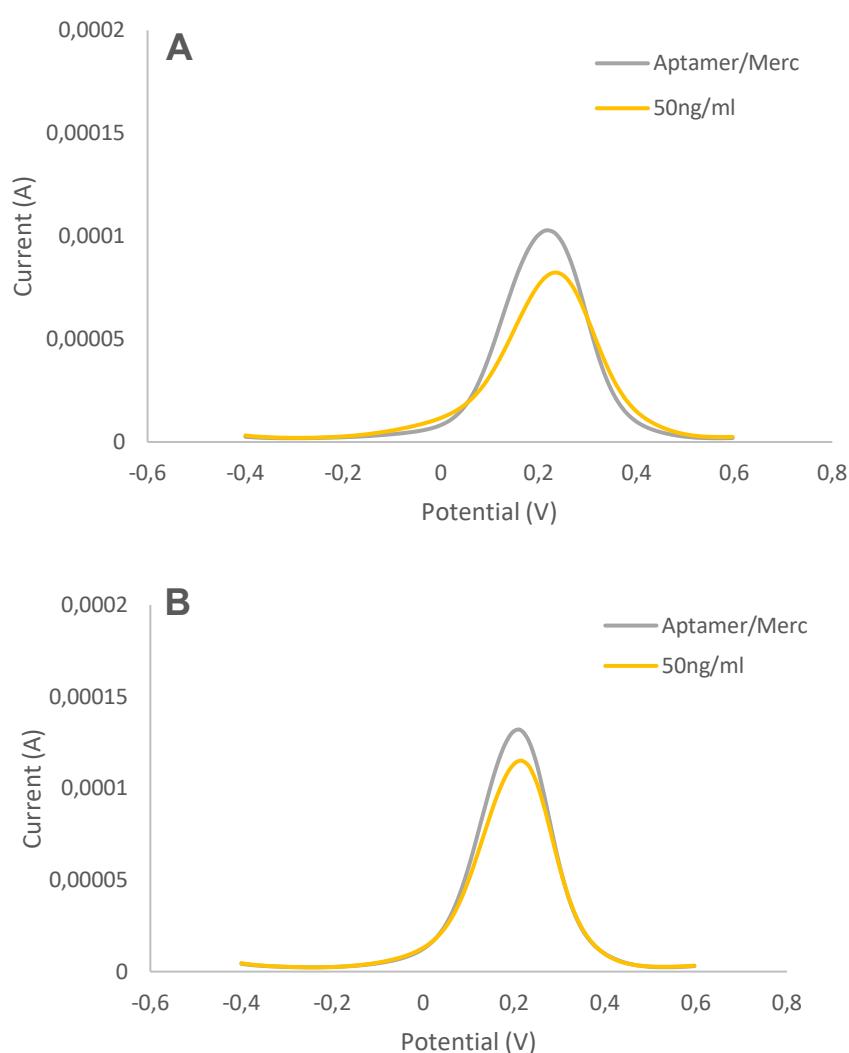
Σχήμα 45: Γραφήματα οξείδωσης DPV σε επιφάνεια Au-Sputtered ηλεκτροδίου με επώαση διαλύματος απταμερούς OTC-APT5-Thio: A) 20uM, B) 40uM και C) 80uM



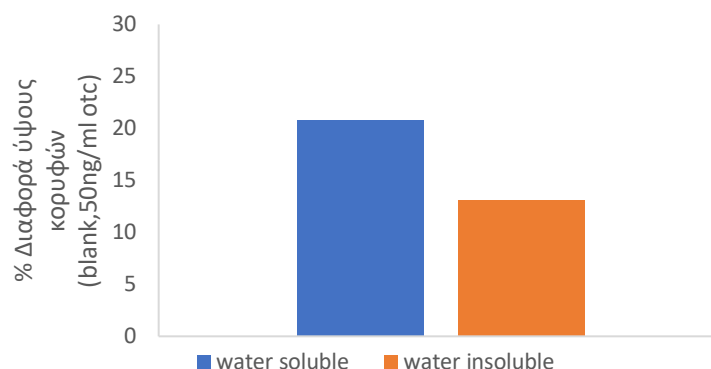
Σχήμα 46: Ανάπτυξη αισθητήρα με χρήση διαφορετικών συγκεντρώσεων του απταμερούς OTC-APT5-Thio

- Οξυτετρακυκλίνη (OTC)

Τελική παράμετρος που ελέγχθηκε στο παρόν πείραμα αφορά το είδος της OTC ως προς την ιδιότητά της να διαλύεται στο νερό. Για τον έλεγχο του είδους της OTC, οι υπόλοιπες πειραματικές συνθήκες ήταν οι εξής: Au-Sputtered ηλεκτρόδιο, 40 μ M OTC-APT1-Thio, 0.25mM MCE, PBS 1X/1mM MgCl₂, Ferri/Ferro 10 mM/KCl 0.1M. Έτσι προέκυψε το Σχήμα 47. Με βάση το Σχήμα 48, είναι εμφανές πως η χρήση υδατοδιαλυτής OTC είναι πιο αποδοτική.



Σχήμα 47: Γραφήματα οξείδωσης DPV σε επιφάνεια Au-Sputtered ηλεκτροδίου με χρήση OTC: A) υδατοδιαλυτής, B) μη υδατοδιαλυτής



Σχήμα 48: Ανάπτυξη αισθητήρα με χρήση διαλύματος OTC που διαφοροποιείται ως προς την ιδιότητα της να διαλύεται στο νερό

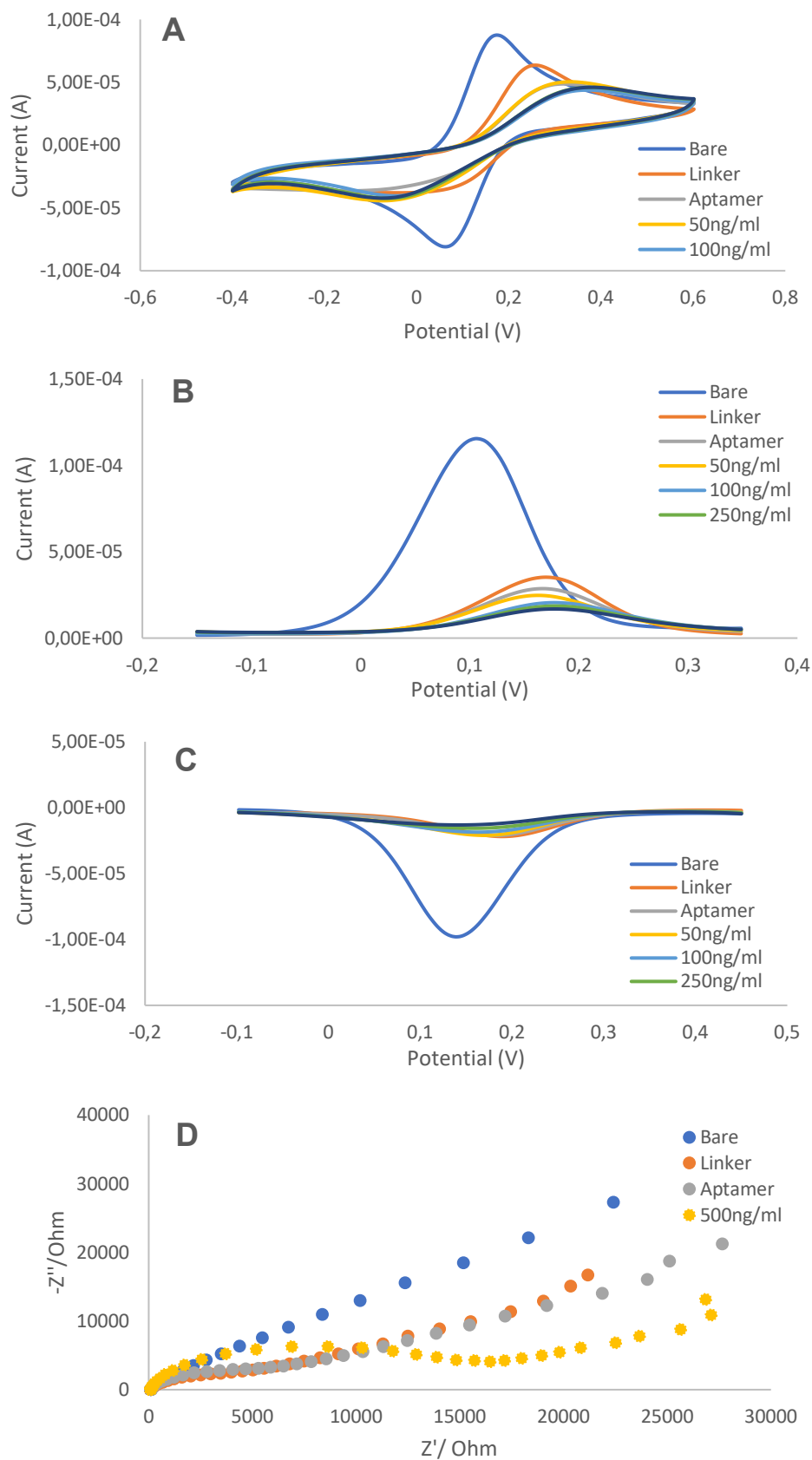
Κατά αυτό τον τρόπο ολοκληρώθηκε ο έλεγχος των κυριότερων διαφορετικών πειραματικών παραμέτρων.

Σε συνέχεια όλων των προηγούμενων πειραμάτων, μελετήθηκε επιπλέον, η χρήση μορίου-συνδέτη (linker) για την ενίσχυση του σταδίου ακινητοποίησης του απταμερούς. Έτσι, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η σύνδεση του απταμερούς OTC-APT5 με το linker, το πρώτο τροποποιήθηκε με προσθήκη αμινομάδας στο 3' άκρο (OTC-APT5-Amino).

Στα αρχικά πειράματα η ανίχνευση διαφορετικών συγκεντρώσεων OTC πραγματοποιήθηκε σε διάλυμα PBS 10mM με $MgCl_2$ 1mM. Οι υπόλοιπες συνθήκες μέτρησης αφορούν επώαση μορίου-linker 2mM για περίπου 12ώρες στους 4°C, ακινητοποίηση απταμερούς OTC-APT5-Amino σε συγκέντρωση 40uM για 2,5 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, και διάλυμα Ferri/Ferro 1mM με KCl 0.1mM.

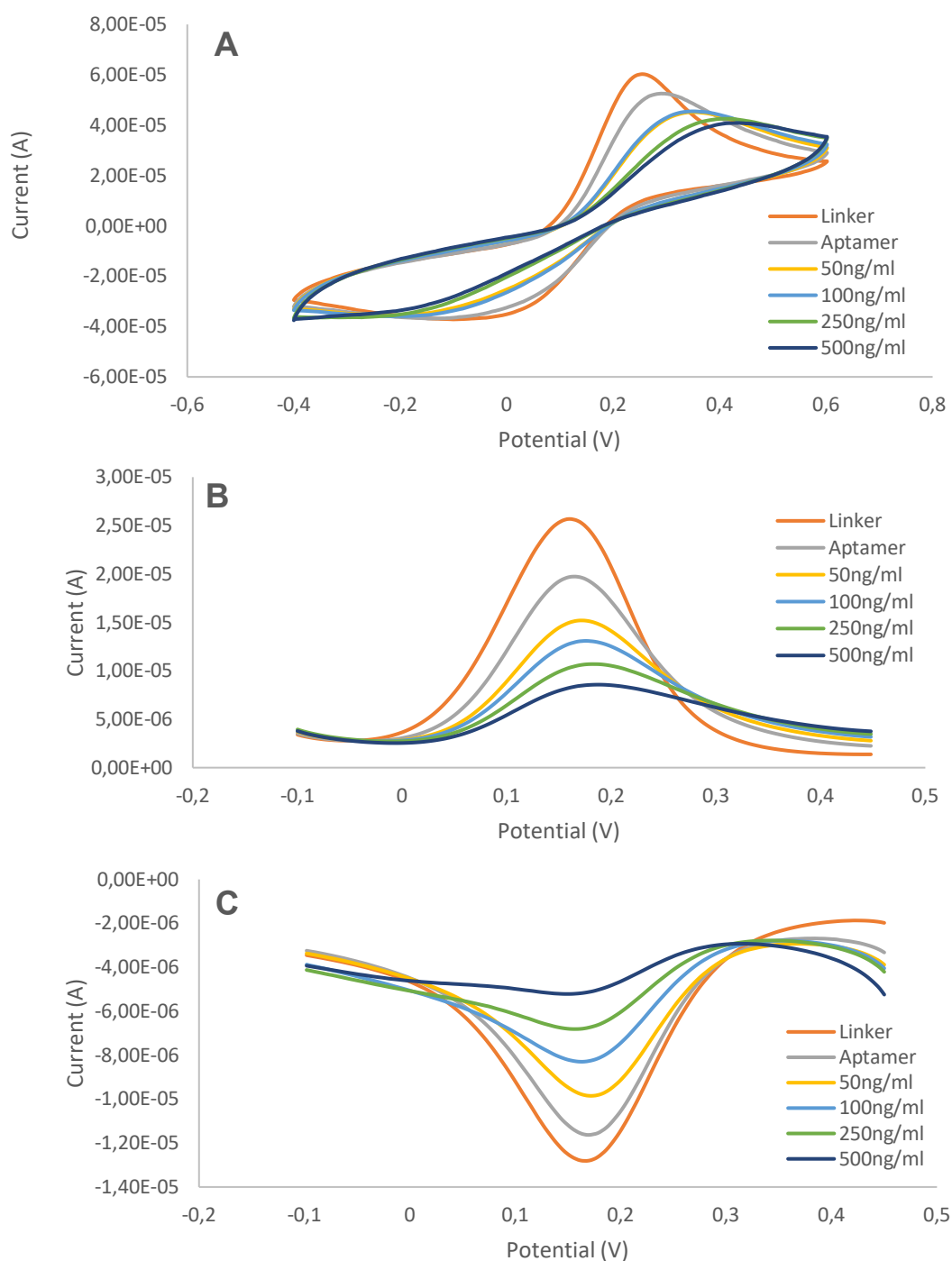
Τα αποτελέσματα τα οποία αναπαρίστανται στο κάτωθι Σχήμα 49, φανερώνουν πτώση του σήματος για κάθε επιμέρους στάδιο, όσον αφορά τις τεχνικές CV και DPV.

Πιο αναλυτικά, η αρχική πτώση του σήματος κατά τα στάδια επώασης του linker και του απταμερούς υποδηλώνει την επιτυχή ακινητοποίηση τους στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Στη συνέχεια η μείωση του σήματος κατά την επώαση αυξανόμενων συγκεντρώσεων OTC υποδηλώνει τη δέσμευση αυτής από τα απταμερή και κατ' επέκταση την ανίχνευσή της. Για τον ίδιο λόγο παρατηρείται και αύξηση της αντίστασης στο διάγραμμα της EIS.



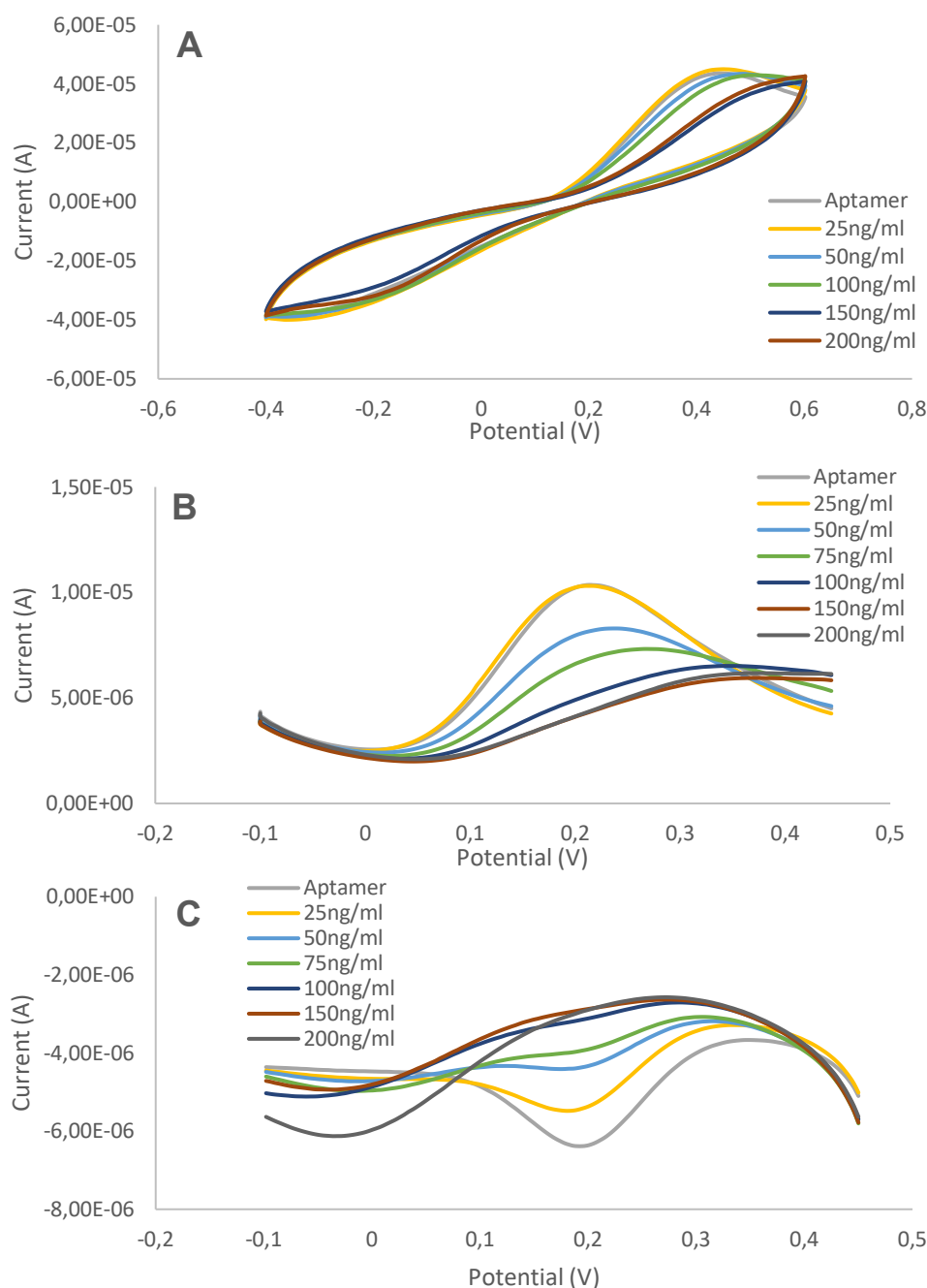
Σχήμα 49: Στάδια ανάπτυξης ηλεκτροχημικού αισθητήρα σε επιφάνεια Au-Sputtered ηλεκτροδίου με χρήση μορίου-συνδέτη για διαφορετικές συγκεντρώσεις OTC συμφωνά με τις τεχνικές A) CV, B) DPV οξείδωση, C) DPV αναγωγή και D) EIS

Σημαντικό είναι να τονιστεί πως στα πλαίσια ελέγχου επίδρασης του χρόνου επώασης του linker επί της ανάπτυξης του αισθητήρα, επιλέχθηκαν τελικά οι 2 ώρες ως επαρκής χρόνος για την απόδοση σήματος, όπως φαίνεται στο Σχήμα 50.

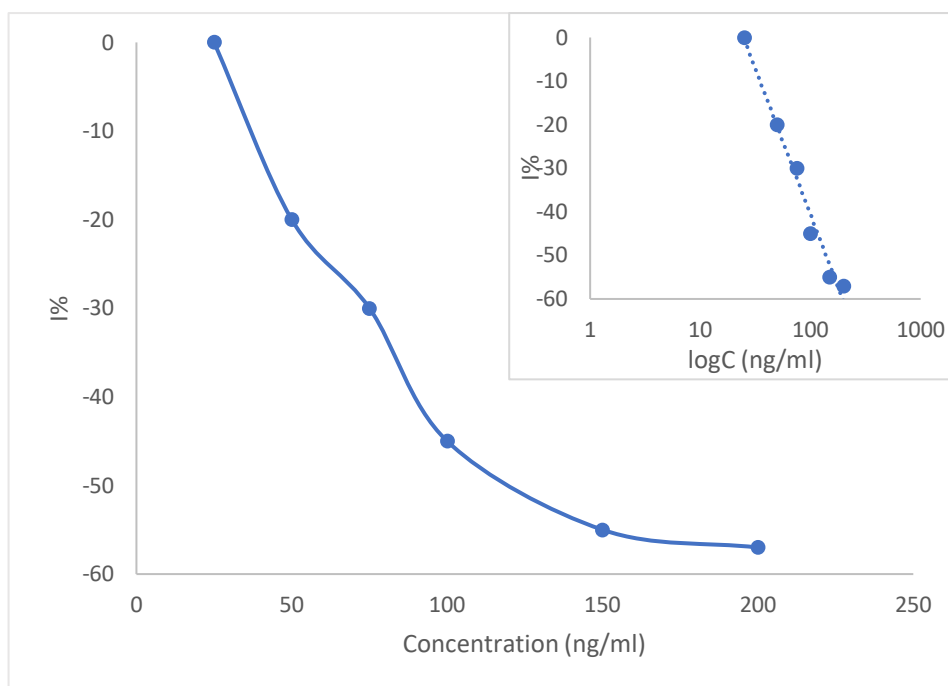


Σχήμα 50: Γραφήματα A) CV, B) οξειδωσης DPV και C) αναγωγής DPV κατά την ανάπτυξη ηλεκτροχημικού αισθητήρα επί της επιφάνειας Au-Sputtered ηλεκτροδίου με επώαση linker για 2 ώρες

Κατά παρόμοιο τρόπο και με τις πειραματικές συνθήκες να παραμένουν οι ίδιες, χρησιμοποιήθηκαν ως βαθμονομητές διαλύματα OTC συγκέντρωσης 25, 50, 75, 100, 150, 200ng/ml. Όπως φαίνεται στα διαγράμματα του Σχήματος 51, με την αύξηση της συγκέντρωσης OTC, μειώνεται σταδιακά το ύψος της αντίστοιχης κορυφής. Ωστόσο στην περίπτωση επώασης διαλύματος OTC 25ng/ml δεν παρατηρείται πτώση, γεγονός που υποδηλώνει την αδυναμία ανίχνευσης OTC σε συγκεντρώσεις μικρότερες από 50ng/ml.

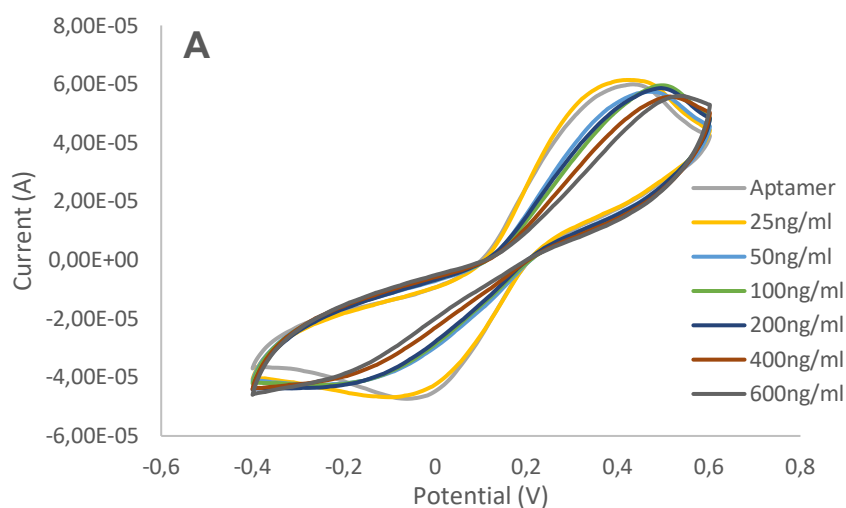


Σχήμα 51: Γραφήματα A) CV, B) οξείδωσης DPV και C) αναγωγής DPV κατά την ανάπτυξη ηλεκτροχημικού αισθητήρα επί της επιφάνειας Au-Sputtered ηλεκτροδίου για διαφορετικά διαλύματα OTC

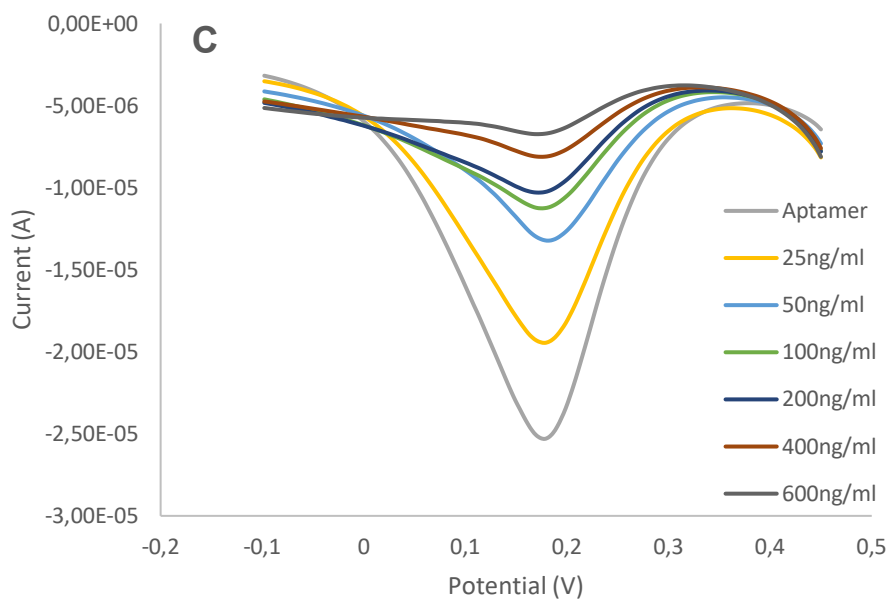
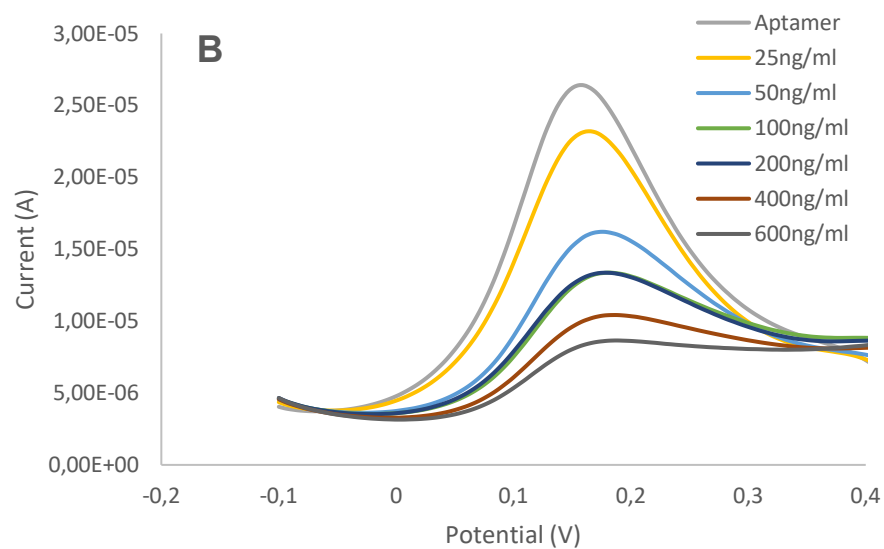


Σχήμα 52: Καμπύλη αναφοράς για διαλύματα OTC συγκέντρωσης 25, 50, 75, 100, 150, 200ng/ml

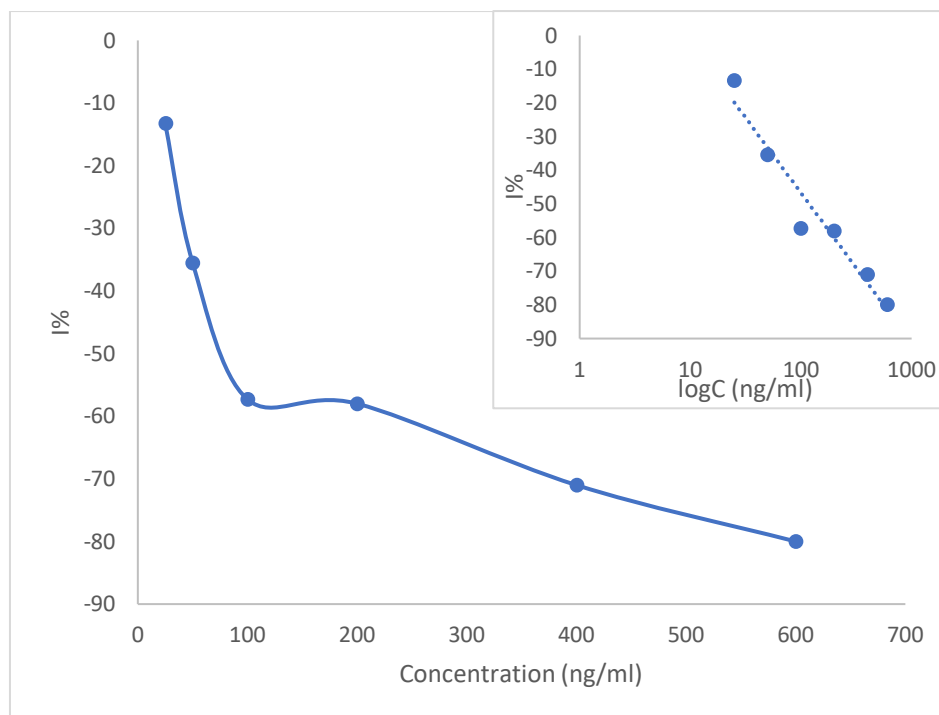
Επιπλέον, μελετήθηκε ο ηλεκτροχημικός αισθητήρας όσο αφορά την ανίχνευση μεγαλύτερων συγκεντρώσεων OTC και πιο συγκεκριμένα 25, 50, 100, 200, 400, 600ng/ml, όπως φαίνεται στα Σχήματα 53 και 54.



Σχήμα 53A: Γράφημα CV κατά την ανάπτυξη ηλεκτροχημικού αισθητήρα επί της επιφάνειας Au-Sputtered ηλεκτροδίου για διαφορετικά διαλύματα OTC

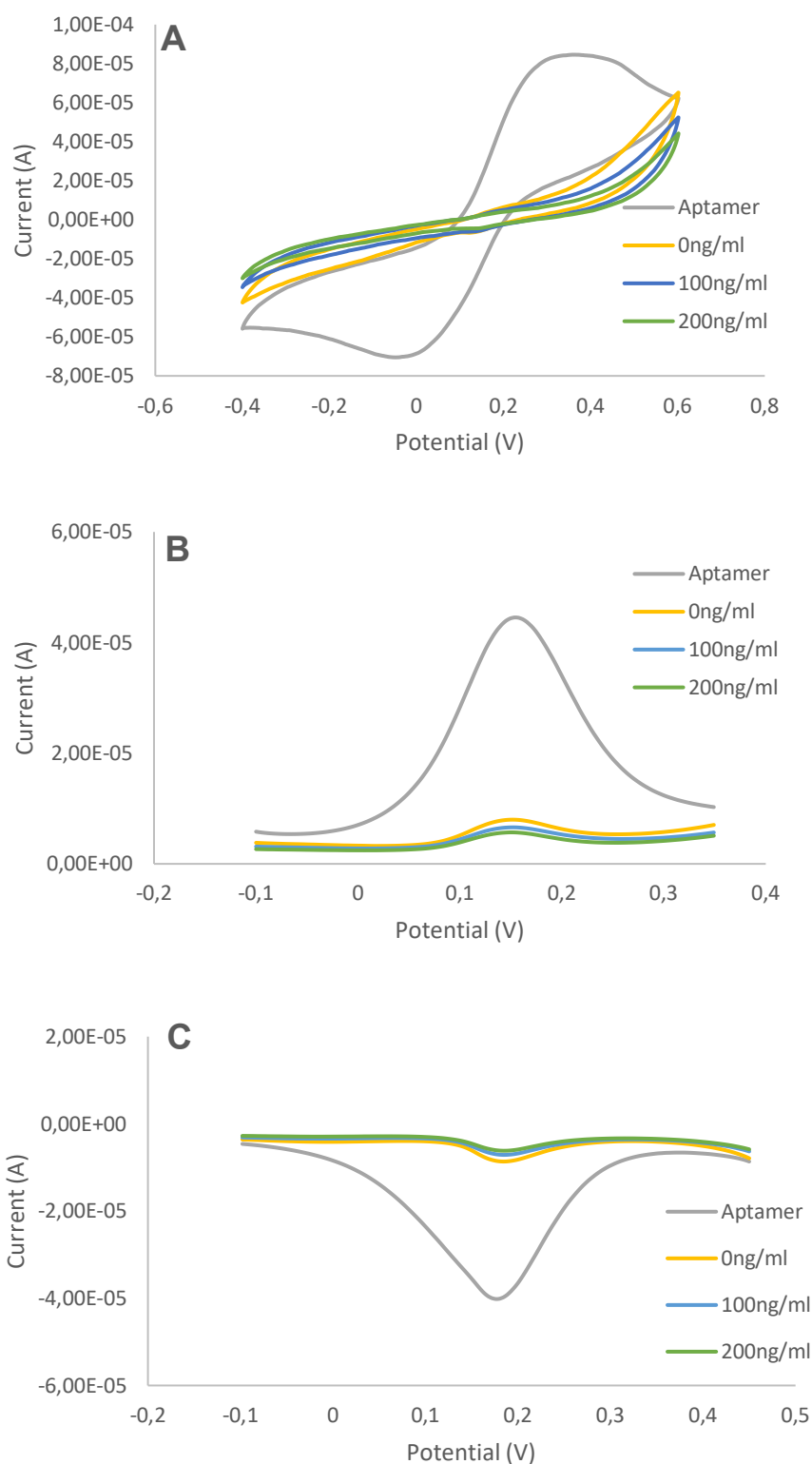


Σχήμα 53B: Γραφήματα Β) οξείδωσης DPV και C) αναγωγής DPV κατά την ανάπτυξη ηλεκτροχημικού αισθητήρα επί της επιφάνειας Au-Sputtered ηλεκτροδίου για διαφορετικά διαλύματα OTC

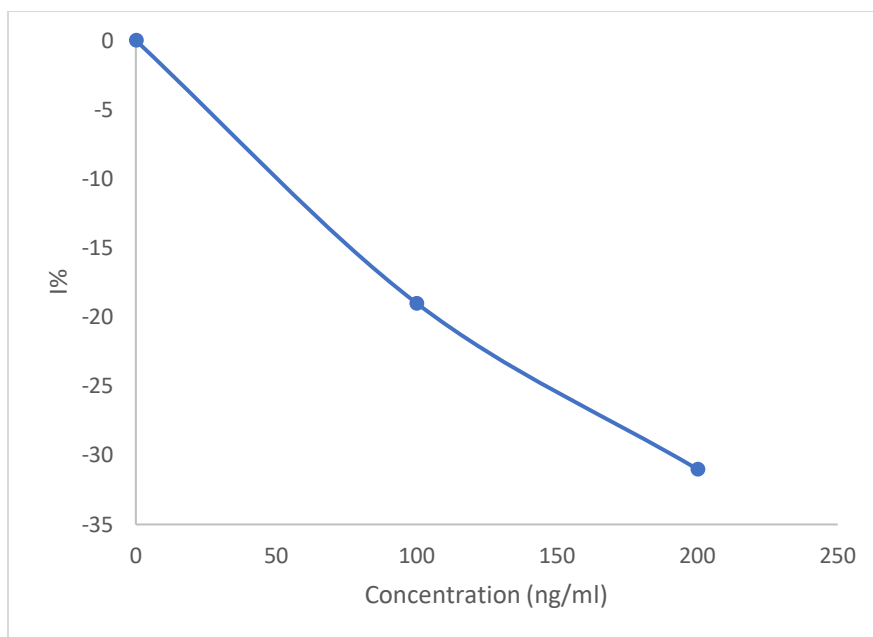


Σχήμα 54: Καμπύλη αναφοράς για διαλύματα OTC συγκέντρωσης 25, 50, 100, 200, 400, 600ng/ml

Το τελευταίο στάδιο της πειραματικής μελέτης αφορά δοκιμή ανίχνευσης OTC σε διάλυμα γάλακτος συγκέντρωσης 1:10 (0.01g σκόνη γάλακτος σε 10ml PB 10mM / $MgCl_2$ 1mM), με την χρήση ηλεκτροχημικού αισθητήρα. Οι υπόλοιπες συνθήκες παρέμειναν ως εξής: επώαση linker 2mM για 2 ώρες στους 4°C, επώαση απταμερούς OTC-APT5-Amino 40uM για 2,5 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, διάλυμα Ferri/Ferro 1mM με KCl 0.1M. Σύμφωνα με τα κάτωθι διαγράμματα του Σχήματος 55, παρατηρήθηκε και πάλι πτώση του σήματος κατά την επώαση OTC. Συνεπώς, το αντιβιοτικό είναι δυνατόν να ανιχνευθεί και στο γάλα, χωρίς όμως να προκύπτουν σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των επιμέρους συγκεντρώσεων.



Σχήμα 55: Γράφημα A) CV, B) οξειδωσης DPV και C) αναγωγής DPV κατά τα στάδια επώασης OTC-APT5-Amino 40μM και επώασης OTC 0ng/ml, 100ng/ml, 200ng/ml σε γάλα επί της επιφάνειας Au-Sputtered ηλεκτροδίου



Σχήμα 56: Καμπύλη αναφοράς για διαλύματα OTC συγκέντρωσης 0, 100, 200 ng/ml σε γάλα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8 – ΕΠΙΛΟΓΟΣ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Κατά την παρούσα διπλωματική μελέτη που είχε ως στόχο την ανάπτυξη ηλεκτροχημικού αισθητήρα για την ανίχνευση του αντιβιοτικού οξυτετρακυκλίνη έγινε εκτεταμένη προσπάθεια εύρεσης των βέλτιστων πειραματικών συνθηκών κατά την διάρκεια όλων των δοκιμασιών. Όπως προκύπτει από τα διαφορετικά πειραματικά δεδομένα καθίσταται δύσκολη η διεξαγωγή ενός ασφαλούς συμπεράσματος.

Πιο αναλυτικά, από τις μετρήσεις κυκλικού διχρωισμού μπορεί να θεωρηθεί δεδομένο πως πρόκειται για μία μέθοδο εξαιρετικά υψηλής ευαισθησίας που επηρεάζεται από τους διαφορετικούς πειραματικούς παράγοντες. Έτσι υπάρχει δυσκολία αναγνώρισης σαφούς δομής για τα απταμερή. Επιπλέον, η χρήση της μεθόδου για τον υπολογισμό του συντελεστή διάστασης στην συγκεκριμένη περίπτωση δεν έχει ακόμα εξακριβωθεί.

Κατά την διεξαγωγή πειραμάτων φθορισμού παρατηρήθηκε σαφής διαφορά μεταξύ των απταμερών και τελικά κατέστη δυνατός ο υπολογισμός του συντελεστή διάστασης για το απταμερές OTC-APT5.

Τέλος, κατά την ανάπτυξη του αισθητήρα έγινε και πάλι προσπάθεια βελτιστοποίησης των πειραματικών παραμέτρων. Σε κάθε περίπτωση παρατηρήθηκε μείωση ιδιαίτερα της οξειδωτικής κορυφής DPV κατά την επώαση της OTC. Κάτι τέτοιο μπορεί να οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι είναι δυνατή η δέσμευση της από τα απταμερή και πιο συγκεκριμένα το OTC-APT5 και συνεπώς η ανίχνευση της από τον αισθητήρα.

Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί πως στην περίπτωση χρήσης μορίου-συνδέτη για την ακινητοποίηση του απταμερούς στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου, ο αισθητήρας φαίνεται να λειτουργεί αποδοτικότερα.

Βάση όλων των παραπάνω, καθίσταται σαφές πως περαιτέρω έρευνα με έμφαση στην βελτιστοποίηση των συνθηκών δέσμευσης του απταμερούς με το αντιβιοτικό OTC μπορεί να οδηγήσει την επιστημονική κοινότητα σε ακόμα πιο ακριβή και εμπειρισταωμένα συμπεράσματα.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

Ακρωνύμια και ανάπτυξή τους

OTC	Oxytetracycline
CD	Circular Dichroism
FP	Fluorescence Polarization
CV	Cyclic Voltammetry
DPV	Differential Pulse Voltammetry
EIS	Electrochemical Impedance Spectroscopy
LLE	Liquid-Liquid Extraction
SPE	Solid Phase Extraction
ASE	Accelerated Solvent Extraction
TLC	Thin Layer Chromatography
LC	Liquid Chromatography
GC	Gas Chromatography
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
LC-MS	Liquid Chromatography–Mass Spectrometry
MRL	Maximum Residue Level
FAO	Food and Agriculture Organization
WHO	World Health Organization
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
SELEX	Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment
DNA	Deoxyribonucleic Acid
RNA	Ribonucleic Acid
K _d	Dissociation Constant
PCR	Polymerase Chain Reaction
FI	Fluorescence Intensity
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
HPLC	High Liquid Chromatography
CE	Capillary Electrophoresis
SPR	Surface Plasmon Resonance
QCM	Quartz Crystal Microbalance
ITC	Isothermal Titration Calorimetry

FA	Fluorescence Anisotropy
FAM	Carboxyfluorescein
OTA	Ochratoxin A
ACV	Anodic Stripping Voltammetry
LSV	Linear Sweep Voltammetry
ASW	Anodic Stripping Voltammetry
CSW	Cathodic Stripping Voltammetry
SWV	Square Wave Voltammetry
AC	Alternating Current
AuPNs	Gold Nanoparticles
PBS	Phosphate-Buffered Saline
SPE	Screen Printed Electrodes
MCE	Mercaptoethanol
ΕΚΠΑ	Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Food, I. (1999). The use of drugs in food animals benefits and risks. Washington, D.C.: National Academy Press
2. Beyene, T. (2015). Veterinary Drug Residues in Food-animal Products: Its Risk Factors and Potential Effects on Public Health. *Journal of Veterinary Science & Technology*, 07(01). doi:<https://doi.org/10.4172/2157-7579.1000285>.
3. Rana, M.S., Lee, S.Y., Kang, H.J. and Hur, S.J. (2019). Reducing Veterinary Drug Residues in Animal Products: A Review. *Food Science of Animal Resources* , 39. doi:<https://doi.org/10.5851/kosfa.2019.e65>.
4. Wang, B., Xie, K. and Lee, K. (2021). Veterinary Drug Residues in Animal-Derived Foods: Sample Preparation and Analytical Methods. *Foods*, 10(555). doi:<https://doi.org/10.3390/foods10030555>.
5. Getahun, M., Abebe, R.B., Sendekie, A.K., Woldeyohanins, A.E. and Kasahun, A.E. (2023). Evaluation of Antibiotics Residues in Milk and Meat Using Different Analytical Methods. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2023, pp.1–13. doi:<https://doi.org/10.1155/2023/4380261>.
6. World Health Organization (2023). Food Safety. [online] www.who.int. Available at: https://www.who.int/health-topics/food-safety#tab=tab_1
7. Europa.eu. (2024). *Κανονισμός - 178/2002 - EN - EUR-Lex*. [online] Available at: <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2002/178/oj/ell> [Accessed 16 Sep. 2024].
8. Singh, R.L. and Mondal, S. (2019). *Food Safety and Human Health*. Academic Press.
9. Ειδική έκθεση. (2019). Available at: https://www.eca.europa.eu/Lists/ECADocuments/SR19_02/SR_FOOD_SAFETY_EL.pdf [Accessed 16 Sep. 2024].

10. ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΟΚ) αριθ. 2377/90 ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ Της 26ης Ιουνίου 1990 για τη θέσπιση κοινοτικής διαδικασίας για τον καθορισμό ανώτατων ορίων καταλοίπων κτηνιατρικών φαρμάκων στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης
11. Bacanlı, M. and Başaran, N. (2019). Importance of antibiotic residues in animal food. *Food and Chemical Toxicology*, 125, pp.462–466. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.01.033>.
12. Pickens, L.B. and Tang, Y. (2010). Oxytetracycline Biosynthesis. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 285, pp.27509–27515. doi:<https://doi.org/10.1074/jbc.R110.130419>.
13. Chi, Z., Liu, R., You, H., Ma, S., Cui, H. and Zhang, Q. (2014). Probing the In Vitro Cytotoxicity of the Veterinary Drug Oxytetracycline. *PLoS ONE*, 9(7), pp.e102334–e102334. doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102334>.
14. Gusso, D., Altenhofen, S., Fritsch, P.M., Rübensam, G. and Bonan, C.D. (2021). Oxytetracycline induces anxiety-like behavior in adult zebrafish. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 426, pp.115616–115616. doi:<https://doi.org/10.1016/j.taap.2021.115616>.
15. Long, X., Gong, J., Deng, M., Wu, D., Chen, Z., Xia, P., Gong, X., Deng, Q., Shi, Z., Yan, X., Tian, R. and Jiang, C. (2019). Determination of oxytetracycline hydrochloride in milk and egg white samples using Ru(bipy)₃²⁺–Ce(SO₄)₂ chemiluminescence. *Luminescence*, 34(3), pp.316–323. doi:<https://doi.org/10.1002/bio.3609>.
16. Akbarzadeh, S., Khajehsharifi, H. and Hajihosseini, S. (2022). Detection of Oxytetracycline Using an Electrochemical Label-Free Aptamer-Based Biosensor. *Biosensors*, 12(7), p.468. doi:<https://doi.org/10.3390/bios12070468>.
17. Boonsaner, M. and Hawker, D.W. (2013). Evaluation of food chain transfer of the antibiotic oxytetracycline and human risk assessment. *Chemosphere*, 93(6), pp.1009–1014. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.05.070>.

18. Marrazza, G. (2017). Aptamer Sensors. *Biosensors*, 7(5). doi:<https://doi.org/10.3390/bios7010005>.
19. Darmostuk, M., Rimpelova, S., Gbelcova, H. and Ruml, T. (2015). Current approaches in SELEX: An update to aptamer selection technology. *Biotechnology Advances*, [online] 33(6), pp.1141–1161. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.02.008>.
20. Zhang, Y., Lai, B. and Juhas, M. (2019). Recent Advances in Aptamer Discovery and Applications. *Molecules*, [online] 24(5), p.941. doi:<https://doi.org/10.3390/molecules24050941>.
21. Röthlisberger, P. and Hollenstein, M. (2018). Aptamer chemistry . *Advanced Drug Delivery Reviews* , 134, pp.3–21.
22. Ma, X., Wang, W., Chen, X., Xia, Y., Wu, S., Duan, N. and Wang, Z. (2014). Selection, identification, and application of Aflatoxin B1 aptamer. *European Food Research and Technology*, 238(6), pp.919–925. doi:<https://doi.org/10.1007/s00217-014-2176-1>.
23. Zhou, J. and Rossi, J. (2017). Aptamers as targeted therapeutics: current potential and challenges. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16(3), pp.181–202. doi:<https://doi.org/10.1038/nrd.2016.199>.
24. Bernat, V. and Disney, M.D. (2015). RNA Structures as Mediators of Neurological Diseases and as Drug Targets. *Neuron*, 87(1), pp.28–46. doi:<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.06.012>.
25. Gan, Z., Roslan, M.A.M., Abd Shukor, M.Y., Halim, M., Yasid, N.A., Abdullah, J., Md Yasin, I.S. and Wasoh, H. (2022). Advances in Aptamer-Based Biosensors and Cell-Internalizing SELEX Technology for Diagnostic and Therapeutic Application. *Biosensors*, 12(11), p.922. doi:<https://doi.org/10.3390/bios12110922>.
26. Kohlberger, M. and Gadermaier, G. (2022). SELEX: Critical factors and optimization strategies for successful aptamer selection. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 69, pp.1771–1792.

doi:<https://doi.org/10.1002/bab.2244>.

27. Ali, M.H., Elsherbiny, M.E. and Emara, M. (2019). Updates on Aptamer Research. *International Journal of Molecular Sciences*, [online] 20(10), p.2511. doi:<https://doi.org/10.3390/ijms20102511>.

28. Lakhin, A.V., Tarantul, V.Z. and Gening, L.V. (2013). Aptamers: Problems, Solutions and Prospects. *Acta Naturae*, [online] 5(4), pp.34–43. doi:<https://doi.org/10.32607/20758251-2013-5-4-34-43>.

29. Liu, R., Zhang, F., Sang, Y., Katouzian, I., Jafari, S.M., Wang, X., Li, W., Wang, J. and Mohammadi, Z. (2022). Screening, identification, and application of nucleic acid aptamers applied in food safety biosensing. *Trends in Food Science & Technology*, [online] 123, pp.355–375. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.03.025>.

30. Hasegawa, H., Savory, N., Abe, K. and Ikebukuro, K. (2016). Methods for Improving Aptamer Binding Affinity. *Molecules*, 21(4), p.421. doi:<https://doi.org/10.3390/molecules21040421>.

31. McKeague, M. and DeRosa2012, M.C. (2012). Challenges and Opportunities for Small Molecule Aptamer Development. *Journal of Nucleic Acids*, 2012. doi:<https://doi.org/10.1155/2012/748913>.

32. Jing, M. and Bowser, M.T. (2010). Methods for measuring aptamer-protein equilibria: A review. *Analytica Chimica Acta*, 686(2011), pp.9–18. doi:<https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.10.032>.

33. Thevendran, R., Navien, T.N., Meng, X., Wen, K., Lin, Q., Sarah, S., Tang, T.-H. and Citartan, M. (2020). Mathematical approaches in estimating aptamer-target binding affinity. *Analytical Biochemistry*, [online] 600, p.113742. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113742>.

34. Thevendran, R. and Citartan, M. (2022). Assays to Estimate the Binding Affinity of Aptamers. *Talanta*, 238, p.122971. doi:<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122971>.

35. Bishop, G.R. and Chaires, J.B. (2003). Characterization of DNA structures by circular dichroism. *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*, [online] Chapter 7, pp.7.11.1–7.11.8.
doi:<https://doi.org/10.1002/0471142700.nc0711s11>.
36. Pignataro, M.F., Herrera, M.G. and Dodero, V.I. (2020). Evaluation of Peptide/Protein Self-Assembly and Aggregation by Spectroscopic Methods. *Molecules*, [online] 25(20), p.4854.
doi:<https://doi.org/10.3390/molecules25204854>.
37. Kypr, J., Kejnovská, I., Renčiuk, D. and Vorlíčková, M. (2009). Circular dichroism and conformational polymorphism of DNA. *Nucleic Acids Research*, [online] 37(6), pp.1713–1725. doi:<https://doi.org/10.1093/nar/gkp026>.
38. Lin, P.H., Chen, R.H., Lee, C.H., Chang, Y., Chen, C.S. and Chen, W.Y. (2011). Studies of the binding mechanism between aptamers and thrombin by circular dichroism, surface plasmon resonance and isothermal titration calorimetry. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 88(2), pp.552–558.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.07.032>.
39. Wang, H., Cheng, H., Wang, J., Xu, L., Chen, H. and Pei, R. (2016). Selection and characterization of DNA aptamers for the development of light-up biosensor to detect Cd(II). *Atlanta*, 154, pp.498–503.
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2016.04.005>.
40. Ciaco, S., Aronne, R., Fiabane, M. and Mori, M. (2024). The Rise of Bacterial G-Quadruplexes in Current Antimicrobial Discovery. *ACS Omega*, 9(23), pp.24163–24180. doi:<https://doi.org/10.1021/acsomega.4c01731>.
41. Guerra del Villar, R., Trent, J.O. and Chaires, J.B. (2018). G-Quadruplex Secondary Structure Obtained from Circular Dichroism Spectroscopy. *Angewandte Chemie*, 57(24), pp.7171–7175.
doi:<https://doi.org/10.1002/anie.201709184>.
42. Zhou, J., Fleming, A.M., Averill, A.M., Burrows, C.J. and Wallace, S.S. (2015). The NEIL glycosylases remove oxidized guanine lesions from telomeric

and promoter quadruplex DNA structures. *Nucleic Acids Research*, 43(8), pp.4039–4054. doi:<https://doi.org/10.1093/nar/gkv252>.

43. Vinegoni, C., Feruglio, P.F., Gryczynski, I., Mazitschek, R. and Weissleder, R. (2019). Fluorescence anisotropy imaging in drug discovery. *Adv Drug Deliv Rev*, pp.151–152: 262–288. doi:<https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.01.019>.

44. Lea, W.A. and Simeonov, A. (2010). Fluorescence polarization assays in small molecule screening. *Expert Opinion on Drug Discovery*, [online] 6(1), pp.17–32. doi:<https://doi.org/10.1517/17460441.2011.537322>.

45. Moerke, N.J. (2009). Fluorescence Polarization (FP) Assays for Monitoring Peptide-Protein or Nucleic Acid-Protein Binding. *Current Protocols in Chemical Biology*, 1(1), pp.1–15. doi:<https://doi.org/10.1002/9780470559277.ch090102>.

46. Zhao, Q., Tao, J., Uppal, J.S., Peng, H., Wang, H. and X. Chris Le (2019). Nucleic acid aptamers improving fluorescence anisotropy and fluorescence polarization assays for small molecules. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 110, pp.401–409. doi:<https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.11.018>.

47. Zhao, Q., Tao, J., Feng, W., Uppal, J.S., Peng, H. and Le, X.C. (2020). Aptamer binding assays and molecular interaction studies using fluorescence anisotropy - A review. *Analytica Chimica Acta*, 1125, pp.267–278. doi:<https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.05.061>.

48. Zhao, Q., Bai, Y. and Wang, H. (2020). Directing a rational design of aptamer-based fluorescence anisotropy assay for sensitive detection of immunoglobulin E by site-specific binding study. *Talanta*, 217, p.121018. doi:<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121018>.

49. Hall, M., Yasgar, A., Peryea, T., Braisted, J.C., Jadhav, A., Simeonov, A. and Coussens, N.P. (2017). Fluorescence polarization assays in high-throughput screening and drug discovery: a review. *Methods Appl Fluoresc*, 4(2), p.022001. doi:<https://doi.org/10.1088/2050-6120/4/2/022001>..

50. Geng, X., Zhang, D., Wang, H. and Zhao, Q. (2013). Screening interaction between ochratoxin A and aptamers by fluorescence anisotropy approach.

Analytical and Bioanalytical Chemistry, 405(8), pp.2443–2449.
doi:<https://doi.org/10.1007/s00216-013-6736-1>.

51. Bhalla, N., Jolly, P., Formisano, N. and Estrela, P. (2016). Introduction to biosensors. *Essays in Biochemistry*, 60, pp.1–8.
doi:<https://doi.org/10.1042/EBC20150001>.

52. Das, T.R., Patra, S., Govender, P.P. and Shukla, S.K. (2022). Biosensors: principles, fundamental history, recent trends, applications. pp.1–8.
doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-88464-8.00010-5>.

53. Vigneshvar, S., Sudhakumari, C., Senthilkumaran, B. and Prakash, H. (2016). Recent Advances in Biosensor Technology for Potential Applications - An overview. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 4.
doi:<https://doi.org/10.3389/fbioe.2016.00011>.

54. Kaur, H., Bhosale, A. and Shrivastav, S. (2018). Biosensors: Classification, Fundamental Characterization and New Trends: A Review. *International Journal of Health Sciences & Research*, 8(6).

55. Chambers, J.P., Arulanandam, B.P., Matta, L.L., Weis, A. and Valdes, J.J. (2008). Biosensor Recognition Elements. *Current Issues in Molecular Biology*, 10(1-12). doi:<https://doi.org/10.21775/cimb.010.001>.

56. Korotkaya, E. (2014). Biosensors: Design, Classification, and Applications in the Food Industry. *Foods and Raw Materials*, 2(2), pp.161–171.
doi:<https://doi.org/10.12737/5476>.

57. Verma, N. and Bhardwaj, A. (2015). Biosensor Technology for Pesticides—A review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175(6), pp.3093–3119.
doi:<https://doi.org/10.1007/s12010-015-1489-2>.

58. Goode, J.A., Rushworth, J.V.H. and Millner, P.A. (2014). Biosensor Regeneration: A Review of Common Techniques and Outcomes. *Langmuir*, 31(23), pp.6267–6276. doi:<https://doi.org/10.1021/la503533g>.

59. Choi, H.K. and Yoon, J. (2023). Enzymatic Electrochemical/Fluorescent

Nanobiosensor for Detection of Small Chemicals. *Biosensors*, 13(492). doi:<https://doi.org/10.3390/bios13040492>.

60. Arshavsky-Graham, S., Heuer, C.P., Xin, J. and Segal, E. (2022). Aptasensors versus immunosensors—Which will prevail? *Engineering in Life Sciences*, 22(3-4), pp.319–333. doi:<https://doi.org/10.1002/elsc.202100148>.

61. Karachaliou, C.E. and Livaniou, E. (2023). Immunosensors for Autoimmune-Disease-Related Biomarkers: A Literature Review. *Sensors*, 23(6770). doi:<https://doi.org/10.3390/s23156770>.

62. Gil Rosa, B., Akingbade, O.E., Guo, X., Gonzalez-Macia, L., Crone, M.A., Cameron, L.P., Freemont, P., Choy, K.-L., Güder, F., Yeatman, E., Sharp, D.J. and Li, B. (2022). Multiplexed immunosensors for point-of-care diagnostic applications. *Biosensors and Bioelectronics*, [online] 203, p.114050. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bios.2022.114050>.

63. Zhao, Y., Yavari, K., Wang, Y., Pi, K., Philippe Van Cappellen and Liu, J. (2022b). Deployment of functional DNA-based biosensors for environmental water analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 153, pp.116639–116639. doi:<https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116639>

64. Hua, Y., Ma, J., Li, D. and Wang, R. (2022). DNA-Based Biosensors for the Biochemical Analysis: A Review. *Biosensors*, 12(3), p.183. doi:<https://doi.org/10.3390/bios12030183>.

65. Alhadrami, H.A. (2017). Biosensors: Classifications, medical applications, and future prospective. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 65(3), pp.497–508.

66. Villalonga, A., Mayol, B., Villalonga, R. and Vilela, D. (2022). Electrochemical aptasensors for clinical diagnosis. A review of the last five years. *Sensors and Actuators: B. Chemical*, 369(132318). doi:<https://doi.org/10.1016/j.snb.2022.132318>.

68. Damborsky, P., Svitel, J. and Katrlík, J. (2016). Optical biosensors. *Essays in Biochemistry*, 60, pp.91–100. doi:<https://doi.org/10.1042/EBC20150010>.

69. Topkaya, N.S. and Cetin, A.E. (2021). Electrochemical Aptasensors for Biological and Chemical Analyte Detection. *Electroanalysis*, 33, pp.277–291. doi:<https://doi.org/10.1002/elan.202060388>.
70. Radi, A.E. and Ellatief, M.R.A. (2021). Electrochemical Aptasensors: Current Status and Future Perspectives. *Diagnostics*, 11. doi:<https://doi.org/10.3390/diagnostics11010104>.
71. Kuang, H., Chen, W., Xu, D., Xu, L., Zhu, Y., Liu, L., Chu, H., Peng, C., Xu, C. and Zhu, S. (2010). Fabricated aptamer-based electrochemical ‘signal-off’ sensor of ochratoxin A. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(2), pp.710–716. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.06.058>.
72. Fan, L., Zhao, G., Shi, H., Liu, M. and Li, Z. (2013). A highly selective electrochemical impedance spectroscopy-based aptasensor for sensitive detection of acetamiprid. *Biosensors and Bioelectronics*, 43, pp.12–18. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.11.033>.
73. Idili, A., Gerson, J., Parolo, C., Kippin, T. and Plaxco, K.W. (2019). An electrochemical aptamer-based sensor for the rapid and convenient measurement of l-tryptophan. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 411(19), pp.4629–4635. doi:<https://doi.org/10.1007/s00216-019-01645-0>.
74. Liu, Y., Tuleouva, N., Ramanculov, E. and Revzin, A. (2010). Aptamer-Based Electrochemical Biosensor for Interferon Gamma Detection. *Analytical Chemistry*, 82(19), pp.8131–8136. doi:<https://doi.org/10.1021/ac101409t>.
75. Guliy, O.I., Karavaeva, O.A., Smirnov, A.V., Eremin, S.A. and Bunin, V.D. (2023). Optical Sensors for Bacterial Detection. *Sensors*, 23, p.9391. doi:<https://doi.org/10.3390/s23239391>.
76. Tetyana, P., Shumbula, P.M. and Njengele-Tetyana, Z. (2021). Biosensors: Design, Development and Applications. doi:<https://doi.org/10.5772/intechopen.97576>.
77. Bramhachari, P.V. and Rao, N. (2020). *Recent Advancements in Biomarkers and Early Detection of Gastrointestinal Cancers*. Springer Nature.

78. Halicka, K. and Cabaj, J. (2021). Electrospun Nanofibers for Sensing and Biosensing Applications—A Review. *Int. J. Mol. Sci.* , 22, p.6357. doi:<https://doi.org/10.3390/ijms22126357>.
79. Niazi, J.H., Lee, S.J., Kim, Y.S. and Gu, M.B. (2008). ssDNA aptamers that selectively bind oxytetracycline. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16(3), pp.1254–1261. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.10.073>.
80. Zhao, Y., Ong, S., Chen, Y., Huang, P.J. and Liu, J. (2022a). Label-free and Dye-free Fluorescent Sensing of Tetracyclines Using a Capture-Selected DNA Aptamer. *Analytical Chemistry*, 94(28), pp.10175–10182. doi:<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.2c01561>.
81. Babaei, M., Jalalian, S.H., Bakhtiari, H., Ramezani, M., Abnous, K. and Taghdisi, S.M. (2017). Aptamer-Based Fluorescent Switch for Sensitive Detection of Oxytetracycline. *Australian Journal of Chemistry*, 70(6), p.718. doi:<https://doi.org/10.1071/ch16562>.