

ΑΡΙΣΤΕΙΑ Ι

ΕΡΓΟ: Λειτουργικές Αυτο-οργανούμενες Νανοδομές από Συμπολυμερή κατά Συστάδες και Πρωτεΐνες (NANOMACRO) 1129

ΕΝΟΤΗΤΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ ΕΕ5

ΠΑΡΑΔΟΤΕΟ 5.3: Έκθεση αποτελεσμάτων για για τη χρήση νανοδομών σε αισθητήρες



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

Στη συγκεκριμένη ενότητα εργασίας εξετάστηκαν, μεταξύ άλλων, τα φαινόμενα αλληλεπίδρασης συμπολυμερών με πρωτεΐνες και ειδικότερα οι έρευνες επικεντρώθηκαν στην μελέτη σχετικών εφαρμογών μέσω της πειραματικής ανάπτυξης αισθητήρων ανίχνευσης πρωτεϊνών, από επιστρώσεις συμπολυμερών κατά συστάδες ή τυχαίων πάνω σε πολυμερικές ή γυάλινες οπτικές ίνες. Ειδικότερα στο παραδοτέο αυτό αξιολογήθηκαν τα διάφορα πρωτόκολλα εναπόθεσης του πολυμερούς πάνω σε πολυμερικές ή γυάλινες οπτικές ίνες. Αρχικά χρησιμοποιήθηκε με επιτυχία το συμπολυμερές PtBS-SPS για την ανίχνευση της λυσοζύμης κάνοντας χρήση της ηλεκτροστατικής αλληλεπίδρασης του πολυμερικού στρώματος με την πρωτεΐνη. Η προσρόφηση της λυσοζύμης στο πολυμερικό στρώμα επιφέρει αλλαγές στο οπτικό σήμα (αλλαγές στην ένταση της δέσμης φωτός που διαπερνά την ίνα), οι οποίες συσχετίζονται με την συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο υπερκείμενο υδατικό διάλυμα.

Υλοποιήθηκε επίσης ανάλογη μελέτη και πειράματα και με συμπολυμερή PS-P2VP (κατά συστάδες και τυχαία) προς ανίχνευση πρωτεΐνης BSA σε φυσιολογικές τιμές pH. Το παραδοτέο περιγράφει την πειραματική ανάπτυξη αισθητήρων πρωτεϊνών από επιστρώσεις συμπολυμερών συμπολυμερές PS-P2VP (κατά συστάδες και τυχαίο) πάνω σε πλαστικές οπτικές ίνες. Η προσρόφηση επίσης της BSA στο πολυμερικό στρώμα επιφέρει αλλαγές στη διάδοση του οπτικού σήματος, οι οποίες είναι δυνατόν να συσχετιστούν με την συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο υπερκείμενο διάλυμα. Για την βελτιστοποίηση ανάπτυξης του αισθητήρα πραγματοποιήθηκε φυσικοχημικός και μορφολογικός χαρακτηρισμός των επιστρώσεων. Αναπτύχθηκαν πρωτόκολλα παρασκευής και οπτικού χαρακτηρισμού των επιστρώσεων, καθώς και της λειτουργικότητάς τους σε διαφορετικές συνθήκες. Αξιολογήθηκε η απόκριση των νανοδομών παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων πρωτεϊνών όπως BSA και λυσοζύμης. Πραγματοποιήθηκε επίσης λεπτομερής μελέτη της εκλεκτικότητας ανίχνευσης των υπό ανάπτυξη αισθητήριων συστημάτων ως προς τη σύμπλεξή τους με τις δύο πρωτεΐνες, με σκοπό να αναγνωριστεί ο μηχανισμός και να ελεγχθεί η διαδικασία συμπλοκοποίησης στην επιφάνεια.

Περιγραφή Οπτικής Πλατφόρμας για την Ανάπτυξη Χημικών Αισθητήρων

Παρουσιάζονται συνοπτικά οι φωτονικές πλατφόρμες (οπτικές ίνες διαφόρων τεχνολογιών και υλικών) που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη των αισθητήρων, ανάλογα με τις ανάγκες ανίχνευσης σε κάθε περίπτωση. Η κύρια πλατφόρμα που χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη των αισθητήρων είναι οι πολυμερικές ίνες, ενώ οι ίνες διοξειδίου του πυριτίου χρησιμοποιήθηκαν διότι επιτρέπουν την εναπόθεση υλικού, διαλυμένο σε ισχυρό διαλύτη χωρίς αλλαγές στις ιδιότητες της οπτικής ίνας.

A. Πολυμερικές Οπτικές Ίνες

Οι συμβατικές πολυμερικές οπτικές ίνες POF προσφέρουν ένα εύχρηστο και εύελκτο, από άποψη χειρισμού, μέσο για την κατασκευή και μαζική παραγωγή φθηνών εμπορικά αισθητήρων (αναλώσιμοι – μίας χρήσεως), με πολυάριθμες εφαρμογές. Στο παρόν παρουσιάζονται όλα τα πειραματικά αποτελέσματα όπου χρησιμοποιήθηκαν POF ίνες για την ανάπτυξη διαφορετικών χημικών αισθητήρων πρωτεϊνών. Εξετάστηκαν επίσης διαφορετικές διατάξεις POF (σχήμα-U, μικροδομημένα, κτλ.).

B. Οπτική ίνα Διοξειδίου του πυριτίου - γυάλινες οπτικές ίνες (silica fibers)

Οι γυάλινες οπτικές ίνες (συγκεκριμένα διοξείδιο του πυριτίου SiO_2) σε αντίθεση με τις πολυμερικές PMMA ίνες προσφέρουν το πλεονέκτημα να μην διαβρώνεται η επιφάνεια τους όταν συνδυάζονται με υλικά διαλυμένα σε ισχυρό διαλύτη για τα πολυμερή (π.χ. τετραϋδροφουράνιο ή THF). Αρκετές φορές, για να είναι ομογενοποιημένο ένα υλικό απαιτείται η χρήση κάποιου ισχυρού διαλύτη. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι το νέο υλικό που αναπτύχθηκε, πολυ(σουλφονομένο στυρένιο-b-τεταρτοταγές βουτυλοστυρένιο) (SPS-PtBS, SD για συντομία), εμφανίζει πιο ομογενοποιημένη μορφή όταν ο διαλύτης είναι τετραϋδροφουράνιο αντί για μεθανόλη. Ωστόσο, ο συγκεκριμένος διαλύτης διαβρώνει επίσης και την επιφάνεια του PMMA υλικού και συνεπώς καθιστά -αν όχι απαγορευτική- δύσκολη την χρήση του σε πολυμερικές ίνες PMMA. Στα πειράματα που παρουσιάζονται παρακάτω, οι γυάλινες οπτικές ίνες που χρησιμοποιούνται είναι χαμηλού κόστους και πολύτροπες μεγάλης διαμέτρου για εύκολη σύζευξη της πηγής (LED).

Σύνθεση και Χαρακτηρισμός Ενεργών Υλικών Ανίχνευσης

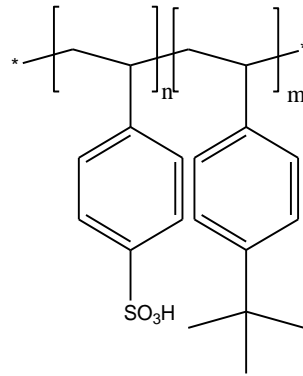
Τα συμπολυμερή υλικά που επιλέχθηκαν είναι αδιάλυτα σε υδατικά μέσα, είναι διαλυτά σε ήπιους οργανικούς διαλύτες, ώστε να μην διαλυτοποιούν την επίστρωση PMMA που καλύπτει τις πολυμερικές οπτικές ίνες (ωστόσο δοκιμάστηκαν και ισχυροί διαλύτες για εφαρμογή στις γυάλινες ίνες) και είναι συμπολυμερή κατά συστάδες, ώστε η μία συστάδα να προσδένεται εκλεκτικά πάνω στην οπτική ίνα και η άλλη να αλληλεπιδρά εκλεκτικά με τον αναλύτη (πρωτεΐνη) στο υδατικό περιβάλλον. Αυτά τα νέα καινοτόμα και λειτουργικά υλικά συνδυάστηκαν με την φωτονική πλατφόρμα των πολυμερικών, αλλά και γυάλινων ινών.

A. Πολυ (σουλφονομένο στυρένιο-b-τεταρτοταγές βουτυλοστυρένιο) Διυσταδικό Συμπολυμερές (SD)

Το συμπολυμερές SPS-b-PtBS περιέχει στο μόριο του δύο διαφορετικές ομάδες οι οποίες έχουν συνδεθεί χημικά μέσω κατάλληλης χημικής διεργασίας. Η μία συστάδα είναι το σουλφονομένο πολυ(στυρένιο) (SPS), η οποία είναι υδρόφιλη και ευαίσθητη σε πολικές ενώσεις, ενώ η άλλη το πολυ(τεταρτοταγές βουτυλοστυρένιο) (PtBS) η οποία είναι υδρόφοβη και ευαίσθητη σε κυκλικές αρωματικές μη πολικές ενώσεις. Η διάλυση του συμπολυμερούς έγινε σε διαλύτη μεθανόλη και σε διαλύτη τετραϋδροφουρανίου(THF) σε συγκέντρωση 1%.



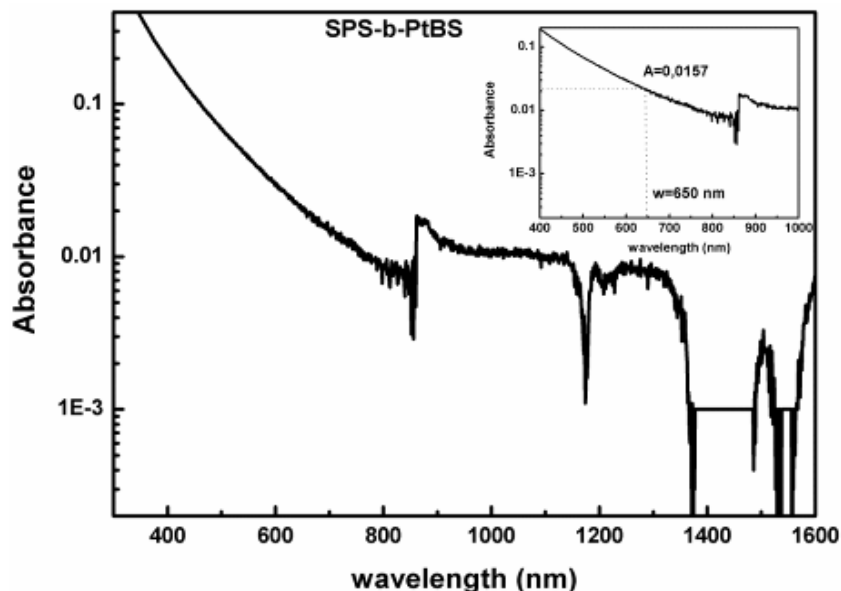
Σχήμα 1: Το συμπολυμερές SPS-b-PtBS σε διαλύτη μεθανόλη και σε διαλύτη THF 50/50 v/v, σε συγκέντρωση 1%.



Σχήμα 2: Χημική δομή του κατά συστάδες συμπολυμερούς SPS-b-PtBS (SD).

Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός του συμπολυμερούς SD.

Μια σημαντική παράμετρος του υλικού που καθορίζει σημαντικά τις οπτικές ιδιότητες του είναι η απορρόφηση. Το συμπολυμερές χαρακτηρίστηκε αρχικά ως προς την απορρόφηση του στο εύρος από 200-1600nm. Στο παρακάτω διάγραμμα (Σχήμα 3) φαίνεται το φάσμα απορρόφησης του υλικού, όπου παρατηρείται η αυξημένη απορρόφηση του στη περιοχή του υπεριώδους φάσματος. Ωστόσο, για τις ανάγκες του έργου, το εύρος λειτουργίας του αισθητήρα είναι στο ορατό και συγκεκριμένα στο 650nm μήκος κύματος, όπου τα επίπεδα απορρόφησης σε αυτό το εύρος δεν είναι απαγορευτικά.



Σχήμα 3: Το φάσμα απορρόφησης του συμπολυμερούς SPS-b-PtBS (SD).

Το δισυσταδικό συμπολυμερές SD διαλύθηκε σε μεθανόλη και THF σε συγκεντρώσεις 1%wt και 5%wt ώστε να δημιουργηθεί μια ομογενής διασπορά. Στο διάλυμα αυτό εμβαπτίστηκε η οπτική ίνα για μερικά δευτερόλεπτα και στη συνέχεια αφέθηκε να στεγνώσει πριν τη χρήση της. Το λεπτό υμένιο SD που εναποτέθηκε σε υπόστρωμα γυαλιού παρατηρήθηκε με οπτική μικροσκοπία όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 4). Στην περίπτωση που ο διαλύτης του SD ήταν η μεθανόλη, το υμένιο που σχηματίζεται δεν είναι ομογενές, καθώς όπως ήδη αναφέρθηκε η μεθανόλη δεν διαλυτοποιεί πλήρως το δισυσταδικό συμπολυμερές. Αντιθέτως, στην περίπτωση που διαλύτης του SD ήταν το THF παρατηρούνται ομοιογενή υμένια χωρίς ρωγμές.



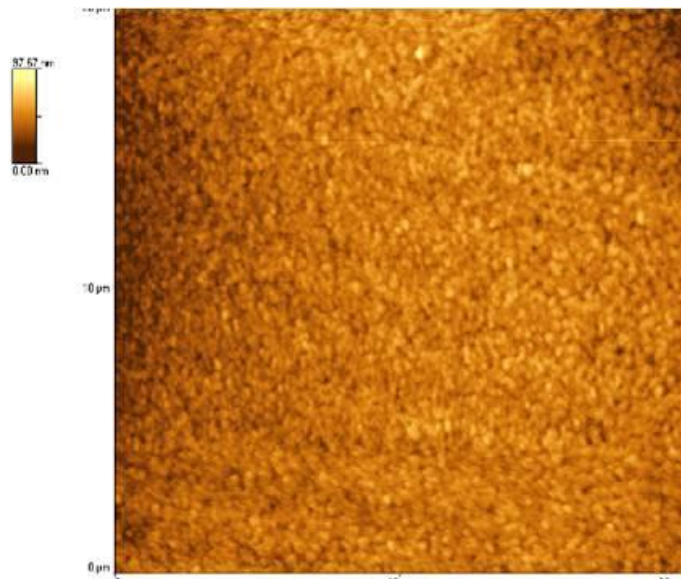
(α)

(β)

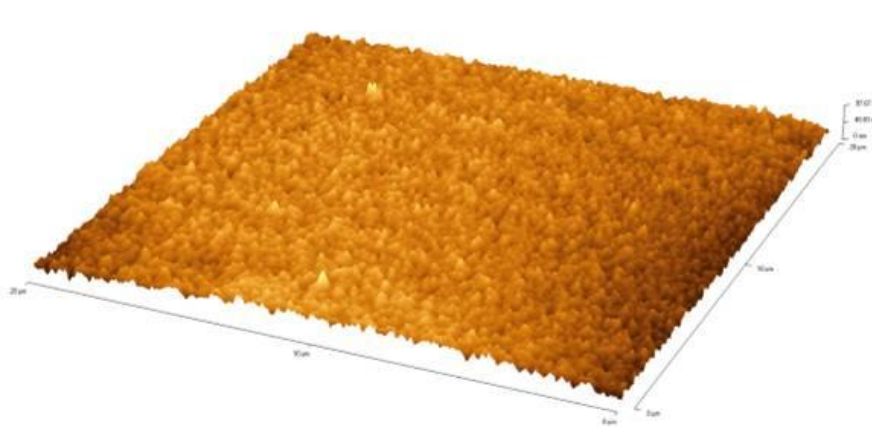
Σχήμα 4: Εικόνες από οπτικό μικροσκόπιο του SPS-b-PtBS (SD) συμπολυμερούς πάνω σε γυάλινο υπόστρωμα σε διαλύτη (α) μεθανόλη, (β) σε THF.

Μικροσκοπία Ατομικής Δύναμης (AFM)

Από τις παραπάνω εικόνες παρατηρείται ότι το συγκεκριμένο συμπολυμερικό υλικό δεν διαλύεται επαρκώς σε διαλύτη μεθανόλη ενώ διαλύεται καλύτερα χρησιμοποιώντας διαλύτη τετραϋδροφουράνιο (THF). Παρακάτω φαίνεται η μορφολογία ενός λεπτού υμενίου από το υλικό SPS-b-PtBS, το οποίο εναποτέθηκε πάνω σε υπόστρωμα γυαλιού.



(α)

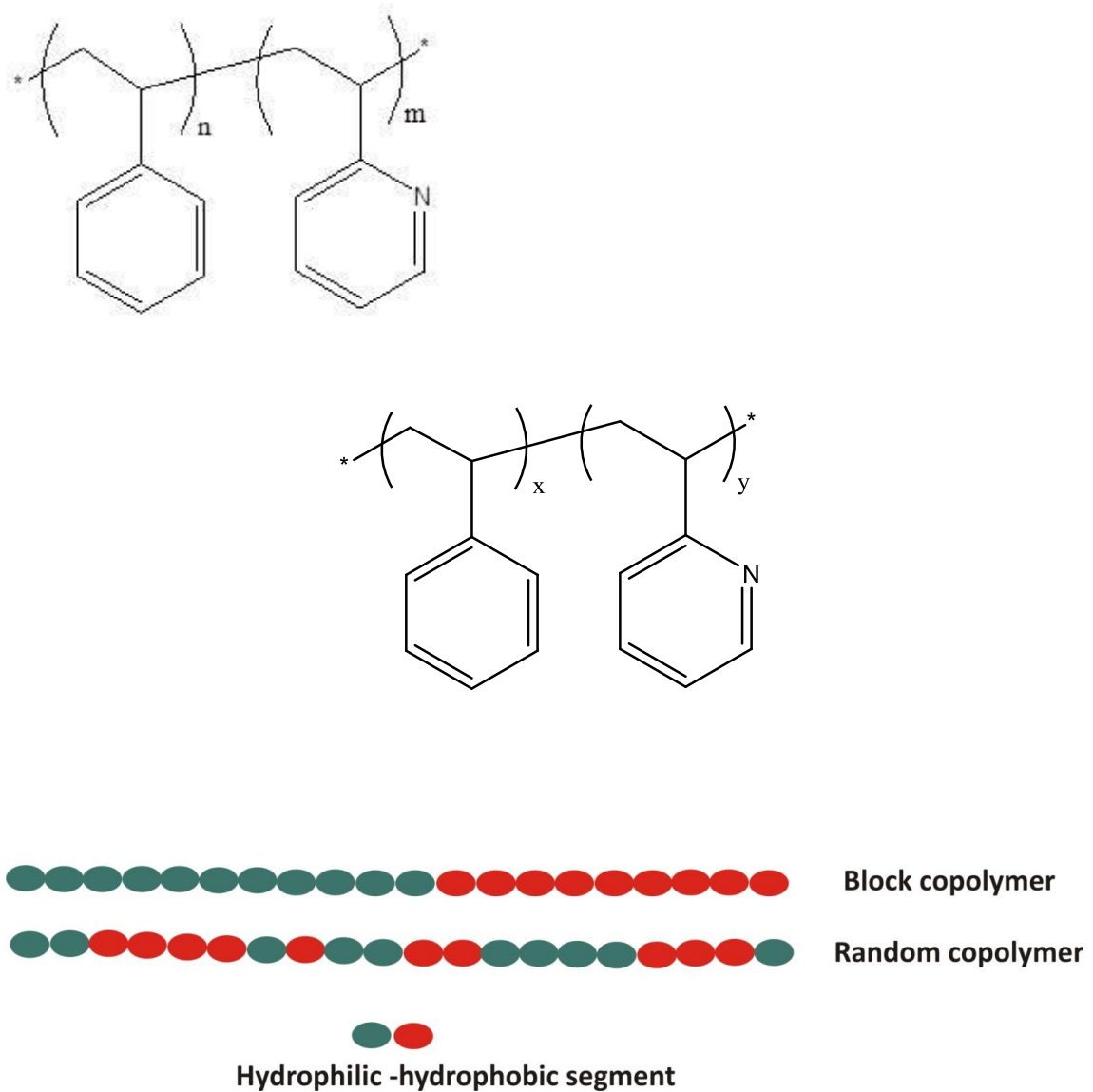


(β)

Σχήμα 5: Εικόνες από μικροσκόπιο ατομικής δύναμης (AFM) όπου φαίνεται η μορφολογία του υλικού SPS-b-PtBS/THF εναποθετημένο πάνω σε γυάλινο υπόστρωμα. Στην εικόνα (α) απεικονίζεται μια περιοχή 20x20 μm ενώ στην εικόνα (β) η ίδια περιοχή σε 3D απεικόνιση.

B. Δισυσταδικό συμπολυμερές πολυ(στυρένιο-*b*-2-βινυλοπυριδίνη) (PS-*b*-P2VP) και τυχαίου συμπολυμερές (PS-*r*-P2VP)

Τα μοριακά χαρακτηριστικά του δισυσταδικού συμπολυμερούς παρουσιάζονται στον πίνακα 1 και η χημική δομή του καθώς και η δομή του αντίστοιχου τυχαίου συμπολυμερούς στο σχήμα 6.



Σχήμα 6: Δομή του δισυσταδικού PS-*b*-P2VP και του τυχαίου συμπολυμερούς PS-*r*-P2VP. Σχηματική αποτύπωση τυχαίου και συμπολυμερούς κατά συστάδες.

Το δισυσταδικό συμπολυμερές PS-b-P2VP διαλύθηκε σε διάλυμα κυκλοεξανίου σε αναλογίες 1%wt και 5%wt και τοποθετήθηκε στους 60°C. Σε αυτές τις συνθήκες το κυκλοεξάνιο θεωρείται εκλεκτικός διαλύτης για το PS και κακός διαλύτης για την P2VP, με αποτέλεσμα την δημιουργία μικκυλίων με πυρήνα αποτελούμενο από συστάδες P2VP και κορώνα PS. Είναι σημαντικό το διάλυμα του συμπολυμερούς να παραμείνει εν θερμώ καθώς σε θερμοκρασία δωματίου έχει παρατηρηθεί καταβύθισή του. Οπτικές ίνες POF εμβαπτίστηκαν στο διάλυμα PS-b-P2VP για μερικά δευτερόλεπτα ώστε να σχηματιστεί λεπτό υμένιο στην επιφάνειά τους. Αφού στέγνωσαν σε θερμοκρασία δωματίου, εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα HCl 1M ώστε να πρωτονιωθεί η συστάδα P2VP προς HP2VP⁺ και να μετακινηθούν στην επιφάνεια του υμενίου. Παρουσία όξινων συνθηκών παρατηρείται πρωτονίωση του αζώτου του πυριδινικού δακτυλίου στην συστάδα της P2VP, με αποτέλεσμα την εμφάνιση θετικού φορτίου. Στη συνέχεια οι οπτικές ίνες πλένονται με νερό για να απομακρυνθεί η περίσσεια HCl και στεγνώνονται με ροή αζώτου.

Πίνακας 1. Μοριακά χαρακτηριστικά των συμπολυμερών που συντάθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για την δημιουργία λεπτών υμενίων στην επιφάνεια οπτικών ινών POF.

Συμπολυμερές	Mw (x10 ⁴) (by SEC/NMR)	Mw/Mn (by SEC)	Composition (by ¹ H NMR/or other methods)
SPS-b-PtBS	19.7	1.03	34wt% SPS (89% mole PS sulfonation)
PS-b-P2VP	3.5	1.06	44% wt PS
PS-r -P2VP	4.53	2.14	47 wt % PS

Ανάπτυξη Αισθητήρων με Χρήση Πολυμερικών Οπτικών Ινών

Έχοντας πραγματοποιήσει μια εκτενή μελέτη τόσο των φυσικοχημικών παραμέτρων όσο και της δυναμικής συμπεριφοράς των ευαίσθητων υλικών ανίχνευσης με χρήση φραγμάτων περίθλασης, ακολουθούν όλα τα πειραματικά αποτελέσματα από την

ανάπτυξη διαφόρων τύπων αισθητήρων αποκλειστικά με την χρήση πολυμερικών ινών. Όπως προαναφέρθηκε η πλατφόρμα των πολυμερικών ινών προσφέρει εύκολη τροποποίηση, χαμηλή ενεργειακή κατανάλωση και δυνατότητα διασύνδεσης με ασύρματη μονάδα δικτύωσης σε χαμηλό κόστος. Παρακάτω περιγράφεται η ανάπτυξη σημειακών αισθητήρων με τροποποίηση της ίνας σε σχήμα U ως κεφαλής αντίχνευσης

Ανάπτυξη Χημικών Αισθητήρων Πολυμερικής Οπτικής Κεφαλής Ανίχνευσης

A. Κατασκευή σημειακής αισθητήριας κεφαλής σε σχήμα U.

Για την διεξαγωγή των πειραμάτων η πολυμερική οπτική ίνα μήκους ~60cm τροποποιήθηκε κατάλληλα ώστε να λειτουργήσει ως αισθητήρας. Η διαδικασία διαμόρφωσης της έγινε ως εξής : Αρχικά αφαιρείται ένα τμήμα του εξωτερικού περιβλήματος (jacket) της οπτικής ίνας (περίπου 5cm) με ένα νυστέρι προσέχοντας να μην χαραχτεί ο μανδύας (cladding) και ξεκινά η διαδικασία καμπύλωσης (bending) της απογυμνωμένης επιφάνειας. Χρησιμοποιώντας ένα πιστόλι θερμού αέρα (air heatgun) τοποθετημένο σε κατάλληλη απόσταση απο την απογυμνωμένη επιφάνεια στέλνεται θερμός αέρας ο οποίος μαλακώνει το πολυμερικό υλικό και ασκώντας αργά δύναμη γίνεται η καμπύλωσή της. Με αυτόν τον τρόπο καμπυλώνεται μια μικρή επιφάνεια της οπτικής ίνας, η οποία θα αποτελέσει και την ενεργή επιφάνεια, χωρίς να επηρεάζεται το υπόλοιπο τμήμα της οπτικής ίνας (Σχήματα 7 και 8).

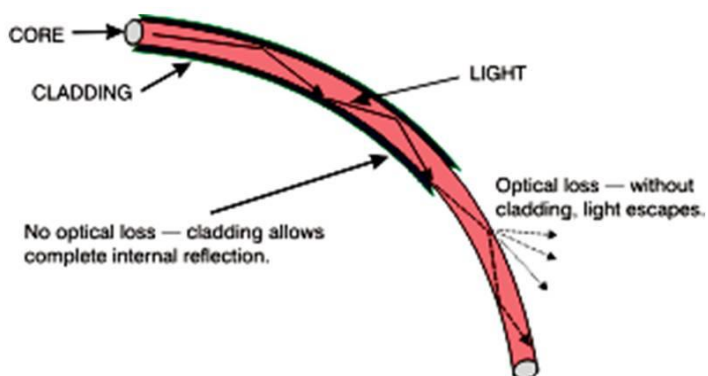


(α)



(β)

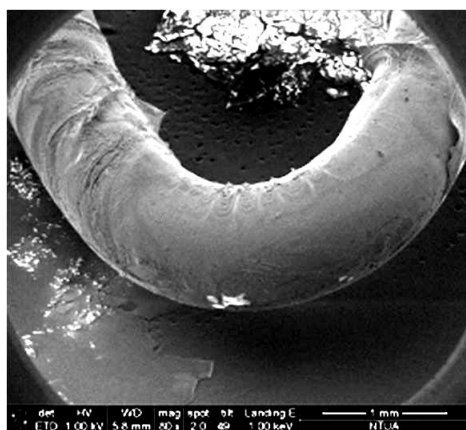
Σχήμα 7: (α) Η πολυμερική οπτική ίνα πριν και μετά που έχει αφαιρεθεί το περίβλημα μήκους 5 cm και (β) η ενεργή περιοχή της οπτικής ίνας πριν υποστεί κάμψη



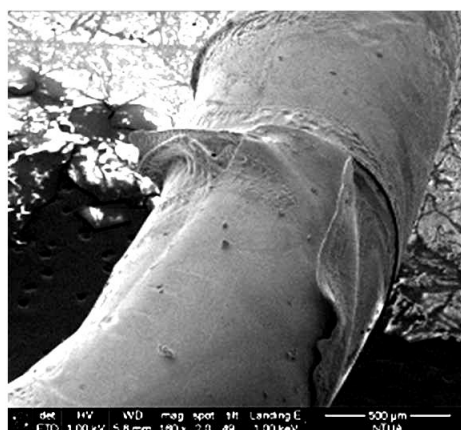
Σχήμα 8: Η πολυμερική οπτική ίνα αφού έχει υποστεί κάμψη (αριστερά) και στρόπος διάδοσης του φωτός (δεξιά).

Η κάμψη της πολυμερικής ίνας χωρίς την καταστροφή του πολυμερικού μανδύα αποτέλεσε μία δύσκολη διαδικασία καθώς ο ζεστός αέρας θα έπρεπε να μαλακώσει τόσο τον πολυμερικό μανδύα ώστε να γίνει η καμπύλωση του με την μικρότερη δυνατή μηχανική καταπόνηση, χωρίς όμως να λιώσει το πολυμερές ($T < T_g$). Συνεπώς έπρεπε να βρεθεί η κατάλληλη απόσταση στην οποία θα τοποθετούνταν το πιστόλι

θερμού αέρα από την οπτική ίνα, ο χρόνος στον οποίο θα συνέβαινε αυτή η διαδικασία, αλλά και η κατάλληλη ρύθμιση της θερμοκρασίας του ζεστού αέρα που θα εξέρχονταν από το πιστόλι προκειμένου η θερμοκρασία του αέρα που θα έφτανε στην οπτική ίνα να μην ξεπερνούσε τους 85 °C όπου λιώνει το πολυμερές. Ο έλεγχος για την σωστή καμπύλωση της οπτικής ίνας διαπιστώθηκε μέσω εικόνων από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM). Παρακάτω (Σχήμα 9 (α),(β)) βλέπουμε αλλοιώσεις του μανδύα της οπτικής ίνας που προκάλεσε η αυξημένη θερμοκρασία του ζεστού αέρα κατά τη διαδικασία καμπύλωσης της.



(α)

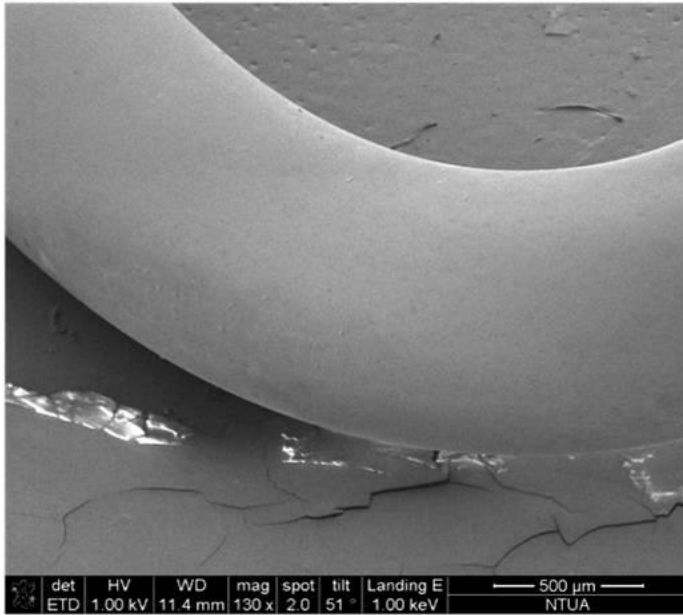


(β)

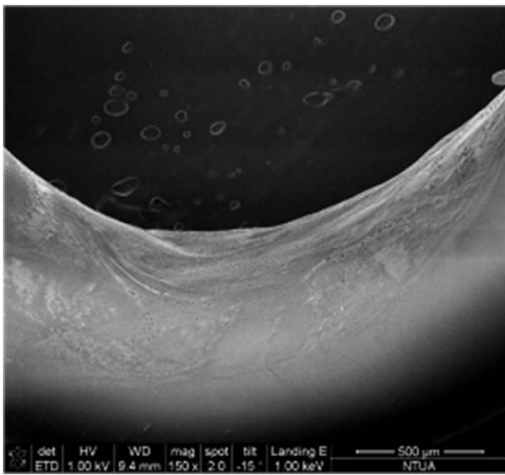
Σχήμα 9: (α), (β) Απεικόνιση πολυμερικής οπτικής ίνας μέσω ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (SEM) υπό γωνία 49ο, όπου φαίνονται οι αλλοιώσεις του πολυμερικού μανδύα

B. Ενεργοποίηση Ανιχνευτικής Ικανότητας Αισθητηρίου Κεφαλής

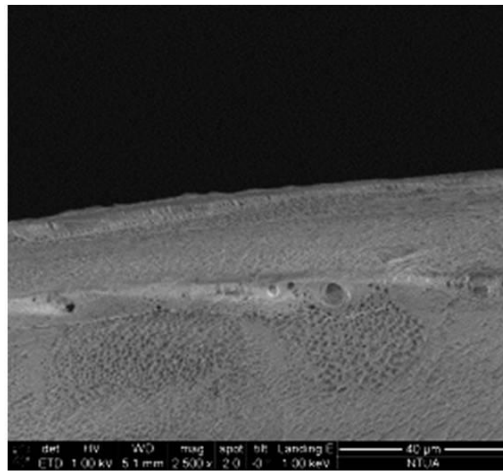
Αφού διαμορφώθηκε κατάλληλα η οπτική ίνα, αρχικά επιχειρήθηκε εναπόθεση του συμπολυμερούς SPS-b-PtBS σε διαλύτη THF πάνω στην καμπυλωμένη επιφάνεια της πολυμερικής οπτικής ίνας με την τεχνική της εμβάπτισης (dip-coating). Το πάχος του υμενίου εξαρτάται από το χρόνο εμβάπτισης. Η εξάτμιση του διαλύτη οδηγεί στο σχηματισμό ενός ομοιόμορφου στρώματος του υλικού στην επιφάνεια της οπτικής ίνας. Τα αποτελέσματα φαίνονται στις παρακάτω εικόνες, όπου είναι εμφανής η παραμόρφωση του πολυμερικού περιβλήματος λόγω της ακαταλληλότητας του διαλύτη ενώ στο Σχ. 10 φαίνεται η πολυμερική επιφάνεια του μανδύα πριν την εναπόθεση του ενεργού υλικού.



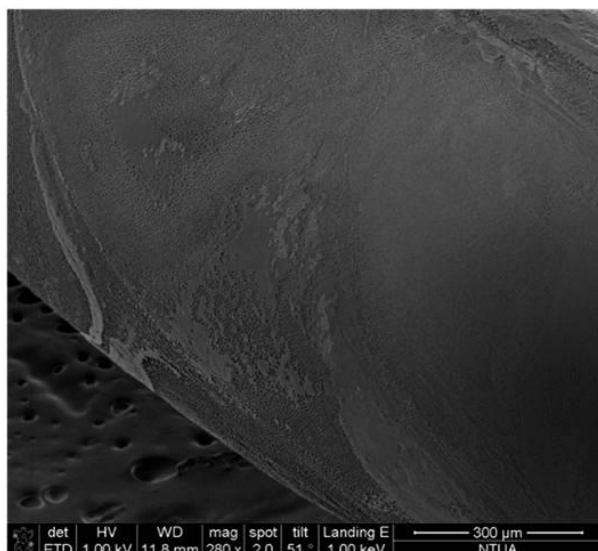
Σχήμα 10: Απεικόνιση της πολυμερικής οπτικής ίνας μέσω ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (SEM) υπό γωνία 51° πριν την εναπόθεση του ενεργού υλικού.



(α)



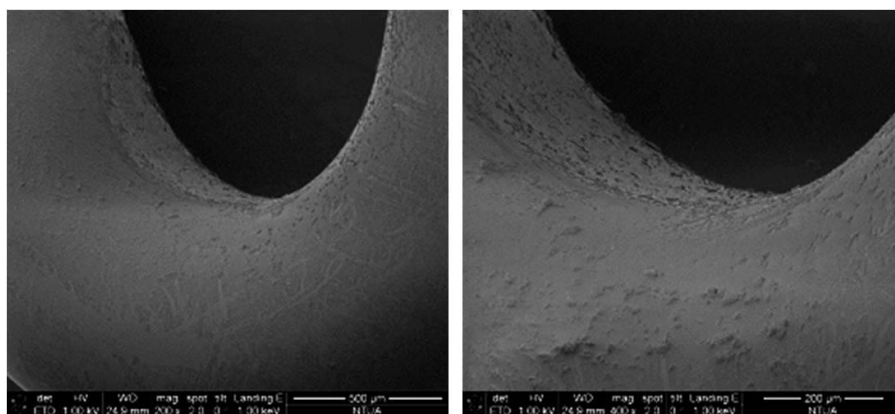
(β)



(γ)

Σχήμα 11: (α), (β), (γ) Απεικόνιση πολυμερικής οπτικής ίνας μέσω ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (SEM) υπό γωνία 51° με εναποτεθειμένο το συμπολυμερές SPS-b-PtBS (SD) σε διαλύτη THF.

Στη συνέχεια, το δισυσταδικό πολυμερές διαλύθηκε σε μεθανόλη. Αν και η μεθανόλη δεν είναι καλός διαλύτης για καμία από τις δύο συστάδες του SPS-b-PtBS, με αποτέλεσμα τελικά να μην δημιουργείται ένα ομογενές διάλυμα, επιλέχθηκε ως διαλύτης διότι ο πολυμερικός μανδύας που καλύπτει την οπτική ίνα καθιστά απαγορευτική την χρήση άλλων οργανικών διαλυτών όπως διαπιστώθηκε παραπάνω. Αντίστοιχα, ακολούθησε η εναπόθεση του υλικού στην καμπυλωμένη και απογυμνωμένη επιφάνεια της οπτικής ίνας. Στις παρακάτω εικόνες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας φαίνεται το εναποτεθειμένο συμπολυμερές πάνω στην ενεργή επιφάνεια της πολυμερικής ίνας χωρίς αυτή τη φορά να υπάρχει καταστροφή του πολυμερικού μανδύα. Το λεπτό στρώμα υλικού που επικαλύπτει την οπτική ίνα δεν είναι ομογενές, καθώς όπως ήδη αναφέρθηκε η μεθανόλη δεν διαλυτοποιεί πλήρως το δισυσταδικό συμπολυμερές.

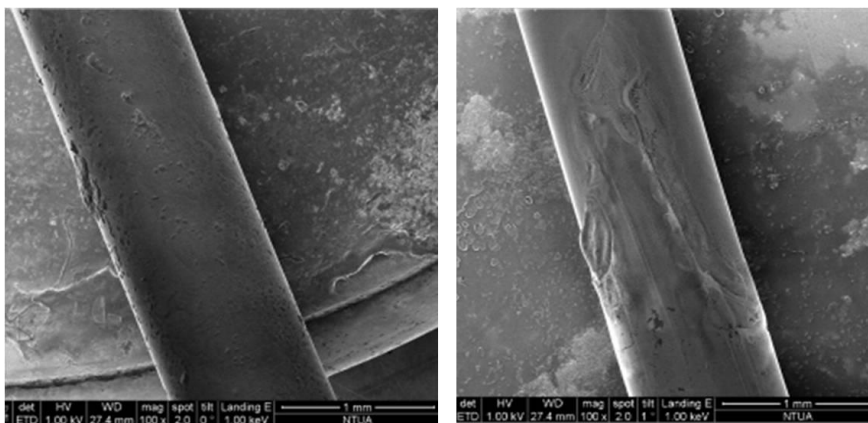


(α)

(β)

Σχήμα 12: (α), (β) Απεικόνιση πολυμερικής οπτικής ίνας μέσω ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (SEM) με εναποτεθειμένο το συμπολυμερές SPS-b-PtBS σε διαλύτη μεθανόλη.

Στις παρακάτω εικόνες προκειμένου να γίνει μία άμεση σύγκριση για τον τρόπο με τον οποίο επικάθεται ποσότητα του υλικού SPS-b-PtBS στην επιφάνεια του πολυμερικού μανδύα ανάλογα με τον διαλύτη που χρησιμοποιείται, έγινε εναπόθεση των υλικών με την τεχνική της εμβάπτισης σε δύο μη καμπυλωμένα τμήματα της πολυμερικής ίνας. Τα αποτελέσματα φαίνονται στις παρακάτω εικόνες όπου είναι εμφανής η παραμόρφωση του πολυμερικού μανδύα με το υλικό SPS-b-PtBS/THF ενώ το υλικό SPS-b-PtBS/methanol παρ' όλη την ανεπαρκή διάλυσή του έχει επιστρωθεί με επιτυχία.



(α)

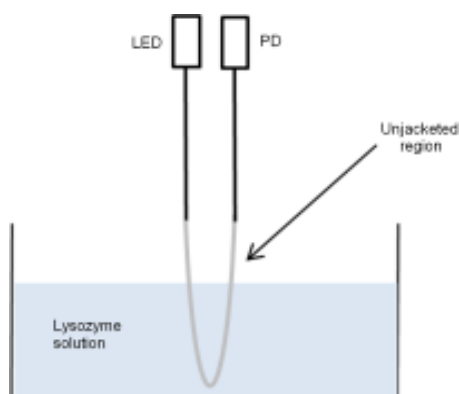
(β)

Σχήμα 13: Απεικόνιση μη καμπυλωμένης πολυμερικής οπτικής ίνας μέσω ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (SEM) με εναποτεθειμένο το συμπολυμερές SPS-b-PtBS (α) σε διαλύτη μεθανόλη και (β) σε διαλύτη THF.

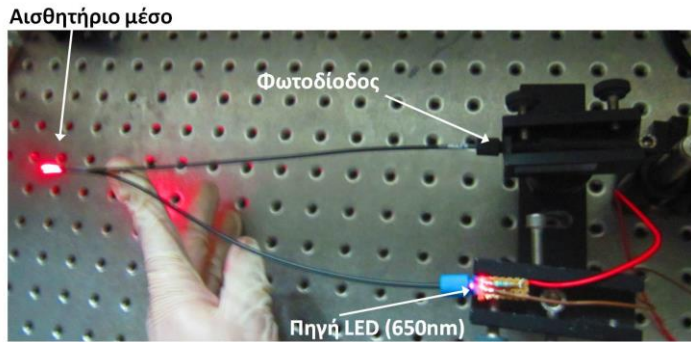
Ανίχνευση Πρωτεϊνών με Χρήση των Υλικών SPS-b-PtBS και PS-b-P2VP

A. Ανίχνευση Λυσοζύμης με το συμπολυμερές SPS-b-PtBS (SD)

Ακολούθως, πραγματοποιήθηκαν πειράματα για δύο περιπτώσεις διαλυμάτων του ενζύμου λυσοζύμης. Η ανίχνευση της λυσοζύμης έχει μεγάλο ενδιαφέρον ως βιολογική εφαρμογή, αλλά ακόμη και στη βιομηχανία τροφίμων και συντήρησης για την παρακολούθηση της ποιότητας των τροφίμων. Αρχικά η λυσοζύμη διαλύθηκε σε αποσταγμένο νερό και στη συνέχεια σε ρυθμιστικό διάλυμα (buffer solution) σε διάφορες συγκεντρώσεις ($0,2 \times 10^{-3}$ gr/ml μέχρι 1×10^{-3} gr/ml). Θα πρέπει να αναφερθεί εδώ ότι το ρυθμιστικό διάλυμα προσομοιώνει έντονα τα βιολογικά υγρά, διότι εμφανίζει το ίδιο επίπεδο αλατότητας και οξύτητας. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής : Αρχικά το καμπυλωμένο τμήμα της ίνας εμβαπτίζεται εντός αποσταγμένου νερού και ρυθμιστικού διαλύματος για να προσδιοριστούν οι τιμές αναφοράς (references) ενώ στη συνέχεια βυθίζεται στα παραπάνω διαλύματα λυσοζύμης παρατηρώντας την διαφορά απόκρισης στο σήμα εξόδου (Σχήμα 14). Η πειραματική διάταξη που χρησιμοποιήθηκε αποτελείται από μία φωτοεκπέμπουσα δίοδο(LED) στα 650nm με μέγιστη ισχύ εξόδου 1mW και έναν μετρητή ισχύος (power meter), ο οποίος καταγράφει το σήμα εξόδου, όπως απεικονίζεται στο παρακάτω σχήμα 15.



Σχήμα 14: Σχηματικά η πειραματική διάταξη ανίχνευση σε υγρά.



Σχήμα 15: Πειραματική διάταξη λειτουργίας αισθητήρα στο Εργαστήριο Φωτονικής για Νανοεφαρμογές του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών.

Ο αισθητήρας δοκιμάστηκε διαδοχικά χρησιμοποιώντας αραιωμένα διαλύματα λυσοζύμης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις προκειμένου να προσδιοριστεί το χαμηλότερο όριο ανίχνευσης, το οποίο προσδιορίστηκε στα $0.5 \times 10^{-3} \text{g/ml}$. Για να υπάρχει μια καλή στατιστική των μετρήσεων, το πείραμα για κάθε συγκέντρωση επαναλήφθηκε δέκα φορές λαμβάνοντας τη μέση τιμή των μετρήσεων. Τα αποτελέσματα παρατίθενται παρακάτω. Προκειμένου να ενισχυθεί η απόκριση του αισθητήρα, το ενεργό κομμάτι της οπτικής ίνας στο οποίο έχει εναποτεθεί το συμπολυμερικό υλικό SPS-b-PtBS, βυθίστηκε σε υδατικό διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου (NaOH) για δέκα δευτερόλεπτα ενώ στη συνέχεια στέγνωσε με τη βοήθεια ροής αζώτου. Κατά την παρασκευή του συμπολυμερικού υλικού (ειδικότερα κατά τη σουλφόνωση) δημιουργούνται ομάδες σουλφονικού οξέος SO_3H , συνεπώς η εμφάνιση της ίνας σε υδροξείδιο του νατρίου έχει ως αποτέλεσμα μία αντίδραση βάσης/οξέος και την παραγωγή ομάδων SO_3Na πάνω στο συμπολυμερικό υλικό. Στη συνέχεια το επεξεργασμένο κομμάτι με τη βοήθεια απιονισμένου νερού καθαρίστηκε και επαναλήφθηκαν πάλι αντίστοιχα πειράματα στα αραιωμένα διαλύματα λυσοζύμης παρατηρώντας μια αξιοσημείωτη βελτίωση της μετρούμενης απόκρισης όπως παρουσιάζεται παρακάτω. Ο μηχανισμός ανίχνευσης βασίζεται στη διαφοροποίηση της κυματοδηγησης του φωτός μέσα στην ίνα, ανάλογα με τις μεταβολές που υπόκειται ο δείκτης διάθλασης του εξωτερικού περιβάλλοντος, αλλάζοντας την τιμή των απωλειών στην ισχύ. Η βασική διεργασία από φυσικής πλευράς είναι η τροποποίηση των συνθηκών κυματοδηγησης μέσω κάμψης (bend) της οπτικής ίνας ώστε το εγκλωβισμένο στον πυρήνα οπτικό πεδίο/δέσμη να εξέλθει μερικώς προς τον μανδύα και εκεί στο εξωτερικό περιβάλλον. Αυτή η διεργασία αυξάνει τις απώλειες

διάδοσης του φωτός και δημιουργεί ένα τρόπο αλληλεπίδρασης του φωτός με το περιβάλλον, εκεί όπου βρίσκεται η παράμετρος προς μέτρηση. Η κυματοδήγηση του φωτός συμβαίνει για ένα βασικό ρυθμό (fundamental mode) συνεπώς στην πολύτροπη ίνα λόγω των οριακών συνθηκών που επιβάλλονται στο κύμα από τον κυματοδηγό, δημιουργούνται ρυθμοί κυματοδήγησης (transverse modes) που ουσιαστικά είναι πιο ευάλωτοι στο να εξέλθουν από τον πυρήνα αυξάνοντας τις απώλειες φωτός. Οι απώλειες αυτές γίνονται ακόμα μεγαλύτερες με την κάμψη της οπτικής ίνας. Με αυτόν τον τρόπο καταφέρνουμε το φως τελικά να μην χάνεται αλλά να αλληλεπιδρά με το ενεργό υλικό.

Εκτός από την αύξηση των απωλειών, ο μηχανισμός ανίχνευσης στηρίζεται και στην αλληλεπίδραση του αποσβενυόμενου πεδίου (evanescent field) με το εναποθετειμένο ενεργό υλικό. Για να διαπιστώσουμε αν πράγματι συμβαίνει αυτή η αλληλεπίδραση θα πρέπει να λάβουμε υπόψη δύο παραμέτρους. Η μία παράμετρος εξαρτάται με το πώς αλλάζει ο δείκτης διάθλασης του τμήματος του περιβλήματος (cladding) που κάμπτεται πάνω στο οποίο έχει εναποτεθεί το ενεργό υλικό, κάτι το οποίο καθορίζει πόσα higher-orders modes ανακλώνται ή εξέρχονται από το κομμάτι αυτό. Η άλλη παράμετρος σχετίζεται με το αν το πάχος του περιβλήματος είναι μικρότερο από το βάθος διείσδυσης (penetration depth) γιατί μόνο τότε μπορεί να υπάρξει αλληλεπίδραση μεταξύ του αποσβενυόμενου κύματος και του ενεργού υλικού. Ο προσδιορισμός βέβαια του πάχους του στρώματος του υλικού που εναποτίθεται είναι πολύ δύσκολος λόγω της καμπυλωμένης επιφάνειας η οποία δεν επιτρέπει την χρησιμοποίηση κλασικών μεθόδων μέτρησης, όπως π.χ προφίλομετρίας.

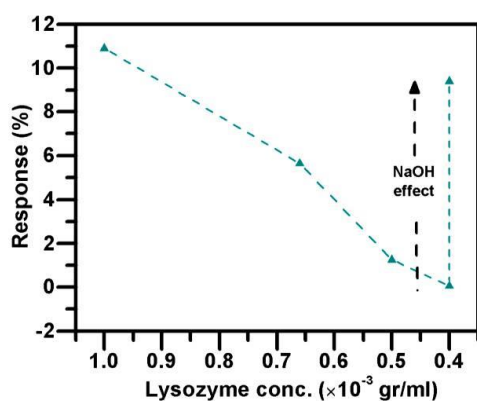
Ειδικότερα η ανίχνευση στα συγκεκριμένα πειράματα στηρίζεται στο γεγονός ότι το συμπολυμερές SPS-b-PtBS λόγω της αρνητικά φορτισμένης SPS συστάδας του αλληλεπιδρά ηλεκτροστατικά με τη θετικά φορτισμένη λυσοζύμη στο υδατικό διάλυμα. Με αυτόν τον τρόπο δημιουργείται ένα παχύτερο στρώμα πολυμερούς/πρωτεΐνης πάνω στην καμπυλωμένη επιφάνεια της οπτικής ίνας, το οποίο με τη σειρά του προκαλεί μεταβολές στο δείκτη διάθλασης του υλικού. Λόγω της ηλεκτροστατικής φύσης της αλληλεπίδρασης, μόνο η επιφάνεια των υλικών επηρεάζεται, ενώ ο κύριος όγκος του υλικού παραμένει ανεπηρέαστος. Η αλλαγή του δείκτη διάθλασης του υλικού μεταβάλλει τον οπτικό δρόμο και τις απώλειες απορρόφησης, κάτι το οποίο αποτυπώνεται στην ένταση του σήματος εξόδου. Ο μηχανισμός λοιπόν, οφείλεται σε ηλεκτρικές δυνάμεις έλξης, όπου έχουμε την ειδική

περίπτωση των ιονταλλακτών και έχουμε συγκράτηση των ιόντων στην επιφάνεια του υλικού από αντίθετα ηλεκτροστατικά φορτία καταλήγοντας σε μία ηλεκτροστατικά οδηγούμενη προσρόφηση.

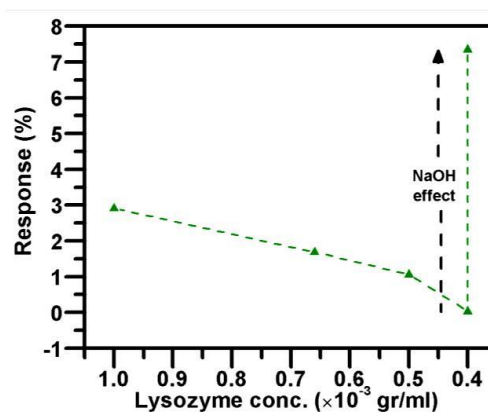
Οι διαδοχικές μετρήσεις έδειξαν εξαιρετική επαναληψιμότητα όσον αφορά την απόκριση του αισθητήρα. Η απόκριση του αισθητήρα στην λυσοζύμη παρουσία τόσο του ρυθμιστικού διαλύματος όσο και του αποσταγμένου νερού φαίνεται στα παρακάτω διαγράμματα (Σχήμα 16). Η απόκριση του αισθητήρα ορίζεται ως :

$$Response = \frac{I_{signal} - I_{reference}}{I_{reference}} \times 100\%$$

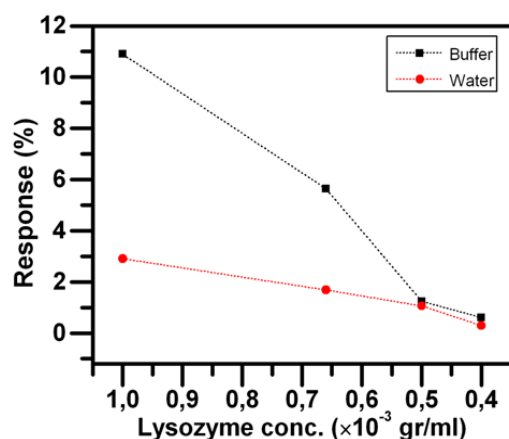
όπου στην περίπτωση του ρυθμιστικού διαλύματος έφτασε το 10% ενώ στην περίπτωση του νερού το 3%.



(α)



(β)



(γ)

Σχήμα 16: Η απόκριση του αισθητήρα στη λυσοζύμη αραιωμένη (α) σε ρυθμιστικό διάλυμα (buffer solution), (β) σε νερό σε διάφορες συγκεντρώσεις και (γ) η συγκριτική απόκρισή τους.

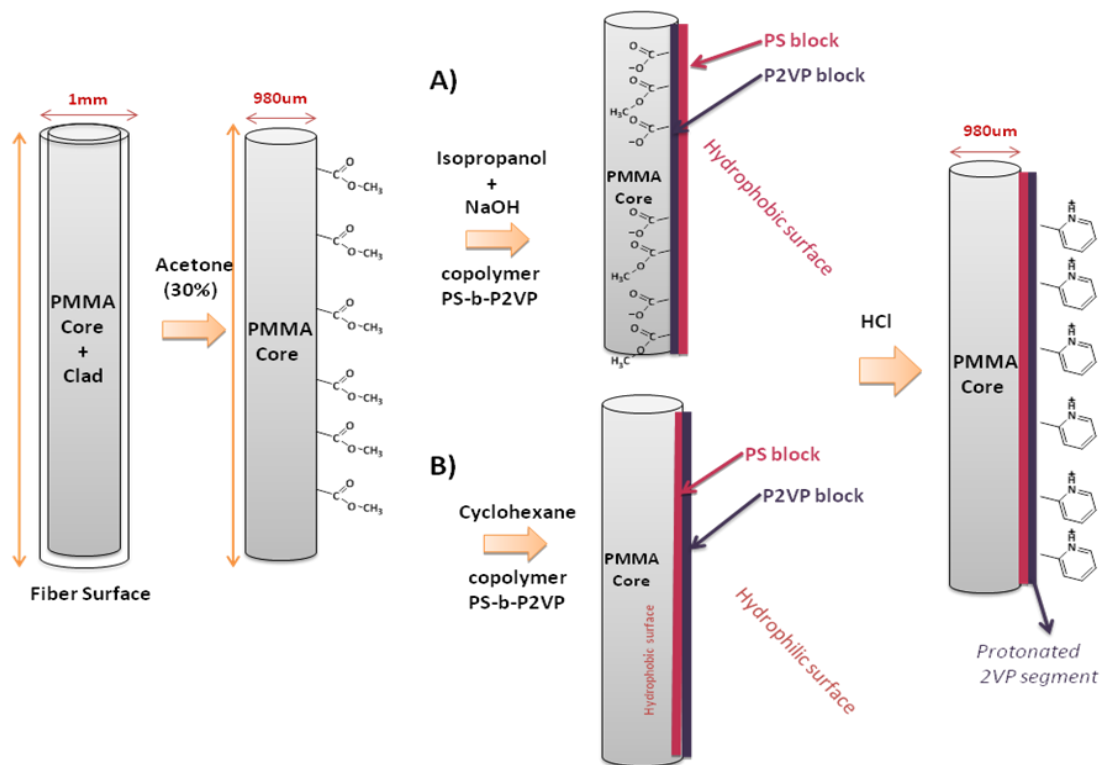
Η αύξηση της απόκρισης με την εμβάπτιση της οπτικής ίνας σε υδατικό διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου (NaOH) ήταν σχεδόν δεκαπλάσια για το ρυθμιστικό διάλυμα και οκταπλάσια για το διάλυμα νερού.

Συνοψίζοντας, διαμορφώθηκε κατάλληλα μία πολυμερική οπτική ίνα προκειμένου να λειτουργήσει ως αισθητήρας, όπου ανιχνεύθηκαν επιτυχώς χαμηλά επίπεδα συγκέντρωσης λυσοζύμης από $0.5 \times 10^{-3} \text{g/ml}$ μέχρι $1 \times 10^{-3} \text{g/ml}$ με σχεδόν ακαριαίους χρόνους απόκρισης, λόγω της ηλεκτροστατικής φύσης του μηχανισμού που περιγράφηκε, σε ένα εύρος απόκρισης (0-11%) για το ρυθμιστικό διάλυμα και (0-7,5%) για το νερό. Η αυξημένη απόκριση στην περίπτωση του ρυθμιστικού διαλύματος (buffer solution) δίνει μια ρεαλιστική εικόνα της απόκρισης του αισθητήρα εξομοιώνοντας τη συμπεριφορά του σε πραγματικά βιολογικά υγρά και συστήματα. Από τα παραπάνω πειράματα, παρουσιάστηκε μια νέα προσέγγιση στην ανίχνευση της λυσοζύμης χρησιμοποιώντας μια πολυμερική οπτική ίνα (POF) σε κατάλληλη κάμψη (bend). Στον αισθητήρα εναποτέθηκε το συμπολυμερές SPS-b-PtBS ως ευαίσθητο υλικό, λόγω της ισχυρής ηλεκτροστατικής αλληλεπίδραση που προκαλείται με την παρουσία της λυσοζύμης. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η διάταξη αυτή είναι αποτελεσματική, χαμηλού κόστους, με χαμηλές απαιτήσεις ενέργειας, ενεργειακά αυτόνομη, επαναχρησιμοποιήσιμη και αποτελεί ένα αρχικό βήμα για περαιτέρω έρευνα.

B. Ανίχνευση BSA με τα συμπολυμερή PS-b-P2VP και PS-r-P2VP

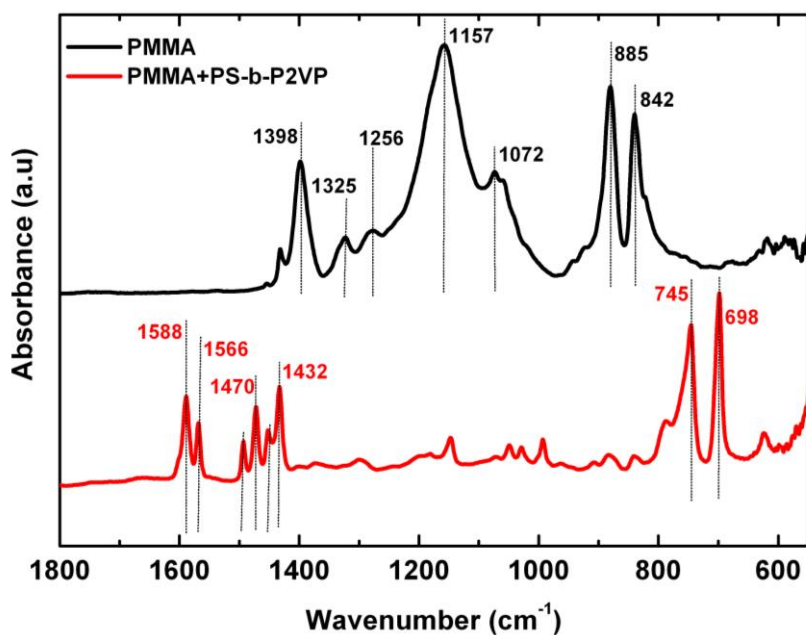
Με αντίστοιχη πειραματική διάταξη και διαδικασία επιτεύχθηκε η ανίχνευση της πρωτεΐνης Bovine Serum Albumin (BSA) χρησιμοποιώντας ως ενεργό υλικό το δισυσταδικό συμπολυμερές PS-b-P2VP και το αντίστοιχο τυχαίο συμπολυμερές PS-r-P2VP.

Για την ενεργοποίηση και ευαισθητοποίηση της επιφάνειας της πολυμερικής οπτικής ίνας ακολουθήθηκαν δύο διαφορετικοί τρόποι οι οποίοι περιγράφονται εποπτικά στο παρακάτω σχήμα 17.



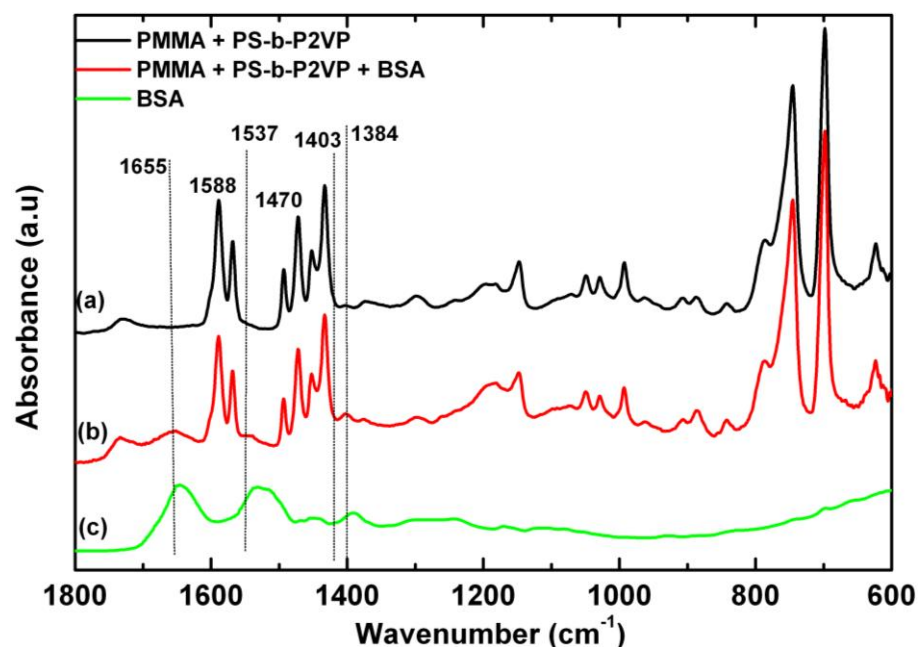
Σχήμα 17: Σχηματική αναπαράσταση διαδικασίας ευαισθητοποίησης της επιφάνειας της πολυμερικής ίνας όταν χρησιμοποιούνται το δισυσταδικό συμπολυμερές PS-b-P2VP και το αντίστοιχο τυχαίο συμπολυμερές PS-r-P2VP ως ενεργά συστατικά για την ανίχνευση της πρωτεΐνης BSA.

Η επιτυχής ενεργοποίηση της οπτικής ίνας μετά την προσκόλληση του συμπολυμερούς πιστοποιήθηκε φασματοσκοπικά όπως επιδεικνύεται στο παρακάτω σχήμα 18, μέσω της παρουσίας των σχετικών χαρακτηριστικών κορυφών.



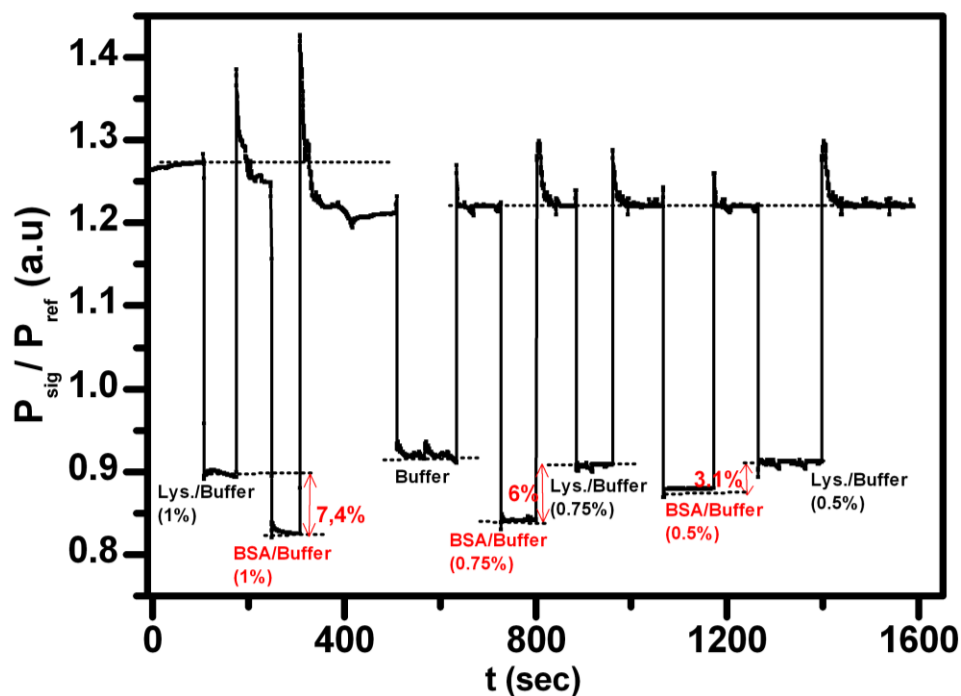
Σχήμα 18: Φάσμα ATR-FTIR του πυρήνα της ίνας PMMA πριν και μετά την εναπόθεση του συμπολυμερούς PS-b-P2VP.

Στο επόμενο στάδιο η επιτυχής δέσμευση της πρωτεΐνης BSA από την επιφάνεια της ευαισθητοποιημένης οπτικής ίνας πιστοποιήθηκε επίσης φασματοσκοπικά όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα 19.



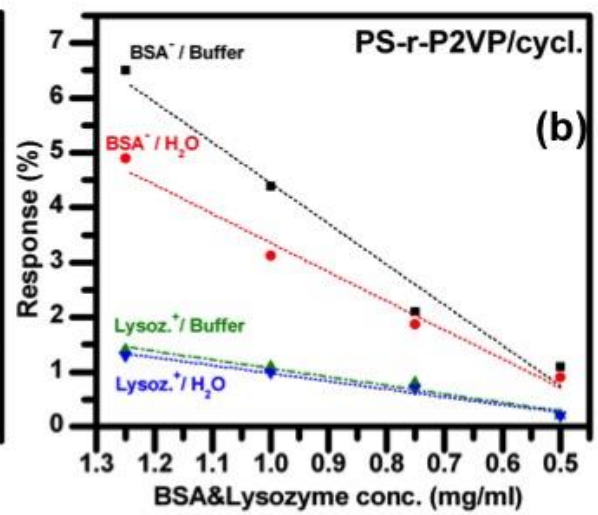
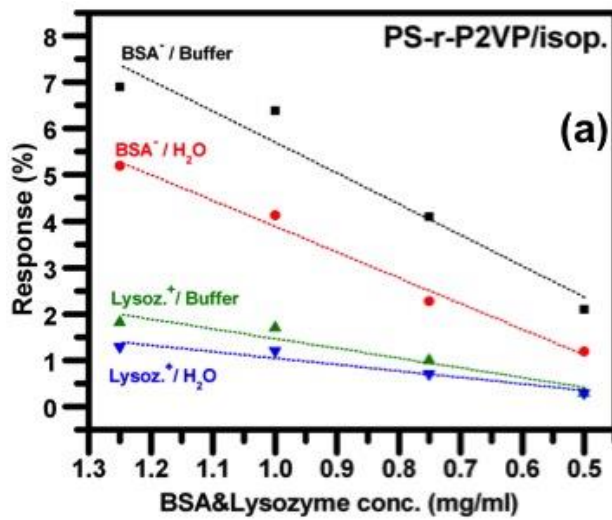
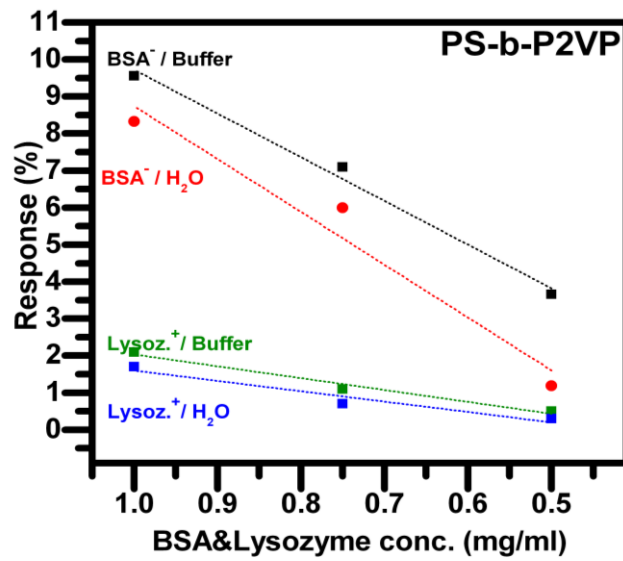
Σχήμα 19: Φάσμα ATR-FTIR της αισθητήριας κεφαλής της ίνας με το συμπολυμερές πριν (μαύρη γραμμή) κα έπειτα (κόκκινη γραμμή) την προσρόφηση BSA, καθώς και το ATR-FTIR φάσμα της BSA (πράσινη γραμμή). Οι κορυφές στα 1655, 1537 και 1384 cm⁻¹ σχετίζονται με την προσρόφηση BSA.

Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα χρονικής απόκρισης στην ανίχνευση λυσοζύμης και BSA, όπου επιδεικνύεται η μεγάλη απόκριση στην ανίχνευση της BSA σε σχέση με τη λυσοζύμη καθώς και η πλήρως αντιστρεπτή διαδικασία. Ο χρόνος απόκρισης είναι σχεδόν στιγμιαίος λόγω της ηλεκτροστατικής φύσης λειτουργίας του αισθητήρα. Ο χρόνος επαναφοράς είναι επίσης μόνο μερικά δευτερόλεπτα.



Σχήμα 20: Χρονική απόκριση αισθητήρα κατά την ανίχνευση λυσοζύμης και BSA.

Τα αποτελέσματα απόκρισης της λειτουργίας του αισθητήρα στην ανίχνευση της BSA, καθώς και της μικρής υπολειμματικής απόκρισης στην παρουσία της θετικά φορτισμένης λυσοζύμης φαίνονται στο παρακάτω σχήμα 21 (άνω διάγραμμα). Αναλυτικότερα η απόκριση είναι ισχυρότερη με τη χρήση του συμπολυμερούς κατά συστάδες PS-b-P2VP έναντι του τυχαίου συμπολυμερούς υλικού PS-r-P2VP. Η ευαισθητοποίηση της οπτικής ίνας με τους δύο διαφορετικούς τρόπους υλοποιήθηκε με τη χρήση PS-r-P2VP με ισοπροπανόλη και κυκλοεξάνιο και παρουσιάζεται στα σχήματα 21 (a) και (b) (κάτω διαγράμματα).



Σχήμα 21: Απόκριση οπτικού αισθητήρα με χρήση PS-b-P2VP (πάνω) και έναντι του τυχαίου συμπολυμερούς PS-r-P2VP (κάτω).