

Διεργασίες σχηματοποίησης και χημικής τροποποίησης υποστρωμάτων για τη δημιουργία βιοψηφίδων για εφαρμογές στη βιο-νανοτεχνολογία

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Υποστρώματα που είναι ικανά να ακινητοποιήσουν βιομόρια χωρίς όμως να επηρεάσουν την βιολογική τους δράση παρουσιάζουν σημαντικό ενδιαφέρον στη βιο-νανο-τεχνολογία, δεδομένου ότι αφενός χρησιμοποιούνται κατά κανόνα σε μικροσυστοιχίες DNA ή πρωτεϊνών, και αφετέρου μπορεί να προάγουν την προσκόλληση και εξάπλωση κυττάρων πάνω σε αυτά και έτσι, για παράδειγμα, να επιτρέψουν την δημιουργία βελτιωμένων επαφών ανάμεσα σε ιατρικά εμφυτεύματα και περιβάλλοντα κύτταρα. Στο πλαίσιο αυτό αναπτύχθηκε καινοτόμος μεθοδολογία κατασκευής μικροσυστοιχιών πρωτεϊνών (protein microarrays) πάνω σε ψηφίδες πυριτίου ή γυαλιού που βασίζεται σε μικρο- και νανο-λιθογραφικές διαδικασίες σε συνδυασμό με χημική ή/και τοπογραφική τροποποίηση επιλεγμένων περιοχών της ψηφίδας. Η προτεινόμενη μέθοδος επιτυγχάνει την αποτύπωση πρωτεϊνικών κηλίδων με ελάχιστη διάμετρο 200nm, δηλαδή την κατασκευή μικρο-συστοιχιών πυκνότητας τουλάχιστον 10^6 φορές μεγαλύτερη από αυτήν που επιτρέπουν σύγχρονες βιομηχανικές μέθοδοι απόθεσης πρωτεϊνών. Για τη χημική τροποποίηση των εν λόγω υποστρωμάτων, χρησιμοποιήθηκε η επιλεκτική εγχάραξη ή απόθεση (με πλάσμα) υμενίων πάνω σε επιφάνειες κατάλληλης χημικής σύστασης ώστε να εισάγονται λειτουργικές ομάδες, χημικά συγγενείς με βιολογικά μόρια, πάνω σε τρισδιάστατες τοπογραφίες, ώστε να καθοριστούν επιλεκτικά οι περιοχές επικόλλησης των πρωτεϊνών, ενώ ταυτόχρονα να αποφευχθεί η προσρόφηση πρωτεϊνών σε άλλες. Η επιλεκτική ακινητοποίηση πρωτεϊνών ελέγχθηκε με χρήση πρότυπων δεσμευτικών αντιδράσεων και ανίχνευση με χρήση ειδικών δεσμευτικών μορίων επισημασμένων με φθορίζοντα μόρια.

Αρχικά, αναπτύχθηκαν πρωτεϊνικές μικροσυστοιχίες σε πρότυπα υποστρώματα σχηματοποιημένων κηλίδων SiO_2 σε επιφάνεια Si. Μετά την επιλεκτική τροποποίηση με πλάσμα C_4F_8 και την εναπόθεση πρωτεϊνικού διαλύματος στο σύστημα υποστρωμάτων, οι πρωτεΐνες ακινητοποιούνται επιλεκτικά στις περιοχές του SiO_2 . Το συγκεκριμένο σύστημα παρουσίασε εξαιρετική συμπεριφορά ως προς την εκλεκτικότητα, την ομοιομορφία κηλίδων και την πυκνότητα των μικροσυστοιχιών. Περαιτέρω, με χρήση λιθογραφίας κολοειδών κατασκευάστηκαν νανοκηλίδες SiO_2 διάστασης 250-300nm και πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός του στρώματος πρωτεΐνης που ακινητοποιείται επιλεκτικά στις νανοκηλίδες SiO_2 . Προκειμένου να επιτευχθεί δημιουργία πρωτεϊνικών μικροσυστοιχιών σε υποστρώματα γυαλιού έγινε σχηματοποίηση με φωτολιθογραφία τριών φωτοπολυμερικών υλικών σε γυαλί και χημική τροποποίηση σε πλάσμα. Στα υποστρώματα αυτά επιτεύχθηκε ακινητοποίηση και ανίχνευση των μεταλλάξεων G1738R, 5382insC, 3741insA και 3099delT στο γονίδιο BRCA1. Τα υποστρώματα μελετήθηκαν ως προς της διάκριση υγιούς (άγριου) και μεταλλαγμένου τύπου των αλληλουχιών και συγκρίθηκαν με εμπορικά υποστρώματα αναφοράς (ύαλοι πολυστυρενίου και τροποποιημένα με επόξυ-σιλάνιο πλακίδια). Τα τροποποιημένα υποστρώματα παρουσίασαν εξαιρετική σταθερότητα, μεγάλο σήμα, και υψηλούς λόγους διαχωρισμού και διάκρισης σήματος φθορισμού για όλες τις αλληλουχίες των μεταλλάξεων σε σχέση με τα πλακίδια αναφοράς.