



M Ű E G Y E T E M 1 7 8 2

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

Villamosmérnöki és Informatikai Kar

Elektronikai Technológia Tanszék

**Bakteriumok kimutatása optikai
hullámvezető fénymódus spektroszkópiával
(OWLS) polikarbonáttal és antitestekkel
bevont szenzorfelületeken**

Készítette:

Tarr Róbert Dániel

Konzulensek:

Nagy Ágoston Gábor

Dr. Bonyár Attila

Farkas Enikő

Energiatudományi Kutatóközpont

Műszaki Fizikai és Anyagtudományi Intézet

2019

Tartalomjegyzék

1	Absztrakt	4
2	Bevezetés	5
2.1	Célkitűzés	6
3	Elméleti háttér	6
3.1	Optikai Hullámvezető Fénymódus Spektroszkópia	6
3.1.1	OWLS működésének elmélete	6
3.1.2	OWLS műszer felépítése	8
3.1.3	Mérés menete	9
3.2	Felületi adszorpció	10
3.3	Profilometria	11
3.4	Atomerő mikroszkópia	12
3.5	Ellipszometria	13
4	Anyagok és protokollok	14
4.1	Alkalmazott vegyszerek	14
4.2	Felületkezelés	15
4.2.1	Tisztítás	15
4.2.2	Szilanizálás GOPS használatával	15
4.2.3	Szilanizálás APTES használatával	16
4.2.4	Oldatkészítés	16
4.2.5	Polimer rétegek leválasztása	16
4.3	Mérési protokollok	17
4.3.1	Ellipszometria	17
4.3.2	AFM	17

4.3.3	Vizelet adszorpciója PC rétegen	17
4.3.4	E.Coli adszorpció COP rétegre	17
4.3.5	E.Coli adszorpciója blokkolás után	18
5	Eredmények	18
5.1	Rétegek karakterizálása	18
5.1.1	Profilometria	18
5.1.2	Ellipszometria	20
5.1.3	Atomerőmikroszkópos ellenőrzés	23
5.2	OWLS mérések	29
5.2.1	Vizelet adszorpciója PC rétegen	29
5.2.2	E.Coli adszorpciója COP rétegre	30
5.2.3	E.Coli adszorpciója blokkolás után	31
6	Összefoglalás	34
7	Irodalomjegyzék	36

1 Absztrakt

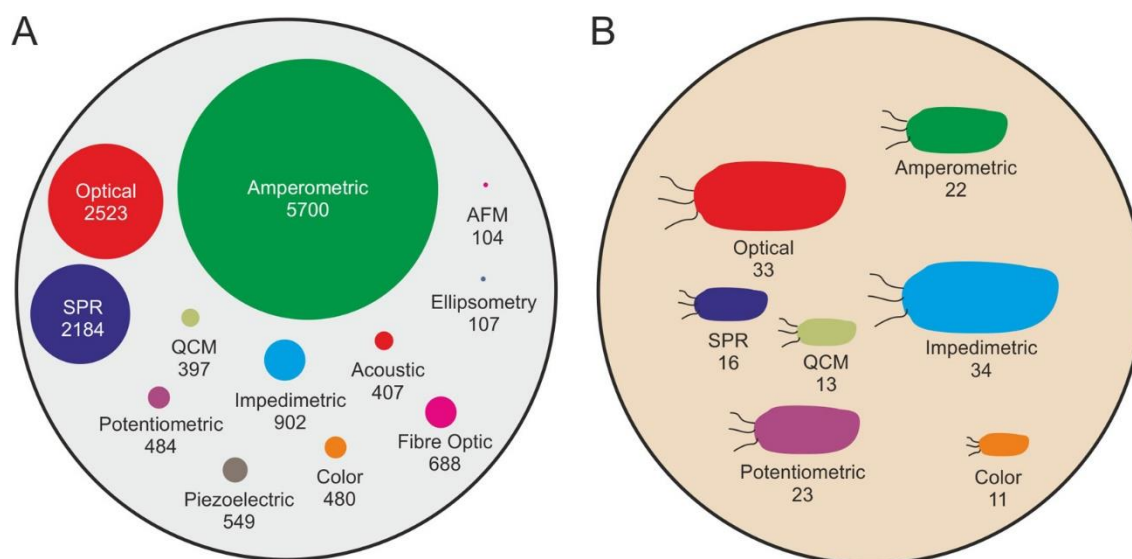
A baktériumok kimutatása különböző oldatokban, folyadékokban fontos mind az élelmiszeripar, mind az egészségügy szempontjából. Ezen alkalmazásokban az optikai hullámvezető fénymodus spektroszkópia, avagy angolul Optical Waveguide Lightmode Spectroscopy (OWLS) egy ígéretes jelölésmentes módszer, amely akár a baktériumoknál kisebb fehérjék felületi kitapadásának valós idejű mérésére is használható. Az érzékelés, egy nagy törésmutatójú hullámvezető rétegben terjedő módusok effektív törésmutatóinak pontos mérésén alapul. Előnye, hogy segítségével a kitapadt réteg három tulajdonsága, a felületegységre eső kitapadt tömeg, a kitapadt réteg vastagsága és törésmutatója is meghatározható. [1]

A technika alapvetően a hullámvezető felülethez jól tapadó, kisméretű molekulák (5-50 nm) detektálására optimális, a baktériumok érzékelésére számos kihívást rejt. Többek között a baktériumok pontos méréséhez előzetes és specifikus felületkezelés szükséges. Az érzékelő réteg felvitele során kritikus a megfelelő felületi vastagság, illetve a minimális felületi érdesség elérése.

Munkám során polimer nanorétegek és antitestek felviteli eljárásának optimalizálása volt a fő céлом. A felviteli lépések ellenőrzése kiemelkedően fontos volt a folyamat szempontjából, ezért minden lépés után több módszerrel is vizsgáltuk a kialakított réteg vastagságát és egyenletességét (pl. AFM, profilometria, ellipszometria). A baktérium detektálás igazolására pedig E-Coli baktérium adszorpcióját vizsgáltuk az előkészített szenzor chippek segítségével.

2 Bevezetés

A baktériumok kimutatása nagy szerepet játszik az élelmiszeriparban és az egészségügyben egyaránt, mivel a kórházi fertőzések számát csökkenteni és az élelmiszer biztonságot pedig növelni szeretnénk, illetve a gyógyszerfejlesztésben is komoly szerepe van az ilyen jellegű kutatásoknak. Azonban ez különböző nehézségekbe ütközik, mivel nem steril környezetből, hanem vér-, vizelet- vagy más szennyezett mintából kell kiindulni és méréseket végezni. Így természetes, hogy minél gyorsabb, hatékonyabb és pontosabb módszereket szükséges kidolgozni a szenzorika területén. Mivel már molekuláris mérésekhez régóta használatban vannak a bioszenzorok, ezért a technika és műszerek fejlődésével kézenfekvő lett, hogy a költséghatékonyság, gyorsaság és megfelelő pontosság miatt ezeket alkalmazzák baktériumok detektálására is. Az ilyen szenzorok érzékelési folyamata többségében, felületi adszorpción alapul, amely molekulák, sejtek, vagy jelen esetben baktériumok szilárd felületre történő kitapadását jelenti. Azért is hatékonyak ezek a módszerek, mert a felületre kitapadt baktérium mennyiségének függvényében bizonyos fizikai jellemzők változása (pl.: áramerősség, fénytörési mutató, impedancia) jól megfigyelhető és pontosan mérhető. Több módszert is kidolgoztak a hordozón megtapadt anyagok mennyiségének meghatározására (1.ábra). Ezen módszerek közül az optikai bioszenzorok, jelentős részét adják a bakteriális adszorpció témájú kutatásoknak és megjelent publikációknak. Az optikai bioszenzorokon belül, az az optikai hullámvezető fénymódus spektroszkópia egyik előnye, hogy nagy érzékenységgel rendelkezik, így kis mennyiségben jelenlévő anyagokat ki tud mutatni egy oldatból. [1] [2]



1.ábra [1]

Publikációk a bioszenzorokról általában(A) összevetve a teljes baktériumok detektálásról szólókkal(B). A körök mérete arányos az adott módszerrel elvégzett kísérletek számával

2.1 Célkitűzés

Dolgozatomban szeretném bemutatni az optikai hullámvezető fénymódus spektroszkópia (OWLS) technológiáját részletesebben is. Összefoglalom, hogy milyen fizikai jelenség áll a mérések mögött, és milyen kihívásokat kell megoldani a megfelelő pontosság, illetve a baktériumok hatékony érzékelésének érdekében. Célunk egy olyan fluidikai kazetta létrehozása volt, amiben áramlás fenntartása mellett lehetséges adszorpciós méréseket végezni. Ehhez a kitapadás elősegítésére a chip felületén polimer vékonyréteget hoztunk létre. A réteg megvalósítására kétfajta anyag alkalmazása merült fel, polikarbonát (PC) és a ciklikus olefin polimer (COP). Ezeket folyékony oldat formájában vittük a lapkákra. A felviteli lépések a két anyag esetében megegyeztek. Ezeket a lépéseket ellenőriztük különböző módszerekkel, melyek eredményét és a műszerek működési elvét szintén ismertetném. Végül pedig baktérium adszorpciós méréssel szemléltetném, hogy a felvitt vékonyréteggel sikerült megfelelő bevonatot képezni a szenzorchipen baktériumok valós idejű érzékeléséhez.

3 Elméleti háttér

3.1 Optikai Hullámvezető Fénymódus Spektroszkópia

Az optikai hullámvezető fénymódus spektroszkópia, avagy angolul Optical Waveguide Lightmode Spectroscopy (OWLS) egy optikai elven működő, jelölésmentes módszer a felületi kitapadás valós idejű mérésére. Előnye, hogy egyszerre a kitapadt réteg három tulajdonsága, a felületegységre eső kitapadt tömeg, a kitapadt réteg vastagsága és törésmutatója is meghatározható a segítségével. [3]

3.1.1 OWLS működésének elmélete

A mérések alapja, hogy a szenzor chip felületén kialakított hullámvezető (waveguide) rétegbe becsatoljuk a gerjesztő He-Ne lézer sugarát egy, a hullámvezető felszínén létrehozott diffrakciós rács segítségével. A becsatolás eredményeképp sorozatos teljes visszaverődésekkel terjed a hullámvezetőben a fény. Ennek hatására két megvilágítási szög (α_{TE} , α_{TM}) ahol az egy teljes belső visszaverődési ciklus alatt a teljesfáziseltolódás nulla, rezonancia jelenség figyelhető meg, ami egy evanescens elektromágneses teret hoz létre a hullámvezető réteg felületén. Ez a tér a hullámvezető felület fölött nagyjából 100-200 nm magasságig terjed. A kialakuló rezonanciák esetén mérhető a maximális intenzitás a lapka széleinél a hullámvezető réteghez beállított fotódiódák segítségével. Az említett két szög az effektív törésmutatókkal n_{TE} és n_{TM} (tranzverzális elektromos és tranzverzális mágneses módus) jellemezhető, amelyek (1) szerint meghatározhatóak. Mivel az evanescens térben kitapadt anyag mennyisége megváltoztatja a törésmutatót a felület határán így változik az n_{TE} ,

az n_{TM} és a hozzájuk tartozó α_{TE} , illetve α_{TM} szög is, amit lehetséges kvantitatívan mérni. Folyamatosan mérve ezeket a szögeket, valós-idejű értékek határozhatók meg a felületi rétegekkel kapcsolatban, ami lehetővé teszi a kitapadási kinetika monitorozását is. A rezonancia szögekből, illetve a segítségükkel az (1) alapján számított effektív törésmutatók, és az oldat (puffer) törésmutatója (n_C) használatával (2) egyenlet alapján lehet kiszámolni a kitapadt réteg vastagságát és törésmutatóját (d_A ill. n_A). (4.ábra) A kitapadt anyag felületi tömegsűrűsége (m) az (1) és (2) eredményét felhasználva a (3) egyenlet alapján számítható, feltételezve, hogy a kitapadt anyag egybefüggő réteget alkot. Az érzékenység nagyon jónak mondható ($<1 \text{ ng/cm}^2$), azonban a baktériumok mérete általában minimum egy nagyságrenddel nagyobb, mint a létrejövő evaneszcens tér hullámvezetőre merőleges kiterjedése, ezért az érzékenység ilyen alkalmazásra nem mindig megfelelő, mert a sejtek csak egy része esik a mért térrészbe. [3] [4] [5] [6] [7]

$$n = n_{air} \sin \alpha + \frac{l\lambda}{\Delta}, \quad (1)$$

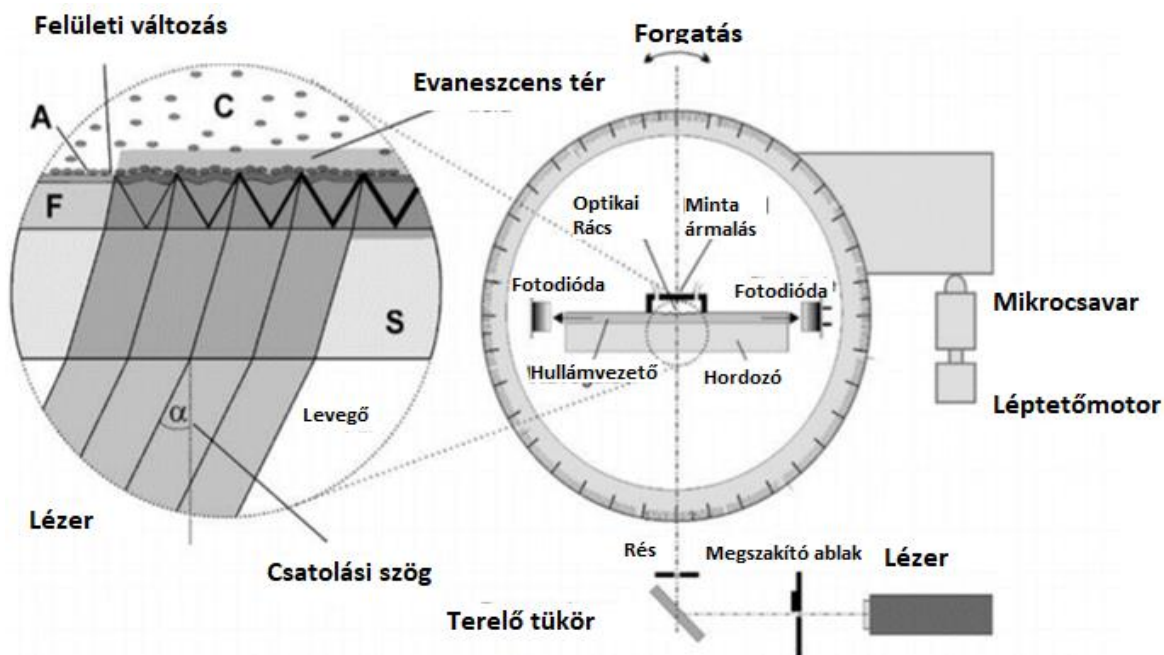
ahol n az effektív törésmutató, n_{air} a levegő törésmutatója, α a rezonancia szög, l diffrakció rendje, λ a lézer hullámhossza, Δ pedig a rácsállandó

$$0 = k \sqrt{n_F^2 - n^2} \left(d_F + \frac{n_A^2 - n_C^2}{n_F^2 - n_C^2} \left[\frac{\left(\frac{n}{n_C}\right)^2 + \left(\frac{n}{n_A}\right)^2 - 1}{\left(\frac{n}{n_C}\right)^2 + \left(\frac{n}{n_F}\right)^2 - 1} \right]^\rho d_A \right) - \tan^{-1} \left[\left(\frac{n_F}{n_C}\right)^{2\rho} \frac{\sqrt{n^2 - n_C^2}}{\sqrt{n_F^2 - n^2}} \right] - \tan^{-1} \left[\left(\frac{n_F}{n_S}\right)^{2\rho} \frac{\sqrt{n^2 - n_C^2}}{\sqrt{n_F^2 - n^2}} \right] \quad (2)$$

,ahol $k=2\pi/\lambda$, d_F , n_F a hullámvezető vastagsága, illetve törésmutatója, n_S a hordozó törésmutatója, n_C pedig a mérési közeg törésmutatója, $\rho=0$ elektromos módus esetén, $\rho=1$ mágneses módus esetén

$$m = d_A * \frac{n_A - n_C}{\frac{dn_p}{dc_p}} \quad (3)$$

ahol, d_A a kitapadt réteg vastagsága, n_A és n_C a kitapadt réteg és a puffer törésmutatója, dn_p/dc_p pedig a törésmutató növekedés (ami minden esetben mérhető függetlenül)

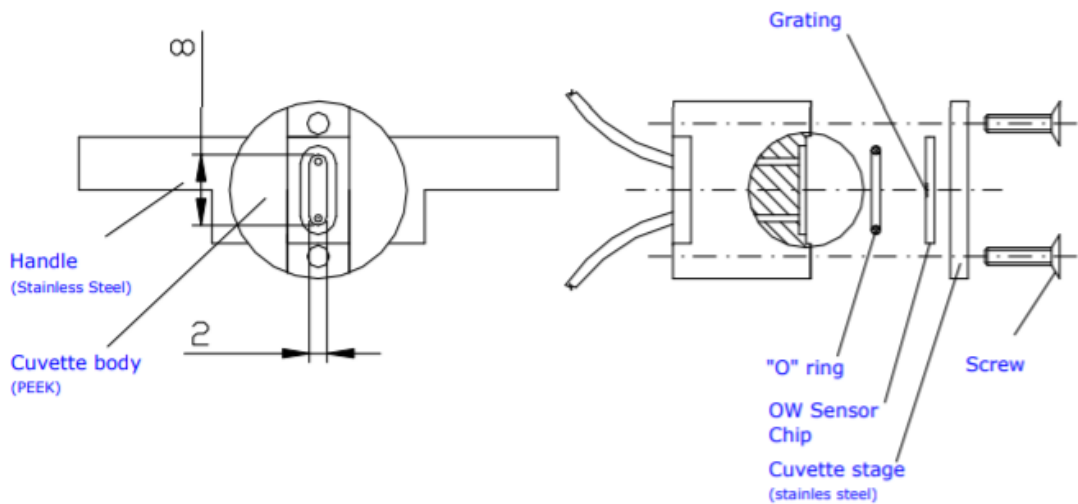


2.ábra

Az OWLS szenzor működése és felépítése [3]

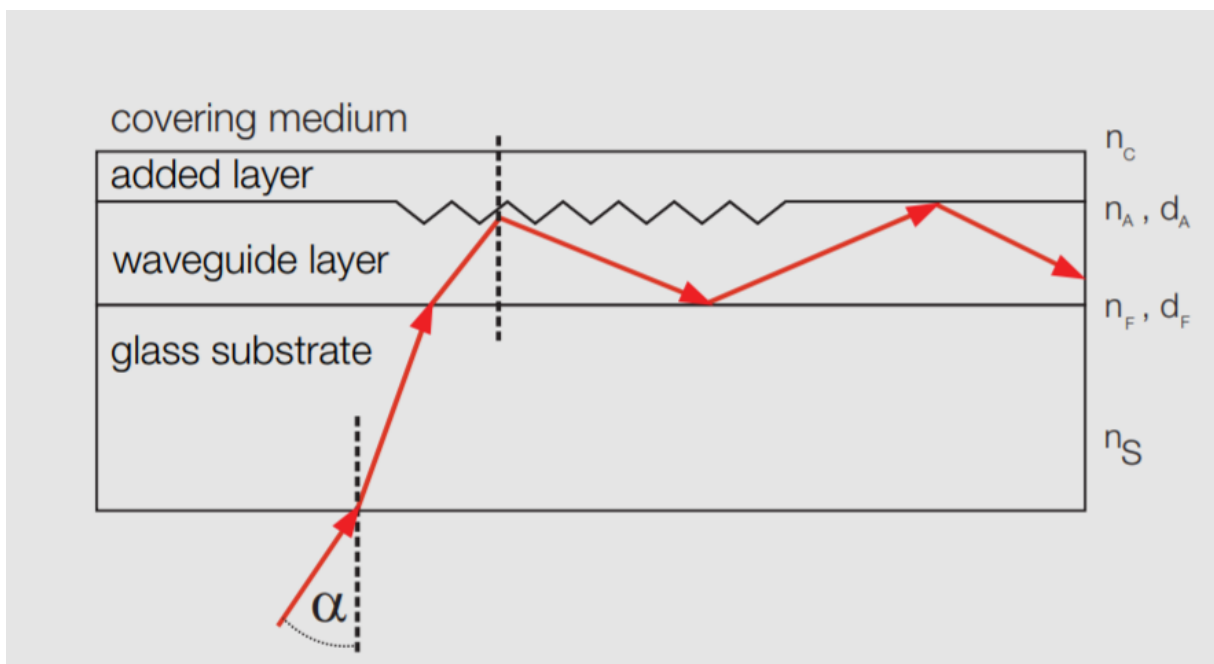
3.1.2 OWLS műszer felépítése

Az előbbieken megismert elvek fizikai megvalósítása és egy kompakt műszerben történő implementálása fontos a mérések egyszerű elvégzéséhez, ezért ismertetném az általunk használt MicroVacuum Ltd. által fejlesztett OWLS 210 típusú műszer felépítését. Ez a műszer képes az evaneszcens térbeli érzékeléssel együtt elektrokémiai mérésre is (EC-OWLS) is, de ezt a lehetőséget mi nem alkalmaztuk. A baktériumok kitapadása egy fluidikai cellában (küvetta) zajlik (3.ábra), mivel az adszorpció folyékony baktérium szuszpenziókból történik. A küvetta rendelkezik egy befolyó-, illetve kifolyónyílással, hogy áramoltatni lehessen a folyadékokat a mérés közben egy perisztaltikus pumpa segítségével. Továbbá a cella egyik oldalát maga az OWLS chip zárja le, a hullámvezető rétegével a cella felé fordítva, így a felületére tapadt réteg mérhető. A küvetta és a lapka között az oldat szivárgását egy O-gyűrű előzi meg, biztosítva a fluidika szigeteltségét. Maga a cella egy fém tartóegységen helyezkedik el, amit rögzíteni lehet a gépen egy kézcisvar segítségével. A gép ezen részét a beépített léptetőmotor mozgatja egyenletesen $+7^\circ$ és -7° között. Továbbá a műszer képes a hőmérséklet szabályozására 20°C - 80°C tartományban kisebb mint $0,1^\circ\text{C}$ pontossággal, illetve nagyjából $8^\circ\text{C}/\text{min}$ hűtési, illetve fűtési sebességgel. [8] [9]



3.ábra

A küvetta és a tartóegység felépítése [10]

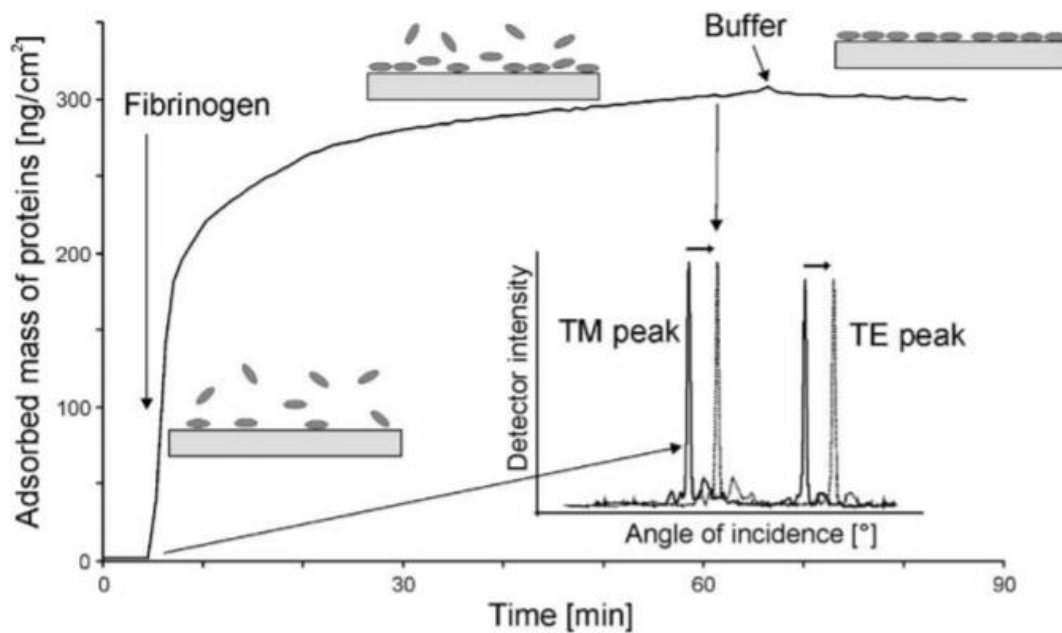


4.ábra Az OWLS chip struktúrája [11]

3.1.3 Mérés menete

A mérések három fő részből állnak (5.ábra), amik ismétlődhetnek egy hosszabb mérés során. Az első egy alapvonal felvétele nem kitapadó pufferben, aminek ideje alatt meg lehet határozni a tiszta chip, vagyis a hullámvezető réteg törésmutatóját (n_F) és a waveguide réteg vastagságát (d_F), így kiküszöbölhető chipek közötti eltérés a mérésből. A második lépés, az

ugyanebben a pufferben oldott anyag kitapadásának vizsgálata, ami szintén a törésmutatót (n_A) és rétegvastagságot vizsgálja (d_A), de a hullámvezető felületén lévő réteget. (4.ábra) A harmadik lépés pedig mosás, ismét a tiszta puffert felhasználva, ami azt szolgálja, hogy a kialakult réteg stabilitása megfigyelhető, illetve a ténylegesen a felülethez tapadt réteg n_A és d_A értéke is mérhető legyen. [3]



5.ábra OWLS mérés időbeni lezajlása és a rezonanciaszög eltolódása [9]

3.2 Felületi adszorpció

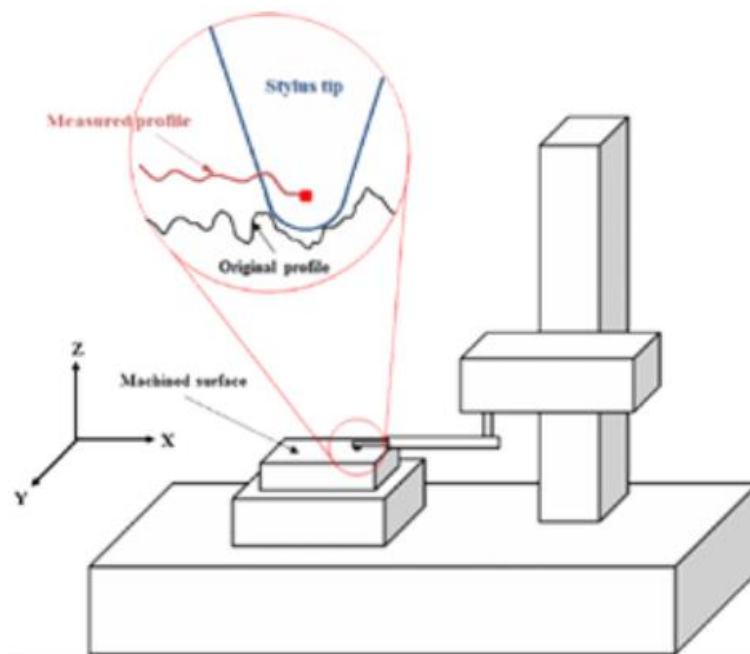
A baktériumok szenzorra való kitapadását elő lehet segíteni úgynevezett bioreceptorokkal, amelyek lehetővé teszik, hogy ligand-receptor kölcsönhatásokon keresztül a baktériumok könnyebben megtapadjanak a felületen így felerősítve a mérhető jelet (6. ábra). Ezek a receptorok a baktériumok estében a legtöbbször antigén specifikus antitestek. Az antitestek akárcsak az immunrendszerben, hozzákötődnek a baktériumon prezentált antigénekhez. Ezek alkalmazása azért indokolt, mert a tipikus baktériumokra érzékeny antitestek megnövelhetik a rendszer szelektivitását, specifikusságát. A felületre kikötött antitestek és a hozzájuk kapcsolódó baktériumok felületi adszorpciója változtatja meg esetünkben a törési mutatót, de más fizikai tulajdonságokat is, amiből a mintában lévő baktériumok mennyiségére és koncentrációjára, illetve az antigén-antitest kölcsönhatás erősségére és a kitapadt minta felületarányos tömegére lehet következtetéseket levonni. [1]



6.ábra A felületi adszorpció szemléltetése [12]

3.3 Profilometria

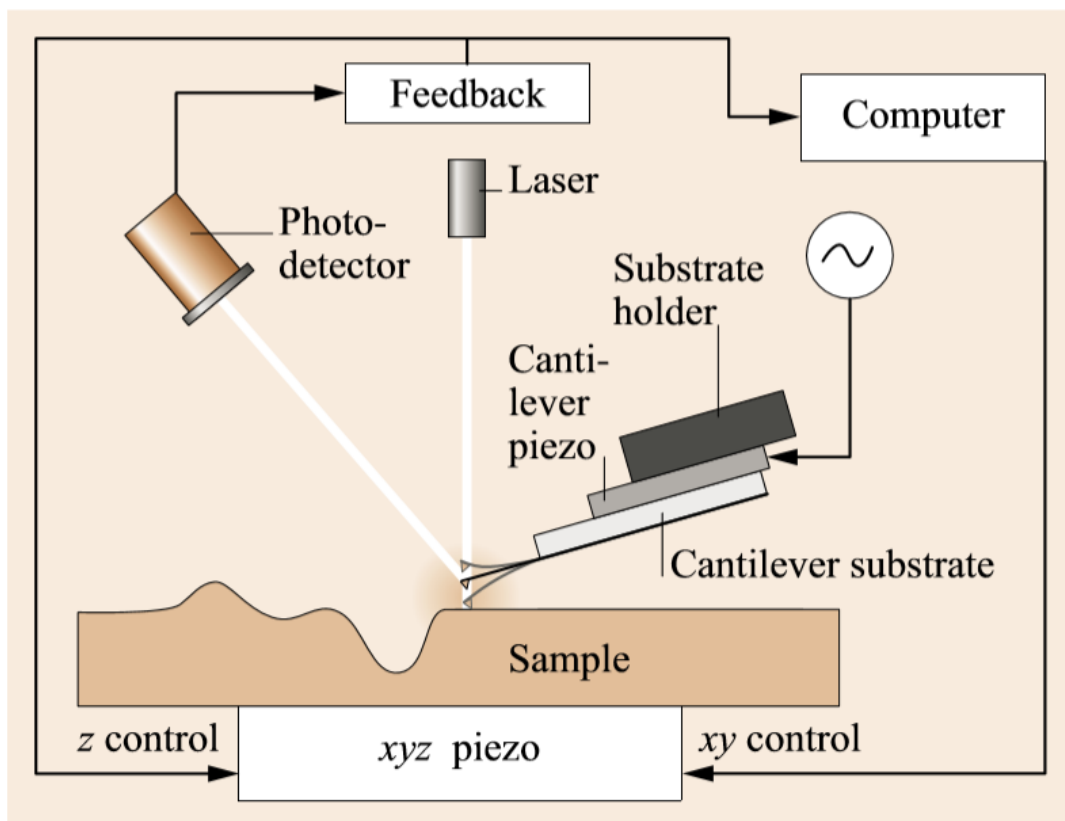
Az általunk használt ellenőrzési módszer a kontakt-profilometria (avagy angolul Stylus Profilometry) egy mérőfejet vagyis tűt mozgat a felület mentén, hogy a magasságról információt nyerjen. Ezt egy szabályozási kör segítségével valósítja meg mechanikusan, ami egy meghatározott nagyságú erőt tart a tűn a mérés közben, ezáltal a Z irányú elmozdulásokból a felszínre vonatkozó adatok következtethetők. Mivel a technika használatához kontaktusra van szükség így a puha felszínek esetén nem minden esetben lehetséges pontos mérést végezni a használatával (a réteg esetleges benyomása miatt). További hátránya, hogy roncsolni is képes az érzékenyebb felszíneket, illetve lassabb a kontaktmentes képest. [13] [14]



7.ábra A profilometria berendezés sematikus ábrája [14]

3.4 Atomerő mikroszkópia

Az atomerő mikroszkópia, vagyis atomic force microscopy (AFM) olyan képalkotó módszer, amely közel atomi felbontással képes képet készíteni a vizsgálni kívánt tárgyról. Ehhez egy piezoelektromosan mozgatott, ismert geometriájú és méretű tűvel pásztázzák a felszínt. Ez egy igen hegyes tű, melynek nem kell elektromosan vezetőnek lennie, de a keménysége elég nagy. Általában a tűk alapanyaga szilícium (Si), vagy szilícium-nitrid (SiN). A tömbi szilíciumból elektrokémiai-, vagy fókuszált ionsugarasmarással, illetve fotolitográfia segítségével alakítják ki a tű geometriáját így elérhető, hogy a hegyének görbületi sugara párszor 10 nm-es tartományba essen. [15] A tű egy rugós tartókonzolhoz van erősítve; az ebben ébredő erő mérése az AFM feladata. Mérésének alapja a tű és a felület között fellépő atomi vonzó és taszító erők hatására, a meghajló konzolra irányított, fókuszált lézervény kitérése. Ezt az elmozdulást egy négyszegmensű fotódetektor érzékeli. A detektor, már a rugólapka 0.01 nanométeres meghajlását is tudja mérni. Ebből adódik a műszer nagy érzékenysége. A fotodióda szegmensein mért feszültségből kiszámolható, hogy a lézervolt pontosan hova vetődik a detektor felületén, amiből már könnyen meghatározható a tű helyzete. [16]

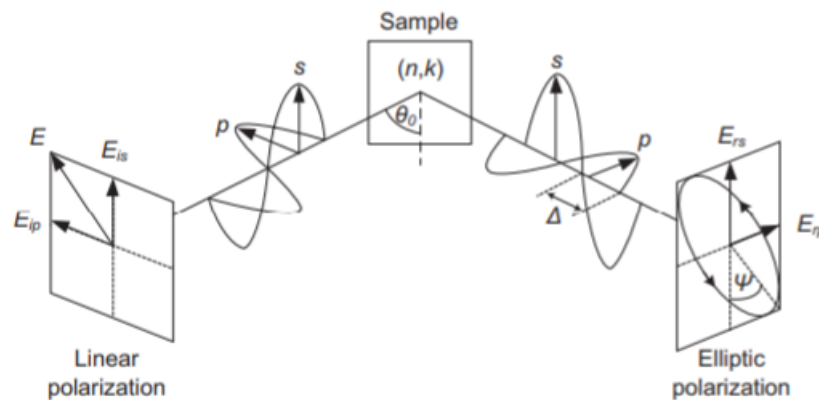


8.ábra AFM működésének szemléltetése [16]

Az AFM háromféle üzemmódban használható, amelyek a tű mozgatásának mikéntjében különböznek. Kontakt üzemmódban van a mintához legközelebb a tű hegye, ekkor erős taszítás jellemzi a tű-minta kölcsönhatást. Nem-kontaktus üzemmódban a tű hegye az erősen taszító tartományon kívül marad. Az ún. „tapping” vagy kopogtató üzemmódban a kontaktus és a nem kontaktus tartomány közt mozog a tű hegye. Az AFM a konzol elmozduláskor a fotodiódán létrejövő feszültségváltozást méri, amiből a számítógép segítségével állít elő kettő- és háromdimenziós képet. [16]

3.5 Ellipszometria

A klasszikus ellipszometria a minta felületéről visszavert fénysugár polarizációs állapotának mérésén alapszik, ahol egy ismert orientáltságú lineárisan polarizált fénysugár, elliptikusan polarizálva verődik vissza (9. ábra). A detektált ellipszometriai szögek (Ψ , Δ) hullámhossz szerint felvett spektrumából meghatározhatók a felületi rétegek optikai tulajdonságai, mint például a törésmutató, vastagság, morfológia és érdesség. A használatánál nehézséget okoz, hogy csak nagyon pontos mérés esetén képes a felület törésmutatóját és vastagságát is meghatározni. [17] [18]



9.ábra Ellipszometria mérés sematikus ábrázolása [19]

4 Anyagok és protokollok

A kísérletekkel egy olyan polimer bevonatú OWLS chip létrehozása a cél, amelyen a polimer réteg minél kisebb felületi érdességgel és 10-50 nm rétegvastagsággal rendelkezik, hogy vizsgálni lehessen baktériumok adszorpciós képességét az adott polimereken. Az ehhez használt anyagokat, módszereket, rétegfelviteli és ellenőrzési lépéseket szeretném ismertetni ebben a fejezetben Két fajta polimer felvitelét és ellenőrzését végeztük el, hogy vizelet és baktérium adszorpcióhoz is optimális réteget tudjunk kialakítani a felületen. Ez a két polimer a polikarbonát (PC) és a ciklikus olefin polimer. (COP)

4.1 Alkalmazott vegyszerek

- Polikarbonát gyöngyök (77elektronika Kft.) amelyeket xilolban (VWR) lettek feloldva
- Ciklo olefin polimer (COP, Zeonor 1060 R) először xilolban, majd későbbi mérés során hexánban (VWR) oldottuk fel.
- Művizelet (77 elektronika)
- MQ víz
- 2% APTES (Sigma-Aldrich), pH 7.0-ra állítása ecetsavval
- metanol (VWR)
- 1x PBS (foszfát pufferes sóoldat) (Sigma-Aldrich)
- Az antitestek rögzítésére Mix&GoTM Biosensor (Anteo technologies Pty Ltd., Australia) nevű immobilizáló reagens. Ez az anyag a bioszenzor chipre történő felvitele után (30 perc) képes a biomolekulákat fixálni a felületen, ráadásul az antitesteket orientálva tudja megkötni. [20]
- Ezenkívül egy másik antitest rögzítési módszert is kipróbáltunk, ahol gliciloxipropil-trimetoxiszilánnal (GOPS; Sigma-Aldrich) kötöttük a ProteinA fehérjét (Sigma-Aldrich) a felülethez. A ProteinA orientálva tudja megkötni az antitesteket. A méréseinkben 0,5 mg/ml ProteinA fehérje oldatot használtunk, amelyet MES pufferben oldottunk. A 25 mM MES (2-(N-morfolino)-etánszulfonsav) puffert MES hidrátból (Sigma-Aldrich) és MES sóból (Sigma-Aldrich) állítottuk össze és 6,00 pH-ra állítottuk.

- Antitestek: Szabó Dóra (SOTE) által kiválasztott *DH5α E. coli* baktérium törzsre tesztelt antitesteket használtuk (ELISA teszt). Az egyik ilyen poliklonális antitest (ThermoFischer, 7213) és a másik (BioRad, 4329-4906). Mind a két antitestet MES pufferben oldottuk és 150 µg/ml koncentrációt használtunk a méréseinkbe.
- *DH5α E. coli* (SOTE) baktérium törzset használtuk 4McFarlandos és 10^8 sejt/ml koncentrációban. A baktériumokat fiziológias sóoldatban tároltuk és hígítottuk,
- 1 mg/ml PLL-g-PEG (SuSoS AG, Svájc) 10 mM Hepes pufferben (7,4 pH) oldva
- 0,2% I-block (Applied Biosystems) 1x PBS-be oldva
- 5% BSA (borjú szérum eredetű albumin, Sigma-Aldrich) oldat 1x PBS-ben oldva

4.2 Felületkezelés

4.2.1 Tisztítás

Mivel a legkisebb felületi szennyeződés is befolyásolhatja a kialakult réteget és az OWLS mérés hitelességét, így a chipet fontos a rétegfelvitel előtt megtisztítani minden nemű szennyeződéstől, ezért erre egy krómkénsavat alkalmazó protokollt használtunk. Az első lépés a lapkák tömény krómkénsavban áztatása volt 3 percig, majd Milli-Q (MQ) vizes öblítés 20 másodpercig, majd 5 ml kálium-hidroxidot oldottunk 100 ml MQ-ba, amelyben 3 percig voltak a lapkák, hogy semlegesítsük a krómkénsavat. Ezután szonikáltuk 10 alkalommal 1 percig és a szonikálások között MQ vízzel öblítettünk, végül a OWLS chipet nitrogéngázzal szárítottuk.

4.2.2 Szilanizálás GOPS használatával

Az első lépésben 150°C-on vákuum alatt, 1 órán keresztül szárítjuk a tisztított szubsztrátot vákuumos szárító szekrényben. Ezután következik a gázfázisú szilanizáció, ami során 100 ml xilol töltünk a reaktoredénybe, és a fűtést a xilol forrásához állítjuk be. A xilol forrása után 5ml GOPS-t óvatosan az edénybe pipetázunk, majd 5 órát várunk, hogy a reakció végbe menjen. Mivel a xilol egy illékony oldószer, ezért ez idő alatt pótolni kell az oldathoz. Mosással távolítjuk el a nem specifikusan adszorbeálódott szilán molekulákat a felszínről. Intenzíven mossuk (xilol, metanol, xilol) és végül metanolban 5 percig szonikáljuk. A szubsztrátot 110°C-on vákuum alatt 1 órán keresztül vákuumszáritószekrényben szárítjuk. Végül, ha nem használjuk fel azonnal a kezelt lapkát, Exikátorban tároljuk maximum 1 hétig.

4.2.3 Szilanizálás APTES használatával

A krómkénsavval tisztított OWLS chipeket felületét hidrofóbbá tettük APTES-sel, annak érdekében, hogy a PC és COP réteg homogéneen és nem túl vastag régben borítsa a felszint. Ehhez 3-aminopropil-trietoxiszilán (APTES) 2%-os oldatát készítettük el MQ vízben, majd ecetsav segítségével a pH értéket, titrálással 6,8-7,2 tartományba állítottuk. Ezután az APTES oldatot pipettával felvittük a lapkákra úgy, hogy teljesen fedje a felületet és egy órán át állni hagytuk, majd lemostuk a felületről többszörös mosással, metanol-MQ víz-metanol-MQ víz sorrendben és nitrogéngázzal megszáritjuk. Végül vákuumkemencében 120°C-on beégetjük a réteget két órán át. Idáig a lépések a két bevonat esetén megegyeznek.

4.2.4 Oldatkészítés

A PC és a COP polimereket szilárd gyöngyök formájában bocsátotta rendelkezésre a 77Elektronika Kft., ezért első lépésként a polimerekből felvihető, folyékony oldatot kellett készítenünk. Ehhez először a gyöngyöket vákuumkemencében szárítottuk 40°C-on három órán át. A PC gyöngyöket ezután tetrahidrofuránban oldottuk 0,36 mg/ml töménységben. A teljes oldódáshoz egy napra volt szükség. A COP gyöngyöket ugyanilyen szárítás után, xilolban oldottuk fel 5; 7, illetve 10 mg/ml töménységben. Az oldódás ebben az esetben több mint egy napig tartott, de ennyi idő után sem oldódott fel teljesen az anyag, mivel ez idő elteltével is csapadékot lehetett megfigyelni szabad szemmel az oldatban.

4.2.5 Polimer rétegek leválasztása

A COP esetében a felvitel előtt szonikálásra volt szükség, hogy a csapadékot feloldjuk az oldatban. Az elkészített oldatok felvitelét forgótárcsás rétegleválasztás (angolul spin coating) segítségével végeztük, mely során a készülék vákuummal tartja helyén a kezelni kívánt mintát, majd a beállított fordulatszám szerint a tengelye körül pörgeti. Két fordulatszámot és időtartamot kell meghatározni a rétegfelvitelhez, egy előpörgetést, amely azért szükséges, hogy a felesleges anyagot lelökje a felszínről. Ez 500 RPM és 5 másodperc volt minden lapka esetén. A másik a felpörgetési fordulatszám és időtartam, amely a rétegvastagságot állítja be. Ezek az értékek 2000RPM 20 másodperc volt a kísérletek során. Az értékek beállítása után, pipetta segítségével csepegtettük fel az oldatot úgy, hogy az oldat teljesen fedje a felületet, majd elindítottuk a felpörgetést. A réteg tulajdonságainak változtatásához a felcsepegtetések (felpörgetések) számát változtattuk, és ellenőriztük milyen hatással van a kialakult felületre.

4.3 Mérési protokollok

Ebben a fejezetben azt szeretném ismertetni, milyen beállításokkal, illetve lépésekkel végeztük a méréseket.

4.3.1 Ellipszometria

A rétegvastagsági térképeket 60°-os szögnél készítettük, mikrofókuszáló használatával. A kiértékeléshez felépített modellhez három réteget alkalmaztunk, a hordozó réteget, BK7 üveg, a középső, hullámvezető réteget Cauchy, optikai rácsos, a felső COP réteget pedig Cauchy szerint közelítettük.

4.3.2 AFM

A mérésekhez μ Masch szilícium tűt használtunk, aminek a paraméterei a következők: a hegy sugara 8 nm, rezonancia frekvenciája 325 kHz, rugóállandója pedig 40 N/m. A műszert a mérésekhez az 50x50 μ m-es képek készítéséhez 512x512 pixel felbontásra állítottuk, 0,2 Hz túmogatási frekvencia mellett. A 15 μ m x 15 μ m méretű képekhez szintén 512x512 pixeles felbontást alkalmaztunk, 0,3 Hz frekvencia mellett. Az 1 μ m x 1 μ m területen is 512x512 pixel felbontást, és 1,5Hz frekvenciát állítottunk be.

4.3.3 Vizelet adszorpciója PC rétegen

Az első lépés az alapvonal felvétele, MQ víz használatával (-10- 0 min). A második lépés pedig a steril emberi vizelet áramoltatása 1 μ l/s sebességgel. (0-50 min) Az utolsó lépés pedig a mosás

4.3.4 E.Coli adszorbció COP rétegre

Első lépés a MES puffer alapvonal felvétele volt, hogy meg tudjuk határozni az üres, de beáztatott chip tulajdonságait. (0-28 min) Ez után következett a Mix&Go injektálása, 400 μ L mennyiségben. (28-62 min) A következő lépés a nem stabilan kikötött M&G eltávolítására a felszínről MES pufferes mosással. (62-100 min) A negyedik lépésben injektáltunk a rendszerbe 400 μ l MES pufferben oldott 7213-nyúl antitestet. (100-131 min) Ezt a lépést is MES pufferes követte a nem kikötött antitestek eltávolítása érdekében (131-189 min). Ezután puffer csere következett MES-ről fiziológias sóoldatra, hogy fel tudjuk venni a baktérium kitapadáshoz méréséhez szükséges alapvonalat. (189-230 min) Az utolsó előtti lépés a 4 McFarland E-coli baktérium oldat áramoltatása volt 1 μ l/s sebességgel. (230-245 min) Végül a nem adszorbeálódott baktériumok lemosása következett fiziológias sóval. (245-300 min)

4.3.5 E.Coli adszorpciója blokkolás után

A mérést megelőzően a lapkát szilanizáltuk GOPS használatával, majd ProteinA oldatban hagytuk állni 9 órán át.

Az első lépés MES pufferes alapvonal felvétele (0-60min) pumpával áramoltatva az oldatot. A második lépésben 400 μL 150 $\mu\text{g/ml}$ MES pufferben oldott antitestet injektáltunk a rendszerbe. (60-90min) A következő lépés a mosás volt MES puffer segítségével, hogy eltávolítsuk a nem kikötött antitesteket pumpával áramoltatva. (90-120 min) Ezután a puffert HEPES oldatra cseréltük, hogy meg tudjuk határozni az új alapvonalat, szintén áramoltatva. (120-150 min) Az ötödik lépésben 400 μl 1 mg/ml koncentrációjú PLL-PEG HEPES pufferben elkészített oldatát injektáltuk áramlás nincs. (150-180 min) Ezt ismét mosás követte HEPES puffer használatával pumpás áramlással. (180-210 min) Egy újabb puffer csere szükséges, a fiziológiás sóoldat alapvonalának felvételéhez pumpával áramoltatva. (210-240 min) A nyolcadik lépésben kezdtük meg a 10^8 sejt/ml E.Coli baktérium áramoltatását. (240-270 min) Végül pedig a fiziológiás sóoldattal történő mosás következett, hogy csak a stabilan adszorbeálódott baktériumok maradjanak a felszínen. (270-300 min)

5 Eredmények

5.1 Rétegek karakterizálása

Az ellenőrzés során az előzőekben ismertetett lépéseket figyeltük meg különböző módszerekkel. Arra voltunk kíváncsiak, hogy a felpörgetés paramétereinek, mint a fordulatszám, oldat-töménység, illetve a felpörgetésszám módosítása, hogyan befolyásolják a kialakult réteg vastagságát és felületi érdességét. Az ellenőrző mérések egy részét üveglapon végeztük, hiszen így is ugyanolyan információt kapunk a felületi topográfiáról és rétegvastagságról, de nem kellett használnunk értékes OWLS chipeket.

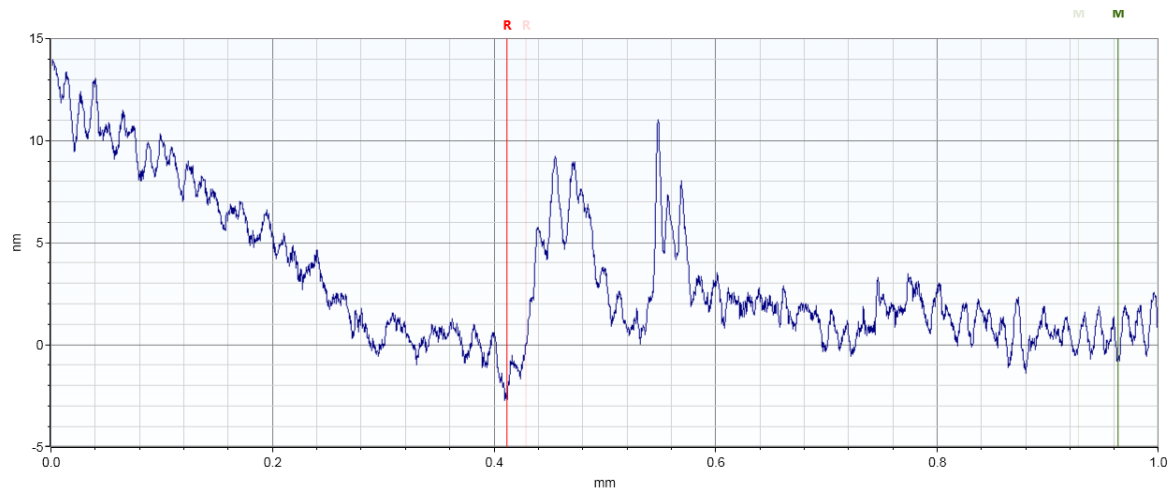
5.1.1 Profilometria

A kialakult réteg vastagságának előzetes ellenőrzése profilometriával történt. Ezt karcolás előzte meg, hogy az üveg és a felvitt réteg elkülönüljön egymástól. Az *1.táblázatban* a különböző felpörgetés szám rétegvastagságra gyakorolt hatása látható. Ezeket a méréseket a már ismertetett módon kezelt üveglapokkal végeztük, de ilyen ellenőrzések csak a PC-vel kezelt lapkán történtek. A piros csík jelzi a karcolat helyét a zöld pedig a felszínt, amihez viszonyítottuk a karcolat mélységét.

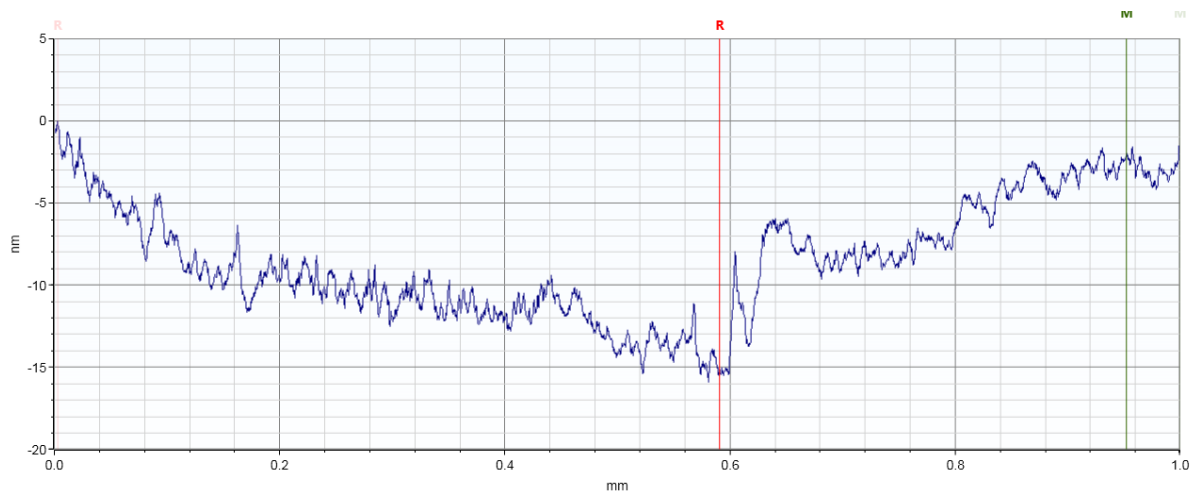
A különböző számú felpörgetésnél mért rétegvastagságok

	Polikarbonát vastagsága
Egyszeres felpörgetés	3,1 nm 6,3 nm
Kétszeres felpörgetés	9,8 nm 11,9nm
Háromszoros felpörgetés	15,7 nm

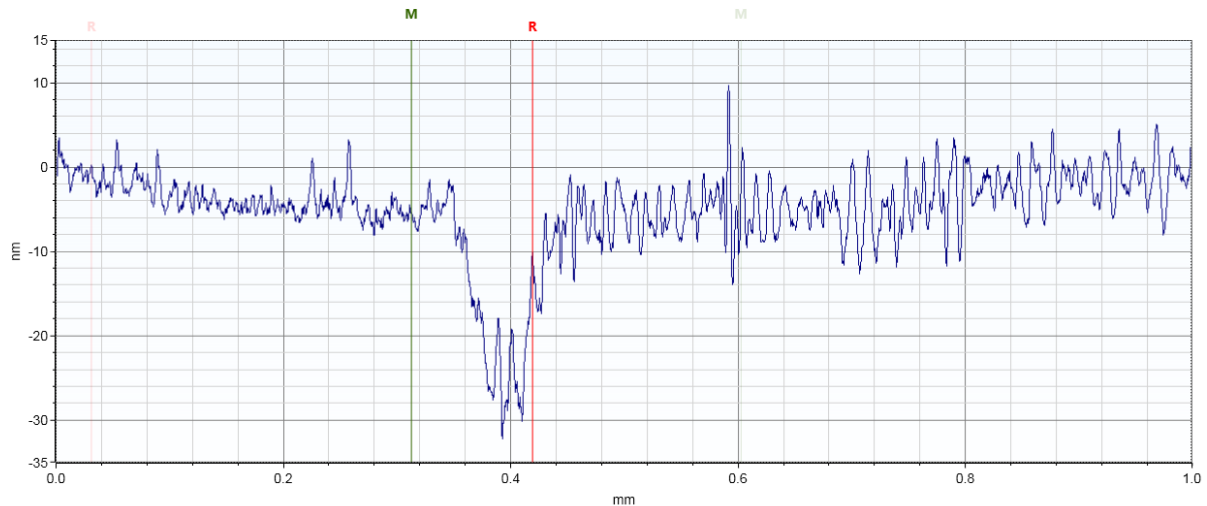
1.táblázat



10.ábra Egyszeres rétegfelpörgetés után a profilométerrel mért rétegvastagság



11.ábra Kétszeres rétegfelpörgetés után a profilométerrel mért rétegvastagság



12. ábra Háromszoros rétegfelpörgetés után a profilométerrel mért rétegvastagság

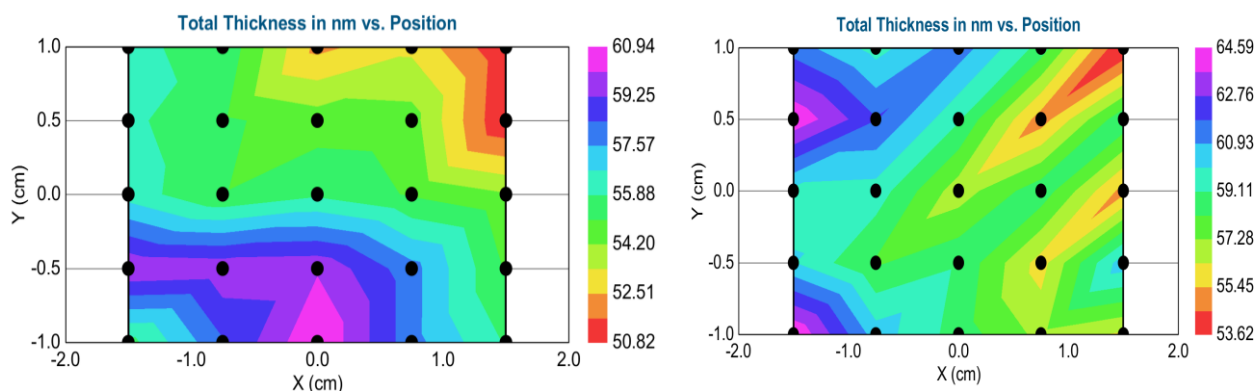
A mérések alapján megállapítható volt, hogy a legtöbb lapka esetén kialakult egy elkülönülő réteg, amelyben láthatók voltak a karcolások. A mérések alapján a felületi vastagságok megfelelőnek tűntek, különösen a kétszeres felpörgetés esetében, viszont a képek alapján is látható, hogy nem mindig egyértelműek a karcolások, vagyis rétegvastagságok, illetve ezek csak a vastagságra vonatkozó információk voltak, így a felületi érdesség és az alakzatok megismeréséhez további vizsgálatra volt szükség, amelyhez AFM-et és ellipszometriát használtunk.

5.1.2 Ellipszometria

Az elkészített réteg vastagságának egyenletességét nagyobb területen (1x1 cm, illetve 2x2 cm területen) ellipszometriás mérésekkel is ellenőriztük. Ezzel a módszerrel a felvitt réteg vastagságának eloszlásáról tudunk információt szerezni ugyanakkor a kialakult felületi alakzatok a módszerrel nem figyelhetők meg, azok tanulmányozása céljából AFM méréseket végeztünk.

5.1.2.1 PC réteg

A mérések alapján megfigyelhető, hogy a réteg nem egyenletesen terült el a felszínen, vastagsága átlagosan 35 nm. A képek alapján pedig látható, hogy 10 nm magasságú alakzatok alakultak ki a rétegen, a rétegek homogenitása viszont kérdéses, ezért AFM ellenőrzés is szükséges a simaság megmérésére.



13.ábra Egyszeresen felpörgetett PC réteg ellipszometriás rétegvastagság térképe

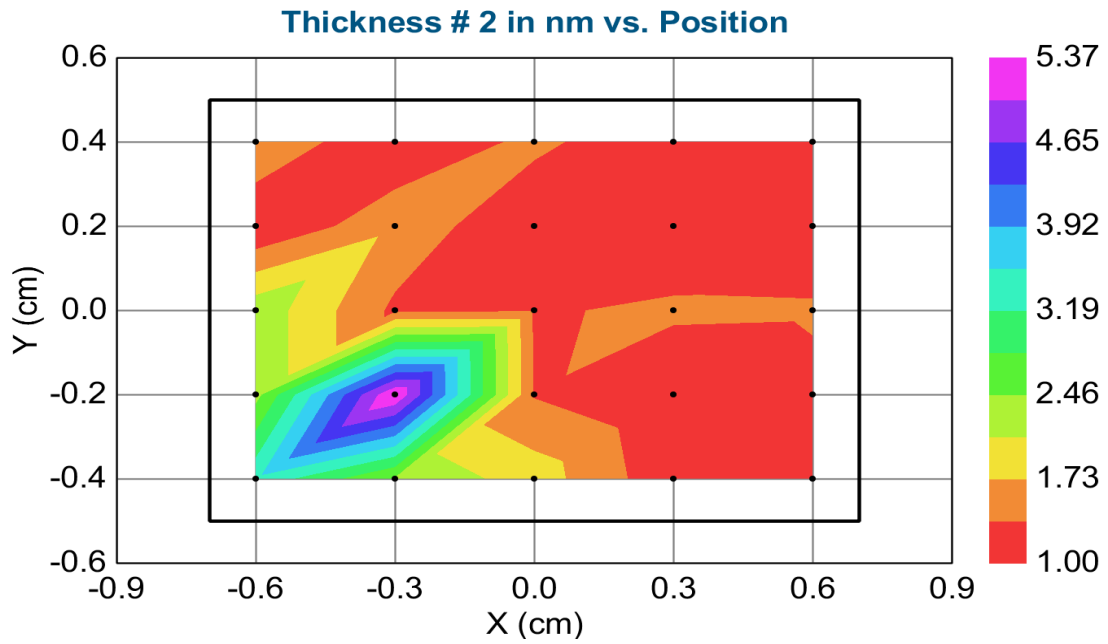
5.1.2.2 COP réteg

A COP réteg esetében is elvégeztük ezt az ellenőrzést, de a mintákat nem üveglap felületén, hanem OWLS chipen vizsgáltuk. A mérések alapján látható (2.táblázat), hogy a réteg vastagságát az oldat töménysége jobban befolyásolja, mint a felpörgetések száma. A 10 mg/ml koncentrációról megállapítható, hogy már túlságosan vastag réteget eredményez az OWLS mérésekhez, már egy felpörgetés esetén is. A képek alapján látható, hogy a rétegen 10-20 nm magasságú alakzatok is kialakultak. A legegyszerűsebb és egyben legvékonyabb réteget az 5 mg/ml és egyszeres felpörgetés esetén sikerült elérni. A réteg kompaktságának ellenőrzése AFM segítségével lehetséges.

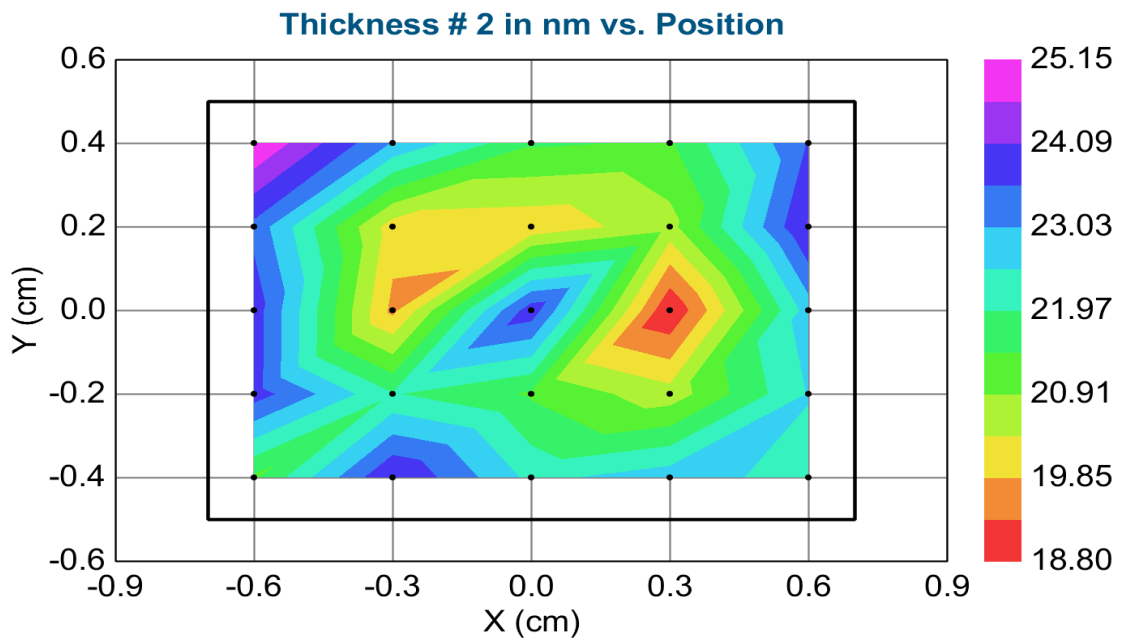
Az oldat töménység és felpörgetés szám hatása a rétegvastagságra

COP konc.	Pörgetés-szám	COP rétegvastagság
10 mg/ml	1x	35 – 50 nm
5 mg/ml	1x	1 – 5 nm
5 mg/ml	3x	17 – 37 nm
7 mg/ml	1x	19 – 25 nm
5 mg/ml	1x	14 – 25 nm
5 mg/ml	3x	16 – 29 nm

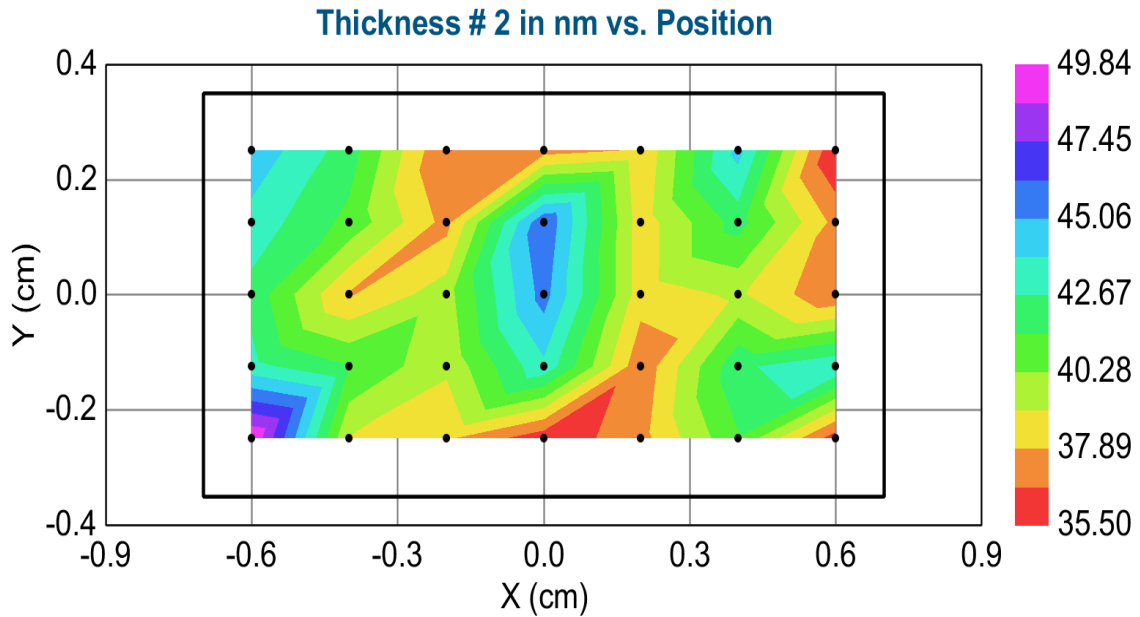
2.táblázat



14. ábra COP réteggel bevont mintáról készült ellipszometriás rétegvastagság térkép, amely a COP bevonat vastagságának laterális eloszlását szemlélteti. Rétegtészési paraméterek: 5 mg/ml. egyszeres felpörgetés



15. ábra COP réteggel bevont mintáról készült ellipszometriás rétegvastagság térkép, amely a COP bevonat vastagságának laterális eloszlását szemlélteti. Rétegtészési paraméterek: 7mg/ml. egyszeres felpörgetés



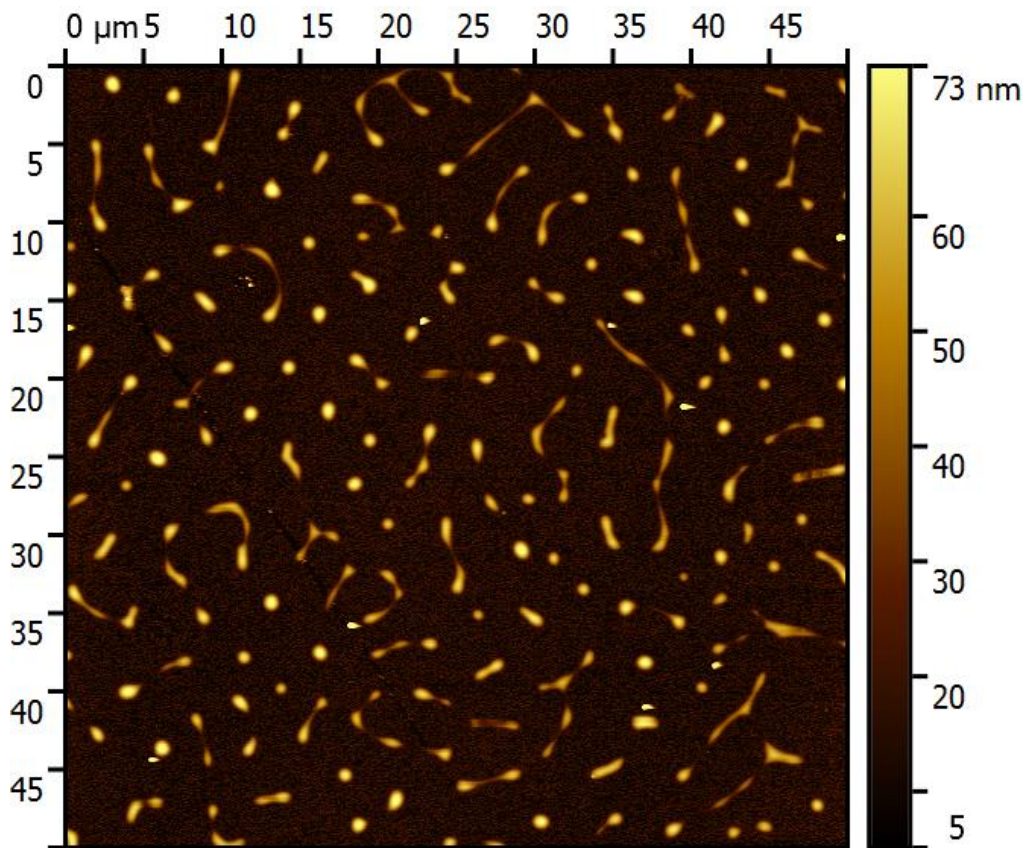
16.ábra COP réteggel bevont mintáról készült ellipszometriás rétegvastagság térkép, amely a COP bevonat vastagságának laterális eloszlását szemlélteti. Rétegtészítési paraméterek: 10mg/ml. egyszeres felpörgetés

5.1.3 Atomerőmikroszkópos ellenőrzés

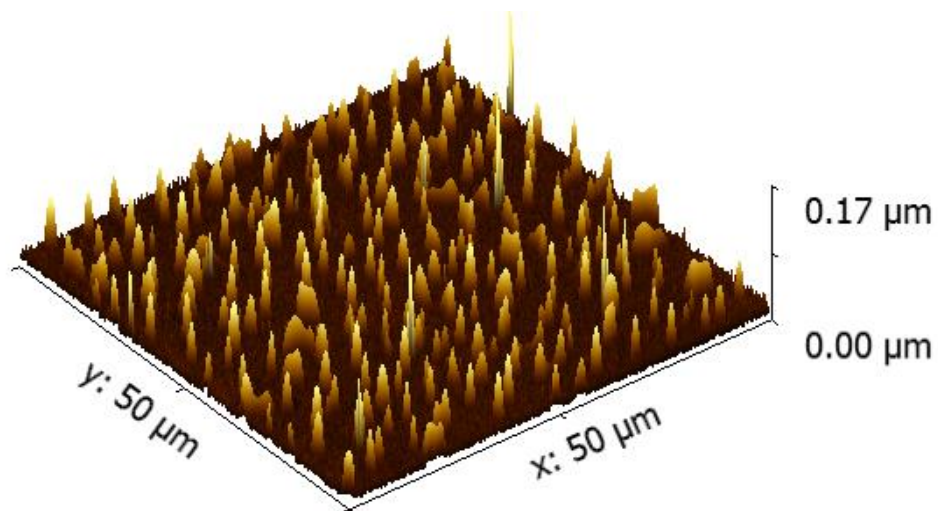
A lapkák felületi topográfiájáról részletesebb információra van szükség, mint amit a profilometria vagy ellipszometria szolgáltatni tud, ezért AFM segítségével készítettünk képeket non-contact módban. Ezzel a módszerrel, már a felületről tudunk információt szerezni mind magasságban, mind pedig elhelyezkedésben, illetve a felületi érdességet is ki lehetett számolni a mérések alapján.

5.1.3.1 PC réteg

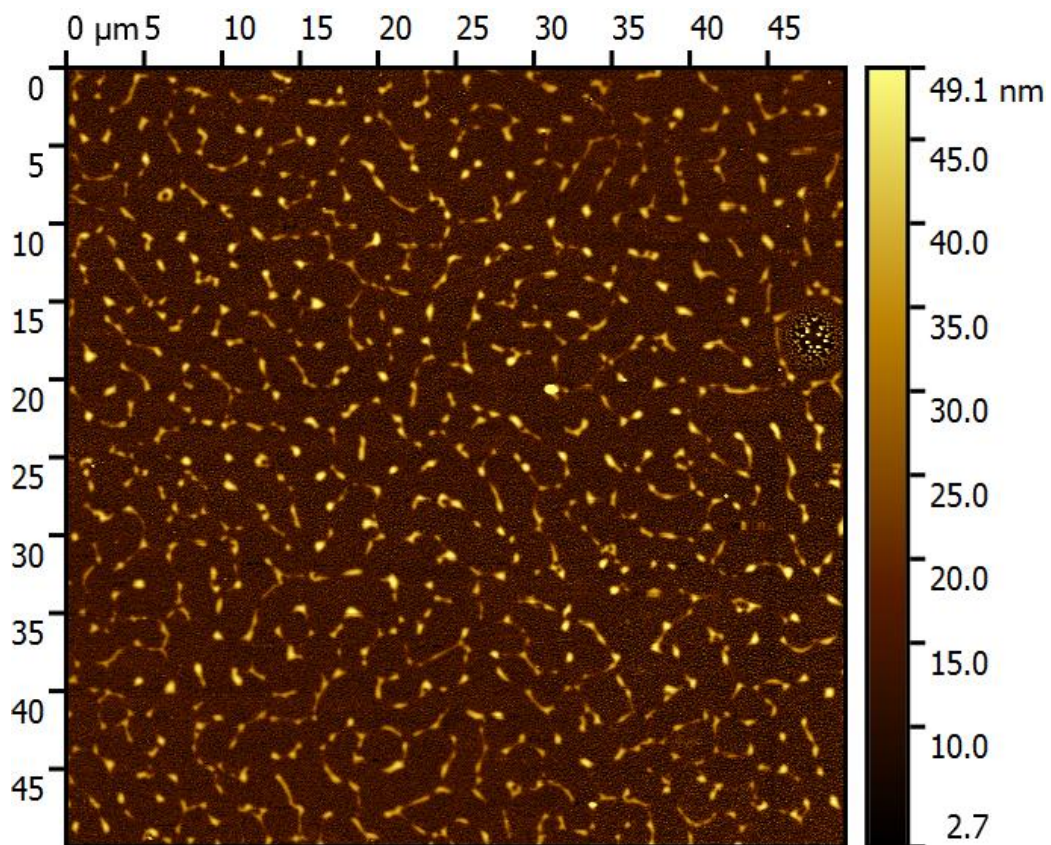
Minden felpörgetésszám mellett készített mintáról 3-3 képet készítettünk, a PC esetében 50x50 μm , 15x15 μm és 1x1 μm területeket pásztázva, hogy mikroszkópicusan is meg tudjuk vizsgálni a felületet. A mérésekhez ugyanazokat az üveglapkákat használtuk, amelyeket a profilometria során is.



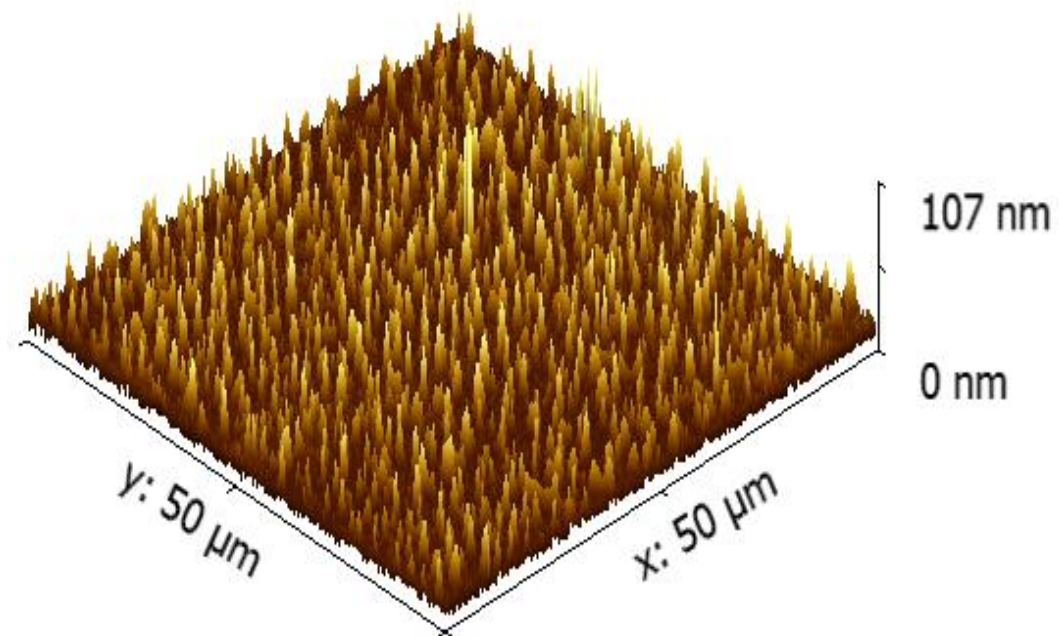
17.ábra Egyszeres PC felpörgetés 50x50 μm -es AFM kép



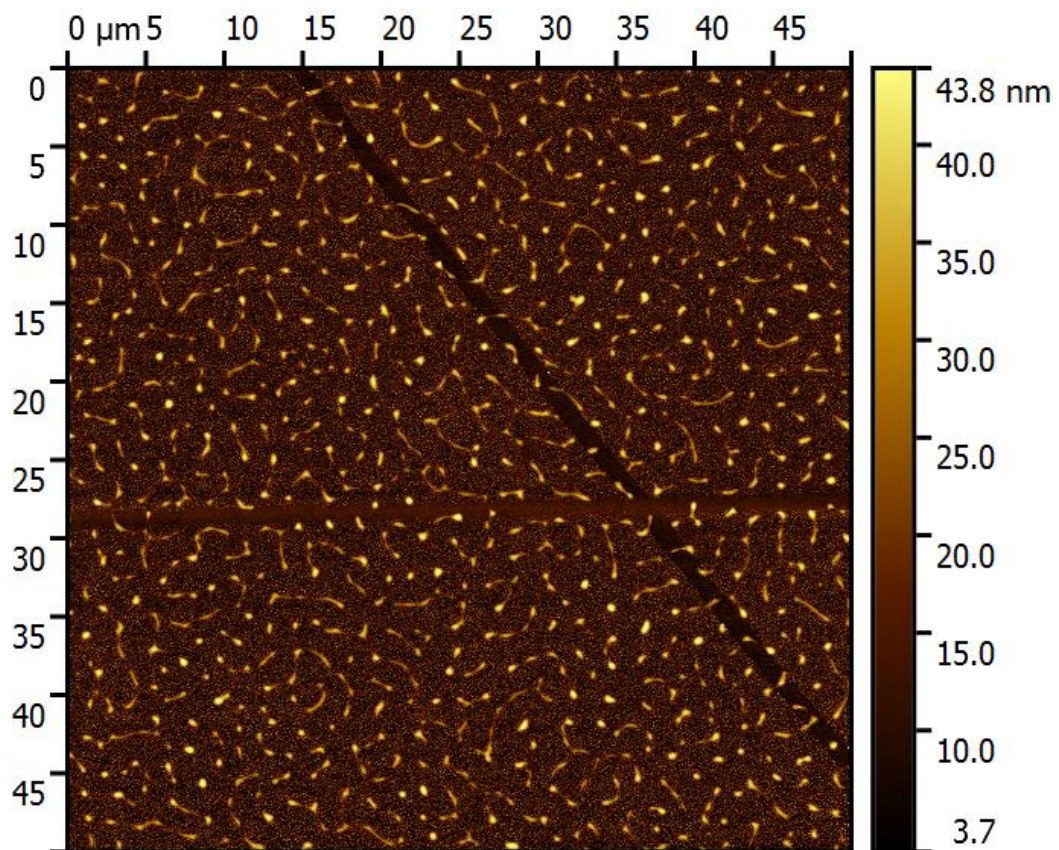
18.ábra Egyszeres PC felpörgetés 50x50 μm -es topográfiája



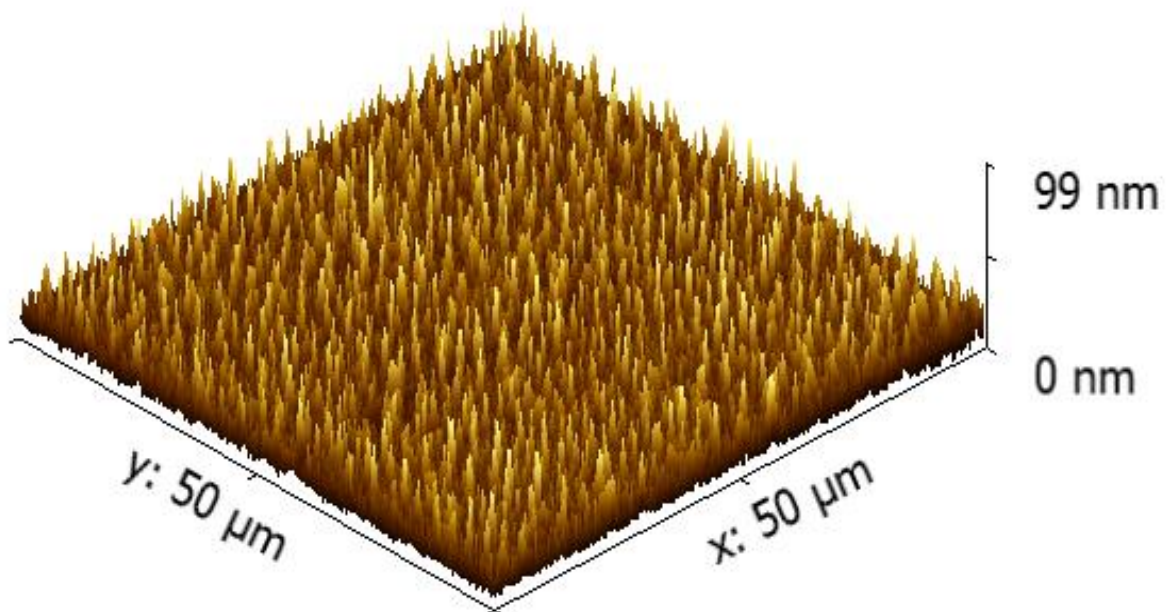
19. ábra Kétszeres PC felpörgetés 50x50 μm -es AFM képe



20. ábra Kétszeres PC felpörgetés 50x50 μm -es topográfiaja



21. ábra Háromszoros PC felpörgetés 50x50 μm -es AFM képe



22. ábra Háromszoros PC felpörgetés 50x50 μm -es topográfiája

A felületi érdesség RMS értékei felpörgetésszám és a vizsgált terület szerint PC esetén

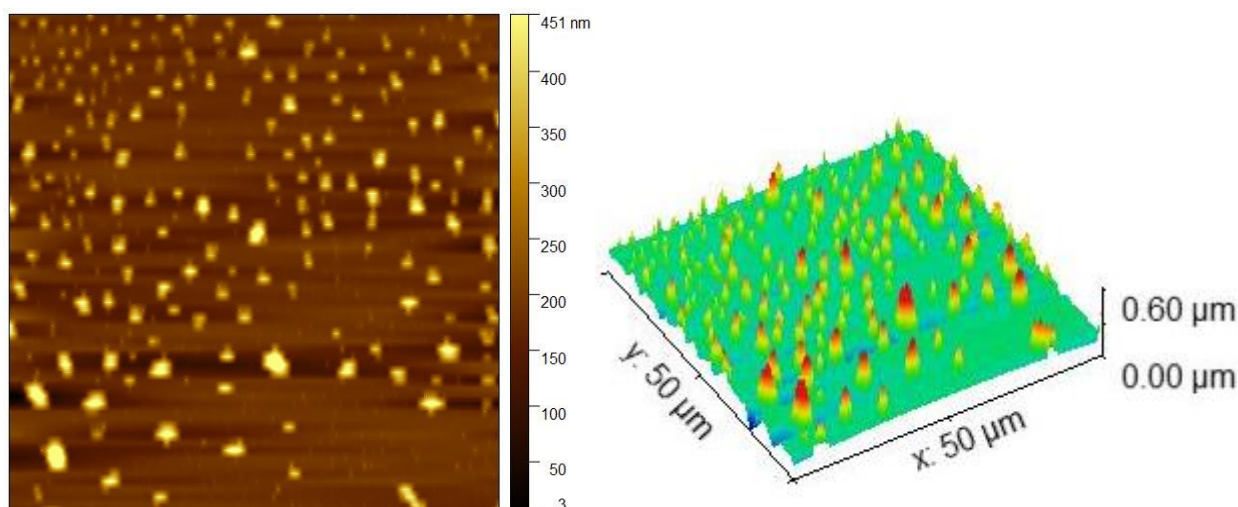
	Egyszeres felpörgetés	Kétszeres felpörgetés	Háromszoros felpörgetés
50x50 μ m	10,61nm	7,04nm	6,71nm
15x15 μ m	10,39nm	6,49nm	7,49nm
1x1 μ m	2,06nm	5,32nm	6,55nm

2.táblázat

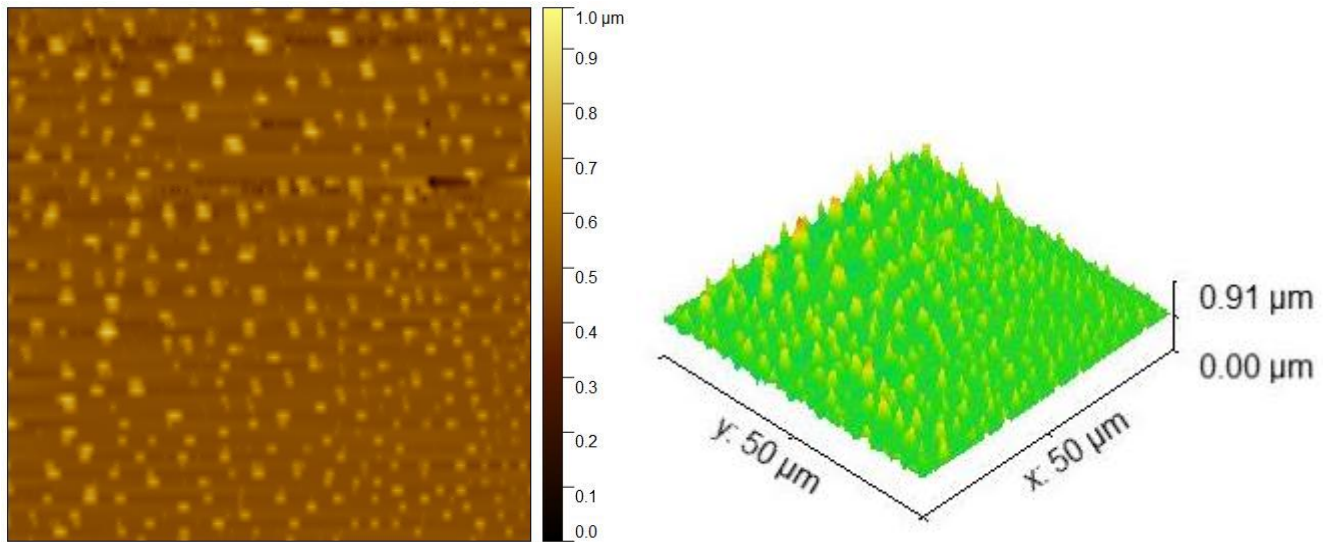
A mérések alapján látható, hogy a PC rétegnél hegyes struktúrák alakulnak ki. A felpörgetés számmal láthatóan egyre sűrűbben helyezkednek el, amivel a réteg is egyre inkább összefüggő lesz. A PC felszínnek egyenletesnek mondhatók a kisebb és nagyobb felületek vizsgálata esetén is. Elmondható az is, hogy a PC-ből kisebb szemcsék keletkeznek a harmadik felpörgetés során. A felpörgetések száma befolyásolja a réteg érdességét (2.táblázat) és a maximális struktúra magasságát, vagyis a második és harmadik réteg felpörgetése simább és jobban fedő réteget produkál, mint egyszeres felpörgetésnél, de a réteg vastagsága is nő a felpörgetés szám növelésével.

5.1.3.2 COP réteg

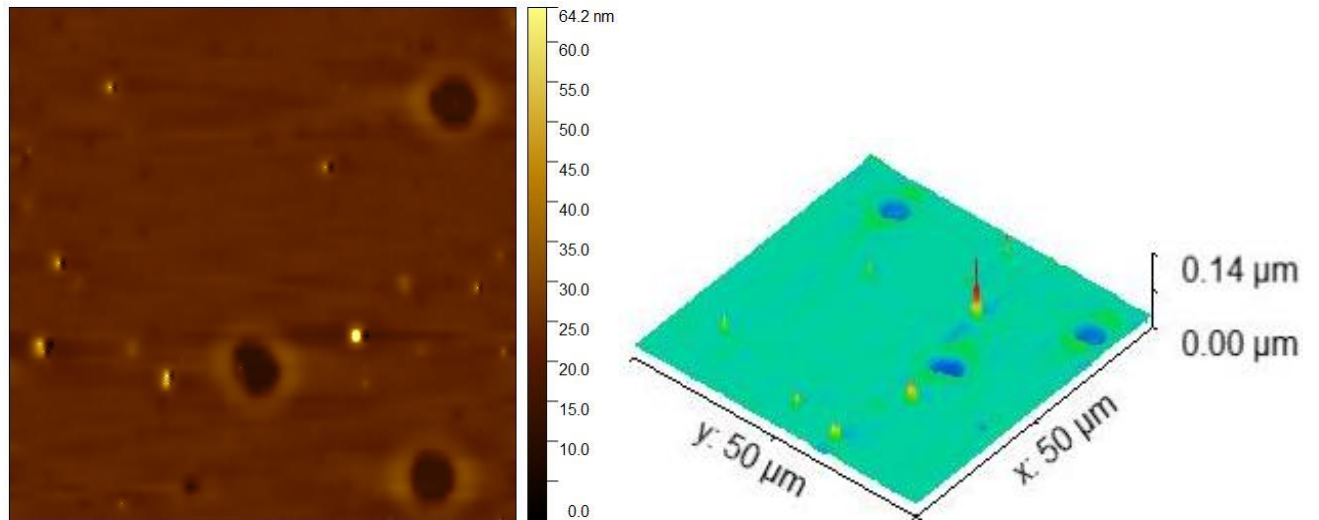
A COP oldattal kezelt lapkák felületét is ellenőriztük AFM-mel, hogy információt kapjunk a felületi alakzatok méretéről és elhelyezkedéséről. E méréseknél nemcsak üveglapkán, hanem használt OWLS chipen is ellenőriztük a COP réteget. A készített képek az AFM prescan üzemmódjában készültek.



23.ábra COP 7mg/ml, egyszeres felpörgetés üveglapra



24.ábra COP 5mg/ml, egyszeres felpörgetés üveglapra



25.ábra COP 7mg/ml egyszeres felpörgetés OWLS chipre

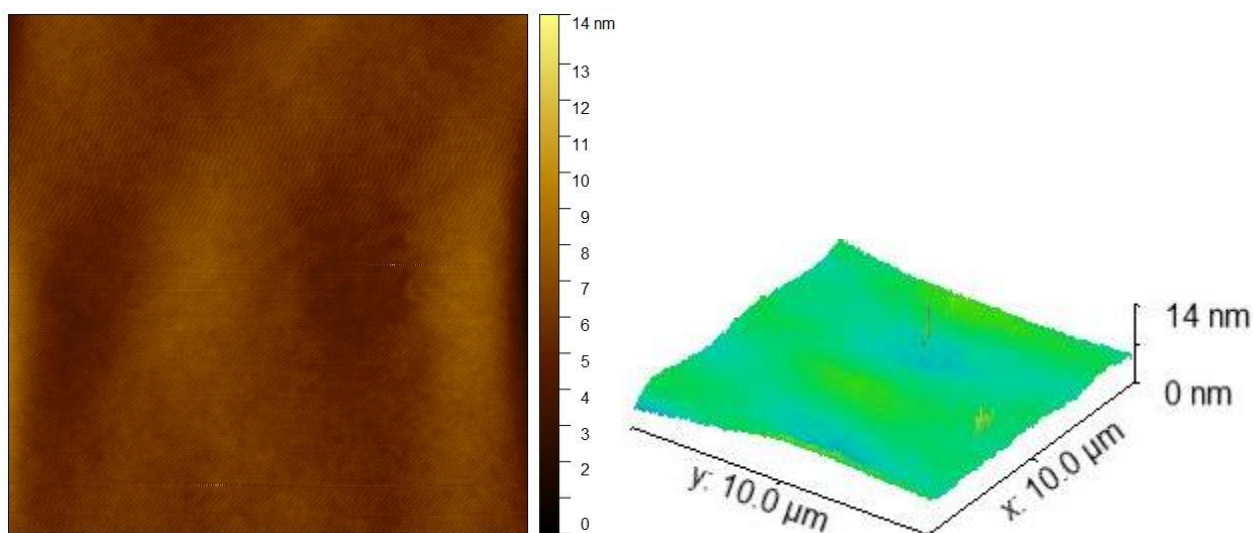
COP oldattal kezelt lapkák felületi érdességének RMS értékei a felpörgetések száma és az oldat töménysége szerint

	Egyszeres felpörgetés üvegen		Háromszoros felpörgetés üvegen	Egyszeres felpörgetés OWLS chipen		Háromszoros felpörgetés OWLS chipen
	5mg/ml	7mg/ml	5mg/ml	7mg/ml	5mg/ml	5mg/ml
50x50μm	49,5nm	85,9nm	45,4nm	2,2nm	4,3 nm	4,2 nm
10x10μm	26,4nm	39,7nm				

3.táblázat

Az eredmények alapján jól látható, hogy COP oldat is rögöket képez a felületen, viszont azok egymástól távolabb helyezkednek el és nagyobb méretűek is, mint a PC esetében. Továbbá megfigyelhető volt, hogy a felpörgetések száma és a töménység nem befolyásolja érdemben a kialakult réteget sem vastagságban, sem érdességben olyan egyértelműen, mint a PC-nél. Érdekes viszont, hogy az OWLS chip felületén simább réteget képzett az oldat, mint az üvegen. Későbbi ellenőrzések során kiderült, hogy a nagyobb rögök oka lehet a nem megfelelő oldószer használata, amire a felvitel előtti szonikálás szükségessége is utalt már.

Ezért ciklohexánban való oldással is kísérleteztünk. Ami során azt tapasztaltuk, hogy a COP jól oldódik ebben az oldószerben, és 5-10 mg/ml koncentrációban jól borítja a felszínét, illetve sima rétegeket tud létrehozni mind üveg mind APTES-sel kezelt felületen.



26.ábra 5mg/ml Ciklohexánban oldott COP egyszeres felpörgetés üveglapra

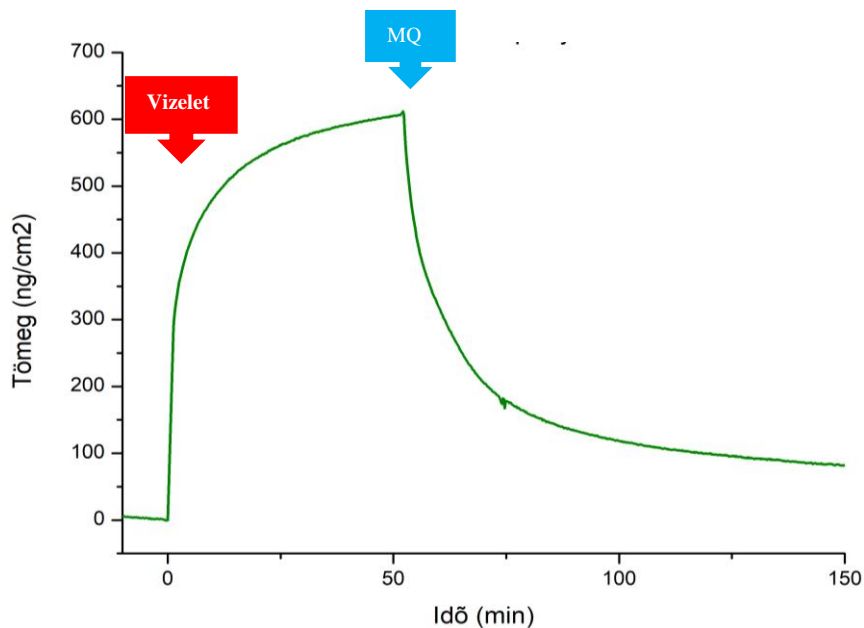
5.2 OWLS mérések

Az eddigi lépések és eredmények hitelesítésére, adszorpciós méréseket végeztünk OWLS műszer használatával, hogy lássuk valóban sikerült-e olyan réteget létrehozni a felületen, amivel mérhető a kitapadás. A szenzor chipet is a leírtak szerint kezeltük, viszont az ellenőrzési lépéseket nem végeztük el a mérés előtt.

5.2.1 Vizelet adszorpciója PC rétegen

A PC réteg használhatóságának ellenőrzésére, vizelet adszorpcióját vizsgáltuk, hiszen ez is egy lehetséges közeg a baktériumok méréséhez. Az OWLS chipre egyszer pörgettük fel 0.36mg/ml töménységű PC oldatot. Az alapvonalat MQ vízben vettük fel hozzávetőlegesen 10perc alatt majd hozzáadtuk a vizeletet a rendszerhez, amelyet 50 percig áramoltattunk a

rendszerben, majd másfél óra MQ vizes mosás következett, hogy a nem adszorbeálódott, gyengén kötött molekulákat lemossuk a felületről.

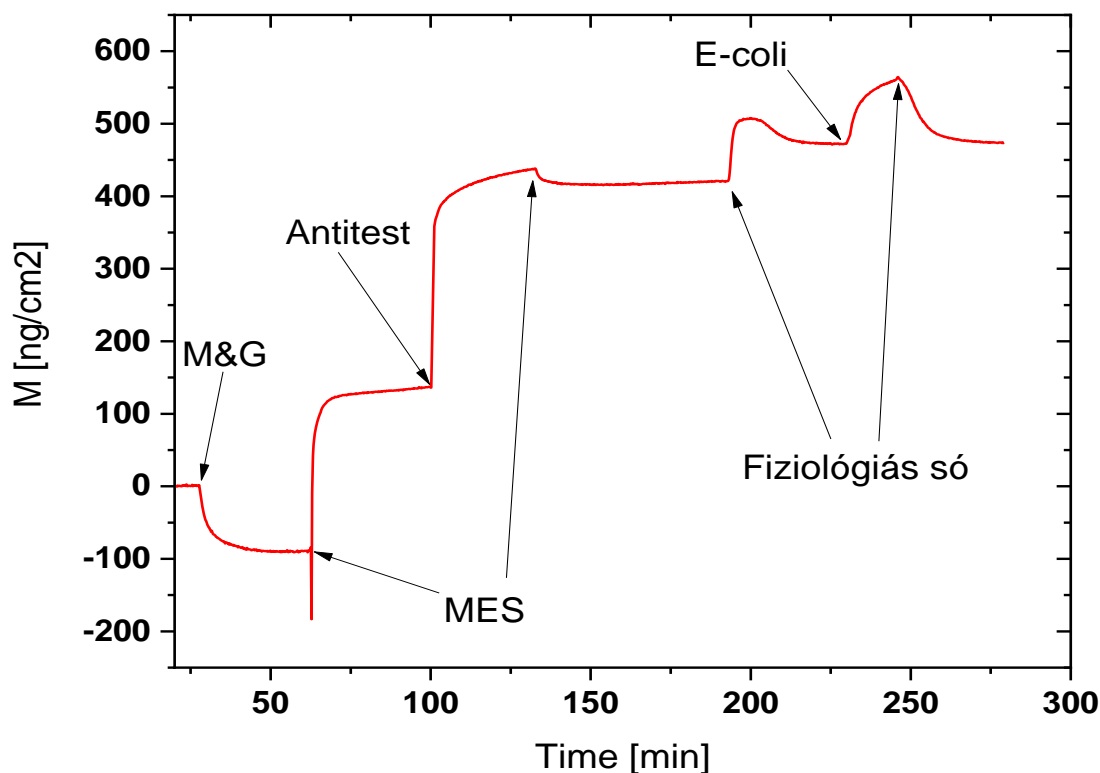


27.ábra Steril emberi vizelet kitapadása

Az OWLS chipre felvitt PC vékonyréteghez a mérés során 600 ng/cm^2 vizelet kötődött ki, amely a mosás után 80 ng/cm^2 -re csökkent. Ez utóbbi felületi tömegsűrűség mutatja a stabilan kitapadt mennyiséget. Amivel számolni kell, ha vizeletből kell baktériumokat kimutatni. A mérés alapján elmondható, hogy sikeres volt a kitapadás a PC felületre.

5.2.2 E.Coli adszorpciója COP rétegre

A méréshez használt chipet a már részletezett módon tisztítottuk, majd COP oldattal vontuk be, 2000RPM fordulatszámmal és egyszeres felpörgetéssel. A baktérium hozzáadása előtt a chipre, a kitapadást segítő anyagokat vittünk fel. Az első a Mix&Go (M&G) nevű felület aktiváló reagens, ami az antitestek orientált, és jobb kitapadását segíti elő a felületen, valamint a mérési időt is jelentősen rövidíti. [20] A baktérium esetén azért fiziológiás sóoldat a hordozó közeg, mert ez tudja biztosítani az ozmotikus egyensúlyt a sejtfal két oldala között.



28.ábra *E.Coli* baktérium kitapadásának mérése COP rétegen

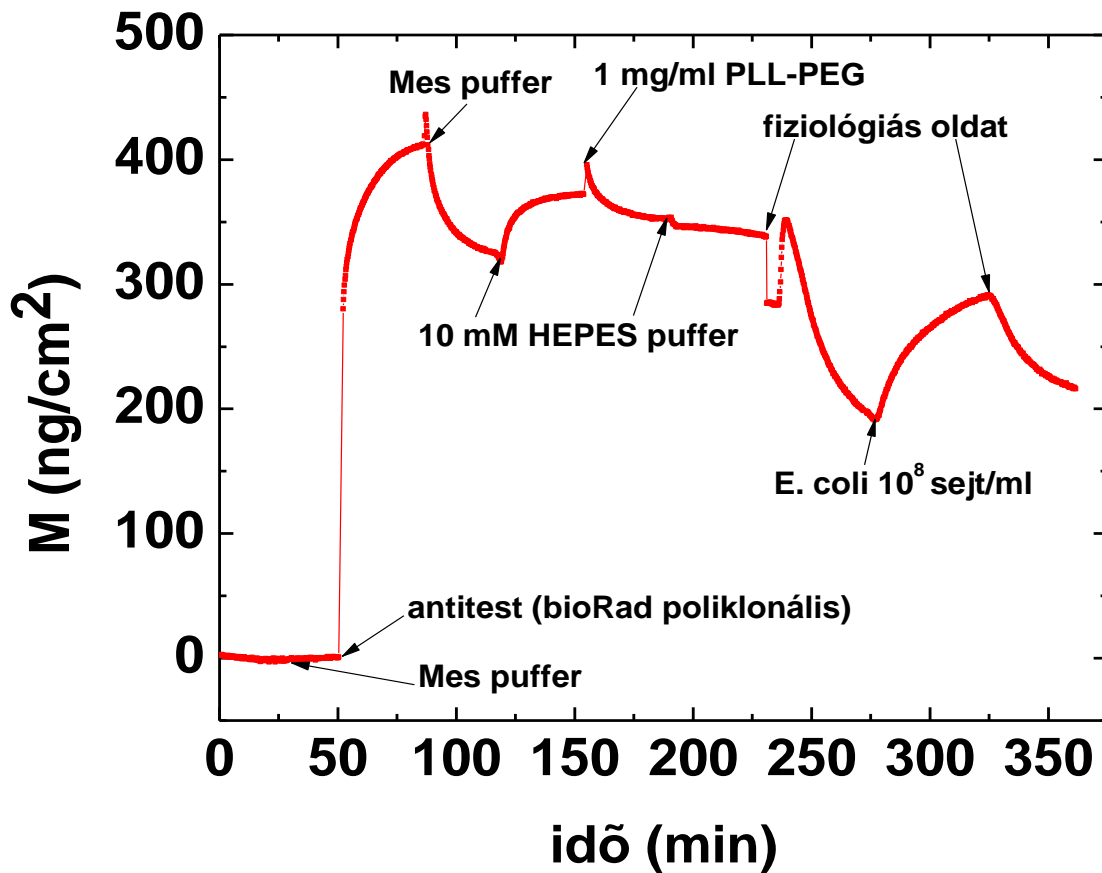
A mérés során a Mix&Go (135ng/cm^2) és az antitest (281 ng/cm^2) nagy mennyiségben kitapadt a felszínre. A baktérium is láthatóan megjelent a felszínen (88 ng/cm^2), viszont a mosást követően már csak nagyjából 1 ng/cm^2 maradt a felszínen *E. coli* baktériumból. Mivel ez a műszer érzékenységének a határa így a kitapadás kétséges. Igazolást nyert, hogy ezen áramlási körülmények mellett a baktériumok irreverzibilisen tapadnak ki a felületre.

5.2.3 *E.Coli* adszorpciója blokkolás után

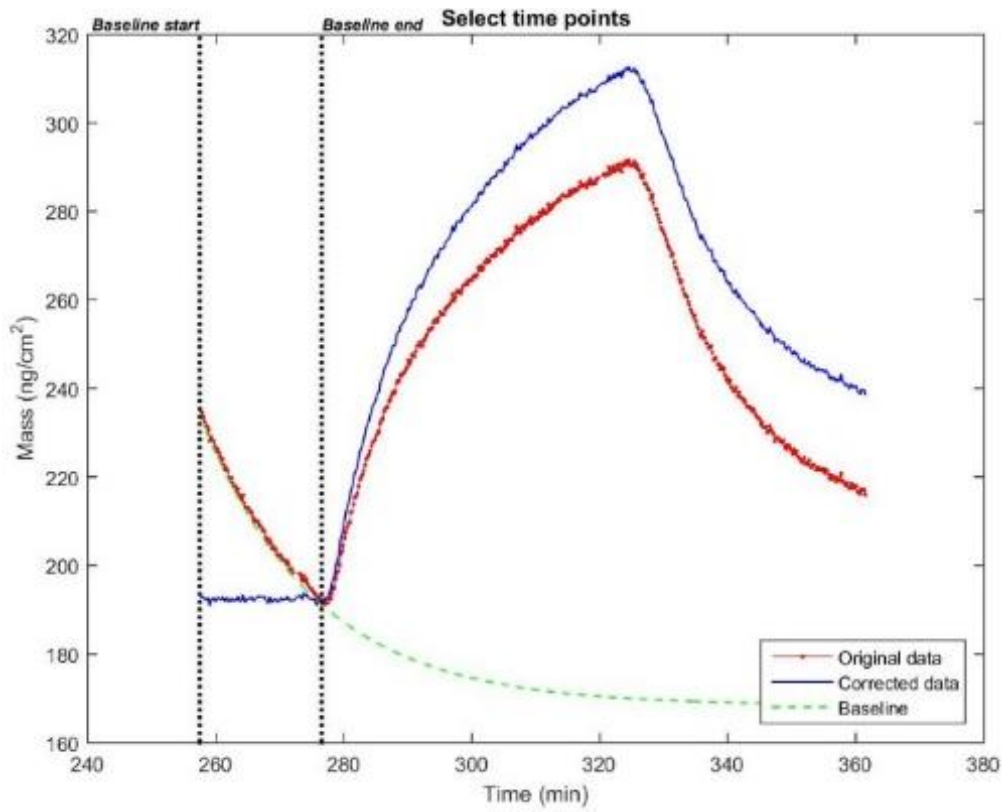
Mivel a COP réteg is legalább 20 nm vastag a felszínen, és erre visszük fel anyagjából 10nm vastag Mix&Go, majd az antitest réteget, így már az evaneszcens tér határára tudnak csak tapadni a baktériumok ezért COP réteg nélkül is végeztünk mérést.

A MES puffereben felvettük az alapvonalat, majd Antitestet injektáltunk a rendszerbe. Az antitestek OWLS chipre kitapadt felületi tömegsűrűsége 409ng/cm^2 volt, ami minimális drifttel állt be. Ezután puffercsere következett, majd a PLL-PEG oldatot injektáltuk a rendszerbe, ami nem tapadt ki a felületre, mivel 0 ng/cm^2 felületi tömeg sűrűség értéket kaptunk PLL-PEG polimerre. Jelentős drift volt tapasztalható a fiziológias alapvonalnál ezért exponenciális illesztéssel korrekciót hajtottunk végre. A fiziológias sóoldattal felvett

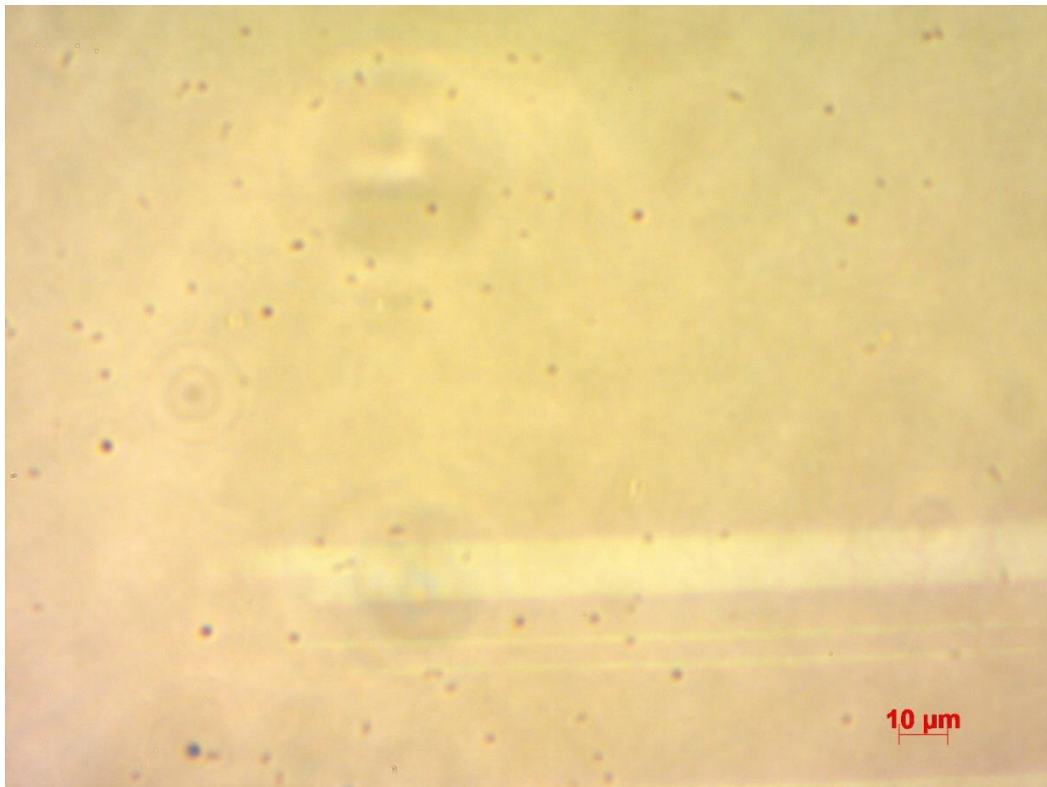
alapvonal korrekció után, az E.Coli baktérium felületre kitapadt tömege a maximális jelnél 121 ng/cm², és lemosás után 46 ng/cm². A baktérium kitapadását a mikroszkópos képek is igazolták. (30.ábra)



29. ábra E.Coli adszorpció mérés ProteinA-val kezelt chipen



30. ábra A fiziológias sóoldattal felvett alapvonal korrekciója exponenciális illesztéssel.



31. ábra A baktériumok optikai mikroszkópos képe a küvetta közepénél

Látható, hogy az antitest jelentős mennyiségben kitapadt a Protein-A-val kezelt felületre (325 ng/cm²). A PLL-PEG felületre kitapadt tömegére 0 ng/cm²-ot kaptunk, vagyis nem történt meg a kitapadás. A fiziológiás sóoldattal felvett alapvonal korrekció után, az E.Coli baktérium felületre kitapadt tömege a maximális jelnél 121 ng/cm², és lemosás után 46 ng/cm². A PLL-PEG nem blokkolja jól a baktérium adszorpciót, mivel rosszul tapad ki a felületre, ezért nagyobb felületi tömegsűrűségű baktérium maradt a felületen. Azonban maximális jelnél és lemosás után jobban karakterizálható mennyiségek tudnak kitapadni, mint Mix&Go-val történt mérés estében.

6 Összefoglalás

Az MTA-MFA-EK Nanobioszenzorika kutatócsoportjánál egy folyamatban lévő kutatáshoz (VEKOP-RUBA) csatlakoztam, ami során ipari megrendelésre végzünk méréseket egy vizelet analízátor egység kifejlesztéséhez. Munkám során egy fluidikai kazetta működőképességét alátámasztó méréseket végeztem OWLS műszer használatával. Ennek megvalósítására egy OWLS szenzorchip felületén, egy polimer réteg létrehozása volt a cél, amely pár tíz nanométeres rétegvastagsággal és a lehető legkisebb felületi érdességgel rendelkezik. Erre a célra két fajta polimer, polikarbonát (PC) és ciklikus olefin polimer (COP) állt rendelkezésre.

Munkám során a polimerek felhasználásával oldatot készítettem, majd az oldatokból vékonyréteget alakítottam ki a chipék felszínén. A felviteli paraméterek változtatásával, a réteg tulajdonságainak javítása volt a cél. A változtatások kialakult rétegre gyakorolt hatásának ellenőrzésére, több módszert (Profilometria, Ellipszometria, Atomerő mikroszkóp) is alkalmaztam. Az ezek alapján a PC esetében sikerült 20-30 nm-es rétegvastagságot is elérni, 5-10 nm felületi érdesség RMS mellett. A COP esetében is sikerült a 15-30 nm vastagságú réteg létrehozása, akár 2-5 nm felületi érdesség elérésével OWLS chip-re felvitt réteg esetén. Az így létrehozott chip alkalmazásával, vizelet és baktérium adszorpcióját mértem. A baktériumok kitapadására kétfajta immobilizációs módszert teszteltünk, Mix&Go és ProteinA használatával és az utóbbi bízató eredményeket mutat. Az utóbbi esetben sikerült megfelelő mennyiségű baktérium adszorbeálódott a felületen.

A továbbiakban a ciklohexánban oldott COP használatával tervezzük folytatni a vizsgálatokat. Ahhoz viszont, hogy meggyőződjünk a módszerek felhasználhatóságáról további kísérletekre van szükség. Az elkészült chip használatával további baktérium adszorpció méréseket is tervezünk, hogy lássuk sikerült-e a megfelelő réteget és immobilizációs eljárást kialakítani, amely validálja a vizeletanalízáló berendezés működőképességét.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek, **Dr. Bonyár Attilának** támogatásáért, és **Dr. Horváth Róbertnek**, aki lehetőséget biztosított munkám sikeres elvégzéséhez, illetve dolgozatom megírásához.

Köszönet illeti konzulensemét **Nagy Ágoston Gábort**, hogy tevékenységemet tanácsokkal látta el és a sok tapasztalatért, amit átadott.

Köszönettel tartozom még **Farkas Enikőnek** munkám felügyeltéért és a mérések elvégzésének biztosításáért.

Köszönöm az **MTA-MFA-EK Nanobioszenzorika** kutatócsoportnak a belém vetett bizalmukat, segítségüket és hogy már az első nap óta csapattagnak érezhetem magam közöttük.

Továbbá hálával tartozom a **77Elektronika Kft.** részére, illetve **Szabó Dórának** és csapatának is, akik a Semmelweis Orvostudományi Egyetemről az antitesteket biztosították.

7 Irodalomjegyzék

- [1] Asif Ahmed, Jo V. Rushworth, Natalie A. Hirst, Paul A. Millner, „Biosensors for Whole-Cell Bacterial Detection,” *Clinical Microbiology Reviews*, pp. 631-633, 2014.
- [2] Y. Fang, *Label-Free Cell-Based Assays with Optical Biosensors in*, ASSAY and Drug Development Technologies, 2006.
- [3] J. Vörös, J.J. Ramsdenb, G. Csucs, I. Szendro, S.M. De Paul, M. Textor, N.D. Spencer, *Optical grating coupler biosensors*, *Biomaterials* 23 , 2002.
- [4] H.H. Chienl, K.J. Mal, Jeremy J. Ramsden, Y.P. Yeh, *Kinetic Study of Bacterial Adhesion on Biomaterials by Using Optical Waveguide Lightmode Spectroscopy*, International Conference on Electronic & Mechanical Engineering and Information Technology, 2011, pp. 1205-1206.
- [5] Róbert Horváth, Henrik C. Pedersen, and Nina Skivesen, Dávid Selmeczi and Niels B. Larsen, *Optical waveguide sensor for on-line monitoring of bacteria*, *Optics Letters*, 2003.
- [6] R. Horváth, G. Fricsovszky, E. Papp *, „Application of the optical waveguide lightmode spectroscopy to monitor lipid bilayer phase transition,” *Biosensors and Bioelectronics* 18 , pp. 415-428, 2003.
- [7] MICHAEL SANDER,* MICHAEL MADLIGER, REN E P. SCHWARZENBACH, „Adsorption of Transgenic Insecticidal Cry1Ab Protein to SiO₂,” *Environmental Science & Technology*, %1. kötet44, %1. szám23, p. 8870–8876, 2010.
- [8] B. C. E.-O. MEASUREMENTS és M. Ltd, „owls-sensors.com,” [Online]. Available: <https://www.owls-sensors.com/pdf/EC-OWLS.pdf>. [Hozzáférés dátuma: 15 10 2019].
- [9] O. 210 és M. Ltd, „<https://www.owls-sensors.com>,” MicroVacuum Ltd, [Online]. Available: https://www.owls-sensors.com/pdf/OWLS_Standard_System.pdf. [Hozzáférés dátuma: 15 10 2019].
- [10] S.-0. I. S. HOLDER és M. Ltd. [Online]. Available: <https://www.owls-sensors.com/pdf/SH-0812.pdf>. [Hozzáférés dátuma: 15 10 2019].

- [11] M. Ltd, „www.owls-sensors.com,” 07 05 2018. [Online]. Available: <https://www.owls-sensors.com/pdf/OWLS-210-4-pages.pdf>. [Hozzáférés dátuma: 5 10 2019].
- [12] Özlem Torun, Ismail Hakkı Boyacı, Erhan Temur, Ugur Tamer, „Comparison of sensing strategies in SPR biosensor for rapid and sensitive,” *Biosensors and Bioelectronics*, 2012.
- [13] C.A.Brown*G.Savary, „Describing ground surface texture using contact profilometry and fractal analysis,” *Wear*, %1. kötetVolume 141, %1. számIssue 2, pp. 211-226, 1991.
- [14] N. Instruments, „Nanoscience.com,” 2017. [Online]. Available: <https://www.nanoscience.com/techniques/optical-profilometry/stylus/>. [Hozzáférés dátuma: 5 10 2019].
- [15] M. Tortonese, R. C. Barrett, and C. F. Quate, *Atomic resolution with an atomic force microscope using piezoresistive detection*, Appl. Phys. Lett.: American Institute of Physics. , 1993.
- [16] B. B. (Ed.), *Springer Handbook of Nanotechnology*, 4th szerk., Germany : Springer Nature , 2017.
- [17] Nirschl, M., Reuter, F., & Vörös, J, *Review of Transducer Principles for Label-Free Biomolecular Interaction Analysis. Biosensors*, Biosensors, 2011.
- [18] J. J. Ramsden, *Optical biosensors*, 1997.
- [19] Ogieglo, W., Wormeester, H., Eichhorn, K.-J., Wessling, M., & Benes, N. E. , „In situ ellipsometry studies on swelling of thin polymer films: A review.,” *Progress in Polymer Science*, %1. kötet42, p. 42–78., 2015.
- [20] A. T. P. Ltd, „<https://www.sigmaaldrich.com>,” Anteo Technologies Pty Ltd, [Online]. Available: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/aplsc010?lang=hu®ion=HU>

