

Patkó Dániel

DOI: 10.18136/PE.2015.586

**Nagyérzékenységű jelölésmentes bioszenzorika: optikai,
mikrofluidikai fejlesztések a fehérjék, baktériumok és
extracelluláris vezikulák felületi kitapadásainak
detektálásához**

- Doktori (PhD) értekezés -

Pannon Egyetem – Molekuláris- és Nanotechnológiák Doktori Iskola
Magyar Tudományos Akadémia Műszaki Fizikai és Anyagtudományi
Intézet

Témavezető:

Dr. Horváth Róbert

Budapest, 2015

Tartalom

I. A PhD értekezés kivonatai	6
I.I. Nagyérzékenységű jelölésmentes bioszenzorika: optikai, mikrofluidikai fejlesztések a fehérjék, baktériumok és extracelluláris vezikulák felületi kitapadásainak detektálásához	6
I.II. Highly sensitive label-free biosensorics: development of optics, fluidics; for the study of proteins, bacteria and the adhesion of extracellular vesicles	8
I.III.	9
Sehr sensible markierungsfreie Biosensoren: Entwicklung der Optik, Fluidtechnik zu der Untersuchung der oberflächlichen Adsorption der Proteine, der Bakterien und der extrazellulären Vesikeln.....	9
Tézispontok.....	10
Előszó.....	11
1. Bevezetés: A bioszenzorika jelentősége és alkalmazási területei	13
2. Áttekintés	14
2.1. Jelölőanyagokat is alkalmazó bioszenzorika	14
2.2. Jelölésmentes bioszenzorika és a legismertebb jelölésmentes eljárások	15
2.3. Hullámvezetők kezelése, felületi módosítása	20
3. Célkitűzés.....	23
4. Kutatási előzmények	24
5. Műszeres fejlesztések, egysugaras interferencia.....	25
5.1. Újfajta geometriájú szenzor csip és működési alapelvei	25
5.2. Egynyalábos interferencia.....	27
5.3. Kétcsatornás elrendezés és kétcsatornás átfolyó küvetta kifejlesztése párhuzamos mérésekhez.....	28
5.4. Fázismodulálás a nagyobb érzékenységért és belső referencia alkalmazása.....	29
5.5. Az alkalmazott hullámvezető módusok elméleti érzékenységei.....	31
5.6. A szenzor linearitása és homogenitása	32
5.7. Fehérjeadszorpció vizsgálata a kifejlesztett GCI szenzorral.....	34
5.8. Műszeres fejlesztés összefoglalása	36
6. Speciális, kétoldalú ragasztó alapú küvetta a mérések során felhasznált anyagmennyiség csökkentésére	37
6.1. A mikrocsatornák jelentősége	37
6.2. A kétoldalú ragasztó típusai	38
6.3. Tervezés és kivágás	38
6.4. Az alkalmazott hullámvezetők	39
6.5. A mikrocsatorna összeszerelése	39

6.6. Folyadékkezelés	39
6.7. Kétcsatornás ragasztó alapú küvetta-rendszer kialakítása és összeszerelése a GCI szenzor csippel	40
6.8. „Stop-flow” OWLS mérések egycsatornás kétoldalú ragasztó alapú küvetta-vel	43
6.9. Átlátszó integrált mikrofluidikai rendszer baktériumok vizsgálatára	44
6.10. Mikroküvetta fejlesztés összefoglalása	46
7. Extracelluláris vezikulák felületi adhéziójának monitorozása GCI-vel.....	47
7.1. Az extracelluláris vezikulák	47
7.2. Extracelluláris vezikulák a jelölésmentes szenzorikában	49
7.3. A vezikulák preparálása	50
7.4. A vezikulamérés eredményei	52
7.5. Az extracelluláris vezikulákkal kapcsolatos eredményeim összefoglalása.....	55
8. PhD eredményeim összefoglalása.....	56
9. Függelék.....	58
9.1. Elektromágneses síkhullámok terjedése szigetelő közegben.....	58
9.2. Interferencia	62
9.3. Sík hullámvezetők.....	63
9.4. A módus egyenlet és a hullámvezető érzékenysége.....	64
9.5. A hullámvezetők érzékenysége	67
10. Köszönetnyilvánítás	70
11. Saját publikációk jegyzéke.....	71
11.1. A disszertációhoz kapcsolódó publikációk.....	71
11.2. A disszertációhoz nem kapcsolódó publikációk.....	71
11.3. Konferencia szereplések, előadások.....	72
12. Irodalomjegyzék.....	75

I. A PhD értekezés kivonatai

I.I. Nagyérzékenységű jelölésmentes bioszenzorika: optikai, mikrofluidikai fejlesztések a fehérjék, baktériumok és extracelluláris vezikulák felületi kitapadásainak detektálásához

Fő tudományos tevékenységem a GCI (Grating Coupled Interferometry), rácscsatolt interferometrikus szenzor, egy jelölésmentes, nagy érzékenységű, optikai műszer fejlesztését és alkalmazásait foglalja magában. Kutatásaim során bevezetésre került egy precíziós optikai hullámvezető alapú érzékelőcsip, mely magas optikai minőségének köszönhetően nagy érzékenységet tesz lehetővé. Feladatomból volt a rendszer hőmérsékleti stabilitásának megoldása, valamint a fluidikai rendszer kialakítása is. Munkám során egy új GCI optikai elrendezés került kifejlesztésre a nagyobb érzékenység és stabilitás elérése érdekében. Célirányos kísérletekkel igazoltam, hogy a kifejlesztett berendezés a törésmutatóváltozást 10^{-7} - 10^{-8} pontossággal, az érzékelőfelületre kitapadt anyagmennyiséget pedig $0,1 \text{ pg/mm}^2$ alatti pontossággal képes meghatározni.

Napjainkban általános elvárás, hogy a méréseink során minél kevesebb mintából nyerhessünk értékelhető eredményt. Ehhez egy olyan mikrofluidikai rendszer kialakítására volt szükség, mely teljes mértékben biokompatibilis, nem vízzeloldékony és egyszerűen, gyorsan előállítható. Az általam bevezetett kétoldalú ragasztó alapú mikrofluidikai rendszer eleget tesz a felsorolt követelményeknek. A kialakított mikrofluidikai rendszer lehetővé teszi, hogy néhány mikroliter térfogatú minta felhasználásával sikeres mérést hajtsunk végre, közelebb kerülve a „point of care” diagnosztikához. Ezenkívül jelentősnek tartom, hogy a kétoldalú ragasztónak köszönhetően lehetőség nyílt átlátszó fluidikával integrált szenzor kialakítására, mely párhuzamos mikroszkópos méréseket tesz lehetővé, kiegészítő képi információt adva a bioszenzoros adatokhoz.

Munkám második fő tevékenysége arra fókuszált, hogy a fenti szenzor kimagasló érzékenységét kiaknázzuk a modern biológiai kutatásokban. Tanulmányoztam többek között fehérjék (fibrinogén, avidin) és baktériumok (szalmonella) felületi adhézióját. Legjobb tudomásom szerint elsőként vizsgáltam jelölésmentes optikai bioszenzorral extracelluláris vezikulák felületi kitapadását. Ezen vezikulák többek között fontos szerepet játszanak az immun-rendszerünkben, sejtek közötti kommunikációban. Tulajdonságaikat az őket létrehozó (szekretáló) sejtek határozzák meg. Az extracelluláris vezikulák alaposabb megismerése forradalmasíthatja a modern orvoslást. Kísérleteimben mátrixfehérjék (kollagén, fibronectin) és pozitívan töltött polimerek rétegeire

történő adszorpcióját tanulmányoztam. Célrányos kitapadási kísérletek segítségével közelebb kerülhetünk a vezikulák szervezeten belüli viselkedésének jobb megértéséhez is.

I.II. Highly sensitive label-free biosensors: development of optics, fluidics; for the study of proteins, bacteria and the adhesion of extracellular vesicles

The Grating Coupled Interferometry (GCI) sensor is a label-free, highly sensitive, planar optical waveguide based interferometry sensor. A Peltier-based temperature stabilizing system was applied to eliminate thermal fluctuations. With the applied expanded beam I could use a double channel based fluidic system, and one of the channels can be used as a reference. The sensitivity of the developed GCI is around 10^{-7} - 10^{-8} in RIU and it has 0.1 pg/mm^2 surface mass sensitivity.

The amount of the sample can be very critical. Fortunately a double-sided tape based microcuvette system can solve these needs. The whole microfluidic preparation process takes less than 5 minutes. The double-sided tape is absolutely biocompatible. With this system even a few microliters of the sample is measurable. A transparent fluidic system is demonstrated, parallel microscopic control is available.

It was important to find good, modern, biological applications for the GCI. I had studied the adsorption of proteins, bacteria and human cell secreted extracellular vesicles. The adsorption of the vesicles on various surfaces can be very important in therapeutic and diagnostic applications.

I.III.

Sehr sensible markierungsfreie Biosensoren: Entwicklung der Optik, Fluidtechnik zu der Untersuchung der oberflächlichen Adsorption der Proteine, der Bakterien und der extrazellulären Vesikeln

Der Grating Coupled Interferometry Sensor ist ein markierungsfreier, sehr sensibler, Interferometriesensor mit Flächeoptik - Wellenleiter Basis. Um die thermischen Fluktuationen zu eliminieren, wurde ein Peltier Temperatur Stabilisierungssystem angewendet. Mit der Hilfe des erweiterten Strahls habe ich einen Zweikanal Fluid System verwendet. Der eine ist die Referenz der andere ist der Messkanal. Die Empfindlichkeit des entwickelten Sensors ist 10^{-7} - 10^{-8} Brechungsindex Einheit und der Oberflächen Masseempfindlichkeit 0.1 pg/mm^2 .

Die Menge des Musters ist sehr kritisch. Glücklicherweise kann das auf dem doppelseitiges Klebeband basierende Mikroküvette System die Probleme lösen. Die Herstellung des mikrofluidischen Systems dauert weniger als 5 Minuten. Es ist absolut biokompatibel und die Dicke des Bandes ist kontrollierbar. Weniger Mikroliter des Musters kann mit diesem System gemessen werden. Dank dem durchsichtigen fluidischen System ist auch eine mikroskopische Kontrolle möglich.

Es war sehr wichtig, gute, moderne, biologische Anwendungen zu den GCI zu finden. Ich habe die Adsorption der Proteine, der Bakterien und extrazellulären Vesikeln von humanen Zellen studiert. Die Adsorption der Vesikeln auf verschiedenen Oberflächen kann in den therapeutischen und diagnostischen Anwendungen sehr wichtig sein.

Tézispontok

- 1.a Elsőként valósítottam meg egy egysugaras elrendezésű jelölésmentes interferometrikus optikai bioszenzort (Rácscsatolt Interferometrikus Szenzor, angolul Grating Coupled Interferometry, GCI). A fejlesztéshez egy újszerű, rendkívül jó minőségű hullámvezető csipet használtam fel, melyen két becsatoló és egy kicsatoló rács található. A becsatoló rácsokat egyszerre világítottam meg oly módon, hogy a lézerforrás fényét egy nyalábtágítóval kitágítottam. A referenciajelet egy osztott folyadékkristályos modulátor segítségével generáltam. A szenzorfelületen kialakított két fluidikai csatornával növeltem az érzékenységet és a stabilitást. A kifejlesztett GCI berendezés tetszőleges polarizációjú (TE vagy TM) hullámvezető módusok felhasználásával képes mérni. A fejlesztéseknek köszönhetően a GCI alkalmas lett biológiai minták nagy érzékenységgű és rutinszerű vizsgálatára [1].
- 1.b Megmutattam, hogy a GCI műszer törésmutató-érzékenysége 10^{-7} - 10^{-8} nagyságrendbe esik, felületi érzékenysége $0,1 \text{ pg/mm}^2$ alatti. Mérések segítségével sikerült igazolnom, hogy a szenzor csip laterális homogenitása kiváló, alkalmas valódi biológiai minták mérésére is. A szenzor a TM polarizáció alkalmazásával érzékenyebbnek bizonyult, mint a TE használata esetén. Az eredmények az elméleti számolásokkal teljesen összhangban állnak [1].
2. Kialakítottam egy kétoldalú ragasztó alapú mikrofluidikai rendszert, mely teljesen biokompatibilis, és az integrációja nem igényel speciális laboratóriumi háttérrel. Egy rajzolóprogram segítségével megtervezhetőek a csatornák, és egy szén-dioxid lézeres gravírozóval könnyen, gyorsan ki lehet vágni a megtervezett formákat, majd az összeépítési folyamat mindössze pár percet vesz igénybe. A kialakított mikrocsatorna magassága az $50 \text{ }\mu\text{m}$ -tól akár több $100 \text{ }\mu\text{m}$ -ig is terjedhet, a ragasztó típusától függően. A lézergravírozó által kivágható legvékonyabb csatorna kb. $120 \text{ }\mu\text{m}$. Az általam kialakított csatornarendszer segítségével akár már néhány mikroliter térfogatú folyadék is mérhető. A rendszer működőképességét GCI szenzorral, glicerinnel mérésén keresztül mutattam be. Széleskörű felhasználhatóságát OWLS műszerrel is demonstráltam, melyhez kialakítottam egy csatornaformát, és „stop-flow” technikával fehérjeadszorpciós kísérletet végeztem [2].
3. Az előző tézispontban megfogalmazott eredményeim alapján kialakítottam egy teljesen átlátszó, optikai csippel integrált mikrofluidikai rendszert, melynek alkalmazásával a méréssel párhuzamosan mikroszkópos mérések elvégzése is lehetséges, fáziskontraszt és fluoreszcens képek készíthetők, melyekkel kiegészítő vizuális információ nyerhető a GCI szenzorral mért adatok mellé. A küvetta rendszer alkalmazhatóságát szalmonella baktériumok letapadásának jelölésmentes követésével igazoltam, melynek patológiai vonatkozásai is érdekesek [2].
4. Legjobb tudomásom szerint elsőként vizsgáltam extracelluláris vezikulák mátrixfehérjékkel történő kölcsönhatását jelölésmentes bioszenzor segítségével. A mérések során a T-limfocita eredetű CCRF vezikulák extracelluláris mátrixfehérjék és pozitívan töltött polimerek monorétegeire történő adszorpcióját követtem valós időben. Megállapítottam, hogy a CCRF vezikulák jól tapadtak a fibronektinnel valamint a poli-L-lizinnel bevont felületre, de nem rögzültek sem a kollagénnel bevont, sem pedig a bevonatlan szenzorfelületre [3].

Előszó

PhD tanulmányaimat a Pannon Egyetem Molekuláris és Nanotechnológiák Doktori Iskolájában, kutatásaimat Dr. Horváth Róbert témavezetése mellett a Magyar Tudományos Akadémia Energiatudományi Kutatóközpont Műszaki Fizikai és Anyagtudományi Intézetében végeztem. Munkám során egy nemzetközi együttműködés keretében részt vettem egy nagy érzékenységű, jelölésmentes, optikai bioszenzor fejlesztésében, valamint alkalmaztam a kifejlesztett műszert a modern biológiai kutatásokban. PhD disszertáciomban a fenti munkákból származó eredményeket kívánom bemutatni. Részt vettem egyéb, a bioszenzorikát érintő kutatásokban és együttműködésekben is, de ezeket az eredményeket terjedelmi okok miatt nem kívánom tárgyalni ebben a munkámban.

Napjaink rohamosan fejlődő világában a bioszenzorika szerepe is egyre növekszik. Vitathatatlanul fontos jelentősége van a biológiai minták (ezalatt érthetjük akár az embert, akár a legkisebb fehérje molekulát is) tulajdonságainak és viselkedésének pontos megértésében, megismerésében, feltérképezésében.

Mielőtt részletekbe bocsátkoznék, fontosnak tartom, hogy definiáljam, mi is az a bioszenzorika. Az egyik legelterjedtebb definíció szerint egy bioszenzor 3 egységből épül fel, a jelfelismerő rendszerből, a jelátalakítóból és jelfeldolgozóból. A biológiai jelfelismerő lehet enzim, antitest, sejt, fehérje vagy valamilyen mikroorganizmus. A jelátalakító elektromos jellé alakítja a detektált jelet, mely lehet optikai jel, pH, hőmérséklet vagy tömeg [4]. Az elektromos jelet pedig számítógépekkel dolgozzuk fel (1. ábra).



1. ábra A bioszenzorok működését ábrázoló sematikus rajz [5].

Egy másik, tágabban értelmezett definíció szerint: „A bioszenzor a biológiai jelek

átalakítására vagy detektálására és detektálásuk megkönnyítésére szolgáló eszköz” [6]. Látható, hogy ez a fajta megközelítés nem foglalkozik a jelfelismerő elemmel. Ezen értelmezés szerint az EKG vagy az MRI készülék is bioszenzornak tekinthető. PhD tanulmányaim alatt én az első definíció alapján vett bioszenzorokkal foglalkoztam.

1. Bevezetés: A bioszenzorika jelentősége és alkalmazási területei

A bioszenzorika nélkülözhetetlen az orvosi diagnosztikától a mezőgazdaságig, élelmiszerbiztonságon át akár a nemzetvédelmi alkalmazásokig. Bioszenszenzorikai eljárások közé tartoznak többek között a legegyszerűbb orvosi rutindiagnosztikák, például a vércukorszint tesztek vagy a rákdiagnosztika, illetve különböző kórokozókat kimutató tesztek. A mezőgazdaságban az utóbbi időben igen nagy figyelmet kapott a *Fusarium* gombával szennyezett gabona. Megfelelő méréstechnika nélkül ez sem lenne kimutatható, és emberek tömegei betegednének meg. A hentesnél kapható húsnál is csak méréssel zárható ki, hogy botulinum toxint tartalmaz [7]. Sajnos szomorú aktualitása van a napjainkban rohamosan terjedő afrikai *ebola* járvány [8] miatt is a modern, érzékeny és terepen is használható bioszenzorok kialakításának.

Noha nemzetközi egyezmények tiltják a biológiai, kémiai tömegpusztító fegyverek alkalmazását, egyetlen modern hadsereg sem lehet hatékony a megfelelő védelem nélkül, melynek sarokpontja az, hogy idejében ki lehessen mutatni az esetleges fertőzéseket okozó baktériumokat, vírusokat, toxinokat [7,9].

A multirezisztens kórokozók megjelenésével különösen nagy lett a jelentősége a korai diagnosztikának. Sőt, rendkívül fontos, hogy olyan érzékeny technikával rendelkezünk, mely már a testi tünetek megjelenése előtt kimutathatóvá teszi az adott betegséget, hiszen köztudott; a korábbi diagnosztika hatványozottan könnyebbé és olcsóbbá teszi a megelőzést és a gyógyítást. Ennek nemzetgazdasági haszna is van, hiszen kevesebb lesz a beteg, és ők is hamarabb gyógyulnak meg, kevesebb időt töltenek betegszabadságon. Napjainkban a bioszenzorok egyre nagyobb térnyerése az alap biológiai, biofizikai kutatásokban is egyértelműen megfigyelhető [10–13].

Mindezek alapján látható, hogy a bioszenzorika elengedhetetlen része a mindennapok tudományának. Kutatása, fejlesztése nélkülözhetetlen és kötelező egy magára valamit is adó társadalomnak, hiszen saját elemi érdeke.

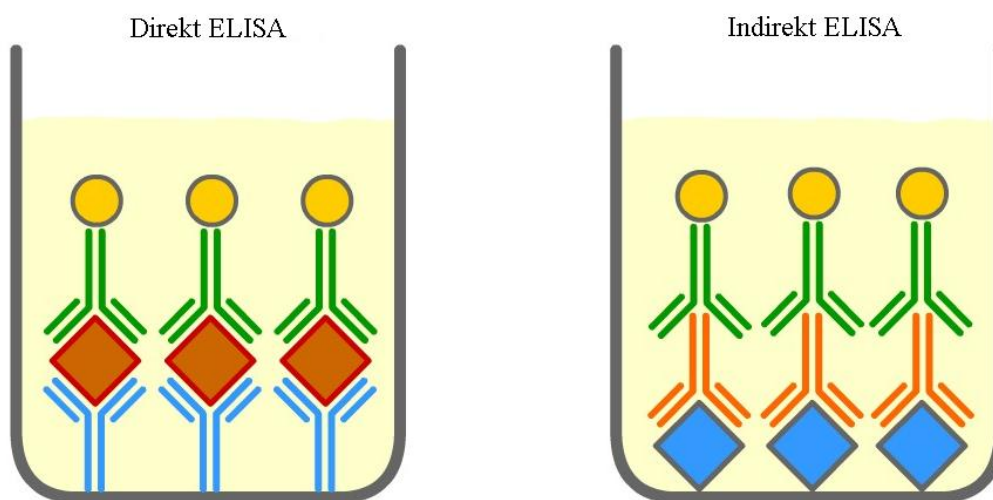
2. Áttekintés

2.1. Jelölőanyagokat is alkalmazó bioszenzorika

Az egyik legelterjedtebb és legismertebb, toxinokat és kórokozókat kimutatni képes technika az ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) teszt [14]. Az eljárást a múlt század második felében írták le először. Lényege, hogy a mérés során jelölőanyagokat is felhasználnak az eredmény láthatóvá tételére. Ez a jelölőmolekula lehet radioaktív anyag, festék, fluoreszcens molekula vagy egyéb kémiai anyag.

Működési elve immunológiai kölcsönhatásokon alapszik, vagyis antigén-antitest kölcsönhatáson. Alapvetően két típusát különböztetjük meg, a direkt és az indirekt ELISA-t (2. ábra). A direkt módszer esetében a mintánk egyik komponensét (antigént) kötő antitest egy szilárd fázishoz, a hordozóhoz (pl.: egy Petri-csésze aljához) van rögzítve. Először az antitesthez kötődik az antigén (az antitestek nagyfokú szelektivitásuk miatt csak a vizsgálni kívánt komponenst tudják megkötni). Ezután olyan antitestekkel kezeljük felületet, melyekhez egy jelölőmolekula van kötve. Miután ez a jelölt antitest is kötődik a mintához, egy pufferes mosást követően detektáljuk az így kapott jelet. Ha például valamilyen festékmolekula volt a jelölőanyag, akkor a detektálás fotometriásan történik.

Indirekt ELISA esetén az antigén van kötve a felülethez. A kötött antigénhez kapcsolódik az első specifikus antitest, majd ha ez bekötődött, ehhez kapcsolódik a jelölt antitest. A kiértékelés módja megegyezik a direkt ELISA esetében ismertetett módszerrel.



2. ábra Az ELISA két változatát mutatja az ábra, a direkt (balra) és az indirekt (jobbra) módszert [15].

Az ELISA tesztnél nagy érzékenységnövekedést érhetünk el, ha az úgynevezett Immuno-PCR technikát alkalmazzuk [16]. Ennek lényege, hogy jelölőanyagként egy nukleinsav szálát alkalmazunk, melyet aztán PCR eljárás során felsokszorozunk, így növelve meg a jelerősséget. Ennek a módszernek köszönhetően nagyságrendekkel javíthatjuk az érzékenységet.

Az ELISA teszt előnyei közé tartozik rendkívül nagy érzékenysége (akár egyetlen keresett molekulát is képes kimutatni), nagy ismertsége és széleskörű alkalmazhatósága, valamint a módszer nagy áteresztőképessége, vagyis az, hogy sok mérést lehet párhuzamosan végezni. Sajnos ezt a nagy érzékenységet a jelölőanyagnak köszönheti, melynek alkalmazása egyrészt drága, másrészt megváltoztathatja a vizsgálni kívánt minta környezetét. Másszóval nem természetes közege a mintának, ha festékmolekulák, vagy radioaktív részecskék vannak körülötte. Ráadásul az ELISA tesztek kiértékelése nem valós időben zajlik, így kinetikát igen csak nehézkes vele elemezni. Általánosságban elmondható, hogy a valós dinamikai folyamatok vizsgálatára az ELISA módszer alkalmatlan. Ez azért lehet fontos, mert a különböző felületek, bevonatok (pl.: implantátumok felületén) esetén nem mindegy, hogy milyen gyorsan és mekkora erővel tapadnak a vizsgálni kívánt biológiai részecskék az általunk használt felülethez. Ehhez pedig kinetikai elemzésre van szükség. További hátránya, hogy a teszt elvégzéséhez speciális laboratóriumi körülményekre van szükség, hogy a minta és a reagensek ne szennyeződjenek, valamint szakképzett személyzetre a kísérletek és mérések végrehajtásához. Mindezek jelentősen megdrágítják az ELISA teszt alkalmazását..

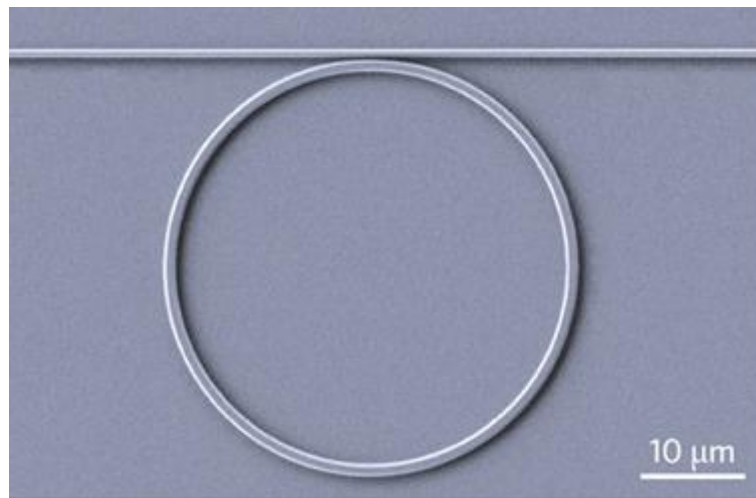
A felsorolt okok miatt érdemes olyan módszerek felé fordulnunk, ahol magának a vizsgálni kívánt mintának a fizikai jelenléte hozza létre a detektálni kívánt jelet.

2.2. Jelölésmentes bioszenzorika és a legismertebb jelölésmentes eljárások

Azokat a módszereket, melyeknél a mérések során nem használnak semmilyen jelölőanyagot, jelölésmentesnek nevezzük. Ilyen esetekben a mintának egy speciális, rá jellemző tulajdonságát vizsgáljuk, például a tömeg, a törésmutató vagy a vezetőképesség változását. Legismertebb tagjai közé tartoznak a tömegmérésen alapuló módszerek, pl. a kvarc kristály mikromérleg [17], a vezetési tulajdonságot vagy az elektromágneses tér megváltozását mérő nanoszál szenzorok [18], illetve azok az optikai módszerek, ahol törésmutató-változást mérünk. Utóbbiak közé tartozik a felületi plazmon rezonancián alapuló technikák vagy az általunk is kutatott és alkalmazott dielektrikumokat alkalmazó hullámvezetők [1,19–22].

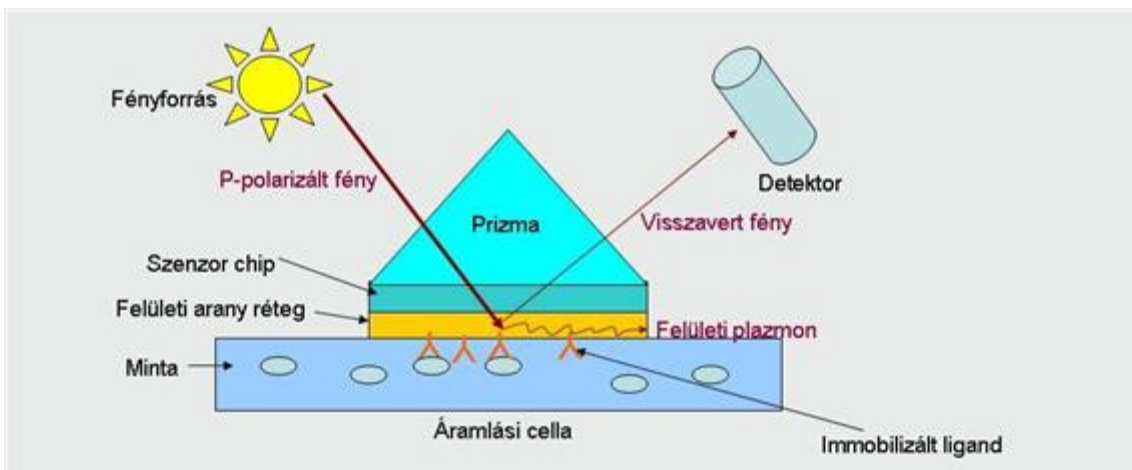
A „suttogó karzat” vagy gyűrű-rezonátor esetében egy optikai hullámvezetőből kialakított gyűrűbe csatoljuk be a fényt (3. ábra). Mivel a becsatolható fény hullámhossza függ a gyűrű területétől és a körülötte lévő közeg törésmutatójától, a becsatolt fény hullámhossz- vagy

intenzitásváltozásának vizsgálatával nagyon érzékeny szenzorhoz juthatunk. Kis mérete és sűrű telepíthetősége miatt széleskörű alkalmazása várható [20,23].



3. ábra Egy tipikus gyűrű rezonátor elektron mikroszkópos képe. [24].

Talán a legszélesebb körben ismert jelölésmentes, optikai bioszenzor az SPR (Surface Plasmon Resonance) szenzor [19,23,25–27]. Felületi plazmonokról akkor beszélünk, ha a vezető-dielektrikum határfelületen megfelelő szögű és hullámhosszú gerjesztés hatására töltés (elektron) oszcilláció alakul ki. Ez az oszcilláció egy haladó plazma hullámot hoz létre. A legelterjedtebb módszer, amikor a gerjesztő fényt egy prizma segítségével csatolják be, de ez megvalósítható rács, optikai szál vagy hullámvezető segítségével is. Prizmás csatolás esetén a gerjesztő fény teljes visszaverődést szenved a prizma-fém határfelületen és evanescens teret hoz létre, melynek térerőssége a szenzort fedő vizes közegben a határfelülettől távolodva exponenciálisan csökken. Megfelelő szög és hullámhossz esetén a fény gerjeszteni képes a felületi plazma hullámokat [28]. A kialakult plazma hullám kvantuma a plazmon. A fém felületén lévő anyag törésmutatója meghatározza a visszaverődés körülményeit. A minta által okozott változás kiválóan alkalmas arra, hogy biológiailag is releváns folyamatokat is lehessen valós időben követni. A 4. ábrán egy SPR elrendezés sematikus rajza látható.

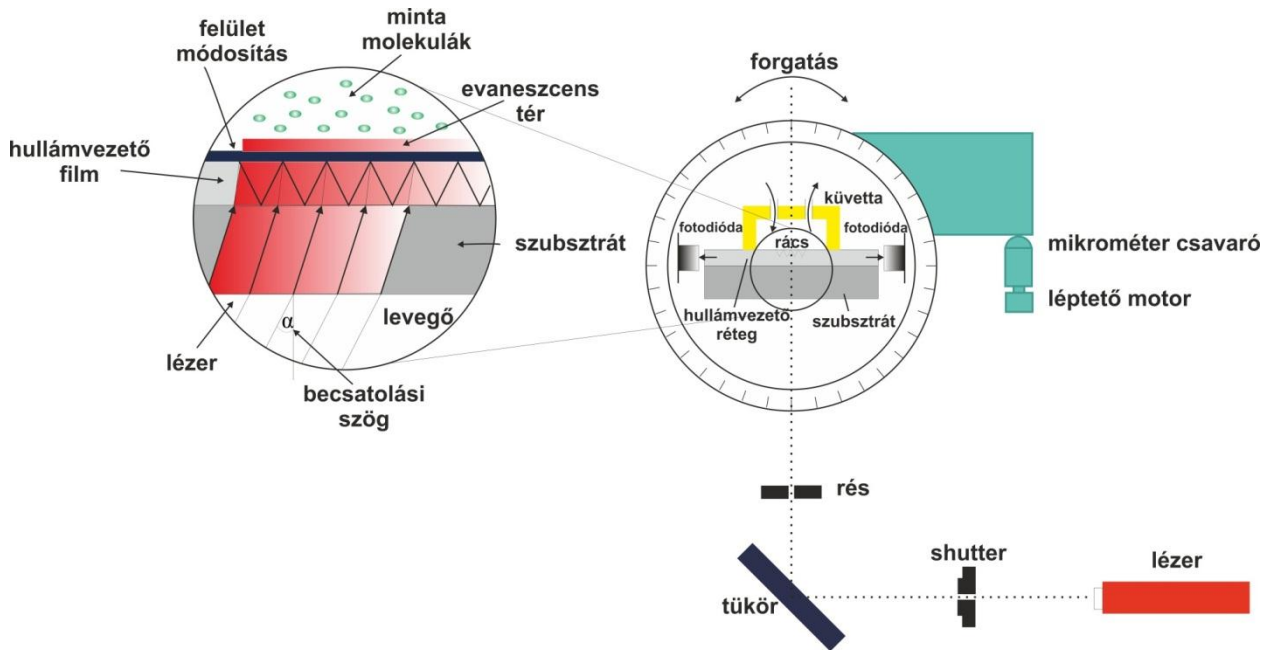


4. ábra A felületi plazmon rezonanciát kihasználó szenzor egyik tipikus elrendezése [5].

A hullámvezetőket alkalmazó módszer azon alapul, hogy általában egy optikai rács segítségével egy nagy törésmutatójú ($n \approx 2,2$) közegbe csatoljuk a mérőfényt (a mi esetünkben lézert fényt). Ebben a közegben a lézernyaláb többszörös teljes visszaverődést szenved, így rezonáns erősítés alakul ki. A teljes visszaverődések sorozatával terjedő fény egy része „kilóg” a nagy törésmutatójú közegből, evaneszcens teret létrehozva (5. ábra kinagyított rész).

Ha erre a hullámvezető felületre minta kerül, akkor ott megváltozik a törésmutató és ezáltal a fény terjedési tulajdonsága is. A fény tulajdonságait (pl. becsatolási szög, intenzitás) mérve tudjuk kiszámolni a törésmutató-változást, majd azt felhasználva tudunk megállapításokat tenni és következtetéseket levonni az általunk vizsgált felületi folyamatokról. A módszer nagy előnye, hogy átlátszó bevonatokkal kezelhető, módosítható a hullámvezető felülete, mely által igen széleskörű alkalmazási lehetőség nyílik meg a felhasználó számára. Lehetőség van hidrofób, illetve hidrofil felületek kialakítására, fehérjéket specifikusan kötő bevonatok létrehozására, valamint baktériumok, emlőssejtek felülethez való rögzítésére és tanulmányozására [3,10,11,29]. Ezen eljárások laboratóriumunkban is rutinszerűen elvégezhetőek. A tipikus behatolási mélysége egy hullámvezetőben terjedő optikai módusnak 80-300 nm közötti. Az SPR-rel szemben a hullámvezetőknél a behatolási mélység egyszerűen hangolható a hullámvezető struktúrájának megváltoztatásával, így az a mért objektum (fehérje, vírus, sejt) méretéhez igazítható [30–32].

Az egyik legáltalánosabban elterjedt dielektromos hullámvezetőket alkalmazó módszer az OWLS (Optical Waveguide Lightmode Spectroscopy), optikai hullámvezető fénymódus spektroszkópia (5. ábra). Mivel méréseim egy részét ezzel a módszerrel végeztem, szeretném részletesebben bemutatni.



5. ábra Az OWLS szenzor fő alkotórészei és működési elve [21].

Ennél a technikánál a felületközeleli törésmutató vizsgálata szögmérésre van visszavezetve oly módon, hogy a minta által a rács felett okozott törésmutató-változás miatt a becsatolási szög is megváltozik. A műszer lelke a hullámvezető optikai csip, valamint a csipet a rács hosszanti tengelye körül forgató goniométer. A becsatolt fény intenzitását fotodetektor segítségével mérhetjük [21]. A rács segítségével ellenőrzött módon lehet a hullámvezető rétegbe csatolni a lézerfényt (He-Ne, 632,8 nm). A korábban említett hullámvezetés és az evanescens tér kialakulása azonban csak megfelelő szögek és törésmutatók esetén történik meg. Ha a minta adszorpciója során a hullámvezető felületén az evanescens térben megváltozik a törésmutató, módosulnak a becsatolás feltételei, így a becsatolási szög is megváltozik. Ezt az effektust használjuk ki oly módon, hogy a becsatolási szöget folyamatosan mérjük. Pontosabban, a becsatolt fény intenzitását mérjük a becsatolási szög függvényében, és a kísérlet során követjük a (legnagyobb intenzitáshoz tartozó) becsatolási szög megváltozását, vagyis a módusokhoz tartozó rezonanciacsúcsok eltolódását. Így kinetikai információkhoz juthatunk a vizsgált felületi folyamatokról. Az optikai csatoláshoz a következő feltételeknek kell teljesülnie:

$$N = n_0 \sin \alpha + l \left(\frac{\lambda}{\Lambda} \right), \quad (1)$$

ahol N a gerjesztett hullámvezető módus effektív törésmutatója, n_0 a levegő törésmutatója, α a becsatolás szöge, l a diffrakciós rend (ez egymódusú OWLS hullámvezető csipek esetén általában 1), λ a gerjesztő fény hullámhossza és Λ a rácsállandó. Fontos megemlíteni, hogy a TE és TM polarizációjú módusokhoz külön becsatolási szög tartozik.

Abban az esetben, ha a hullámvezető felületére egy adott n_c törésmutatójú mintából n_A törésmutatójú fehérjeréteg adszorbeálódik, a hullámvezetőben terjedő módus effektív törésmutatóját a következő egyenlet segítségével számolhatjuk ki:

$$\pi m = \left(d_F + d_A \cdot (n_A^2 - n_C^2) \frac{\left(\frac{\left(\frac{N}{n_C} \right)^2 + \left(\frac{N}{n_A} \right)^2 - 1}{\left(\frac{N}{n_C} \right)^2 + \left(\frac{N}{n_F} \right)^2 - 1} \right)^\rho}{n_F^2 - n_C^2} \right) k \sqrt{(n_F^2 - N^2)} - \arctan \left(\left(\frac{n_F}{n_S} \right)^{2\rho} \frac{\sqrt{(N^2 - n_F^2)}}{\sqrt{(n_F^2 - N^2)}} \right) - \arctan \left(\left(\frac{n_F}{n_S} \right)^{2\rho} \frac{\sqrt{(N^2 - n_S^2)}}{\sqrt{(n_F^2 - N^2)}} \right). \quad (2)$$

ahol n_F és d_F a hullámvezető réteg törésmutatója és vastagsága, n_A és d_A az adszorbeálódott réteg törésmutatója és vastagsága, n_S a szubsztrát törésmutatója, $k=2\pi/\lambda$ a hullámszám, $\rho=0$ TE és $\rho=1$ TM polarizációjú módus esetén (a fenti, ún. módus egyenlet levezetése megtalálható a disszertáció Függelék fejezetében) [21,33]. A Feijter-formula segítségével a felületre kitapadt tömeg mennyiségét is meg lehet határozni az adszorbeálódott réteg optogeometriai paramétereinek ismeretében:

$$\Gamma = \Delta d_A \frac{n_A - n_C}{\frac{dn}{dc}}, \quad (3)$$

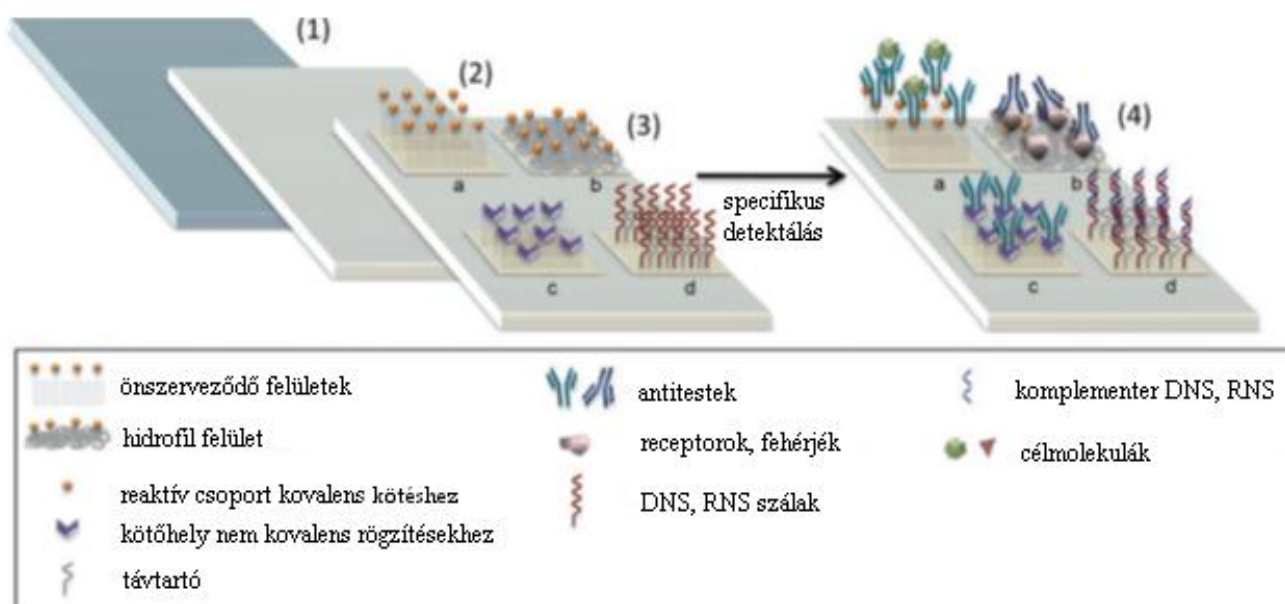
ahol a dn/dc értéke fehérjékre jellemzően $0,182 \text{ cm}^3/\text{g}$ [34].

Az OWLS-sel 10^{-5} -es pontossággal tudjuk meghatározni a törésmutatót. Mivel ez az eljárás a fény elektromos és mágneses komponenseit is felhasználja, ezért képesek vagyunk segítségével a felületre tapadt minta struktúráját is vizsgálni [11]. Mivel a goniométer mozgása zajforrás, amely lerontja az érzékenységet, így kisebb koncentrációjú minták mérése nem lehetséges, amit bizonyos esetekben, például egyes betegségekre jellemző molekulák kimutatásánál figyelembe kell vennünk.

Éppen ezért érdemes egy olyan jelölésmentes optikai bioszenzor fejlesztésébe fogni, ahol az OWLS-nél meglévő hibákat kiküszöbölhetjük, és jelentős mértékben növelhetjük az érzékenységet. Az interferométerekkel nagy érzékenység érhető el, nem tartalmaznak mozgó alkatrészt, és ha ezt a technikát egyesítjük a hullámvezetők nyújtotta stabilitással és gyártási technológiákkal, egy rendkívül érzékeny szenzorhoz juthatunk. Ez az igény és elhatározás adta a PhD-munkám egyik fő motivációját.

2.3. Hullámvezetők kezelése, felületi módosítása

Az optikai hullámvezetők alkalmazásának nagy előnye, hogy a felületük átlátszó anyagokkal könnyen és sokféleképpen módosítható. A felületek különböző szilanizációs eljárásokkal hidrofóbizálhatóak, fehérjékkel, immunanyagokkal specifikálhatók [3,11,23,29,35]. Felismerő-elemként felhasználhatunk nukleinsavrészleteket, antitesteket, fehérjéket, enzimeket, sejtfelszíni receptorokat stb. Alapvető követelmény a biocsip felszínének kezelésekor, hogy a felhasznált anyag ne veszítse el a funkcionalitását a bevonási procedúra során, illetve specifikus legyen a célmolekulára. Alapvetően négyféle funkcionálizálási módszert különböztethetünk meg (6. ábra):



6. ábra A biocsipek felületére történő immobilizálás négy alaptípusa (fizikai adszorpció (a), kovalens keresztkötés (b), nem-kovalens kötés (c), fizikai csapdázás (d)) [23].

(a) Fizikai adszorpció során a molekulát közvetlenül a felületre juttatjuk, semmilyen kémiai, biológiai rögzítő eljárást nem alkalmazunk. Előnye, hogy a felületre adszorbeált anyagokat az áramlási körülmények, a hőmérséklet vagy a pH megváltoztatásával viszonylag könnyen el lehet távolítani [36].

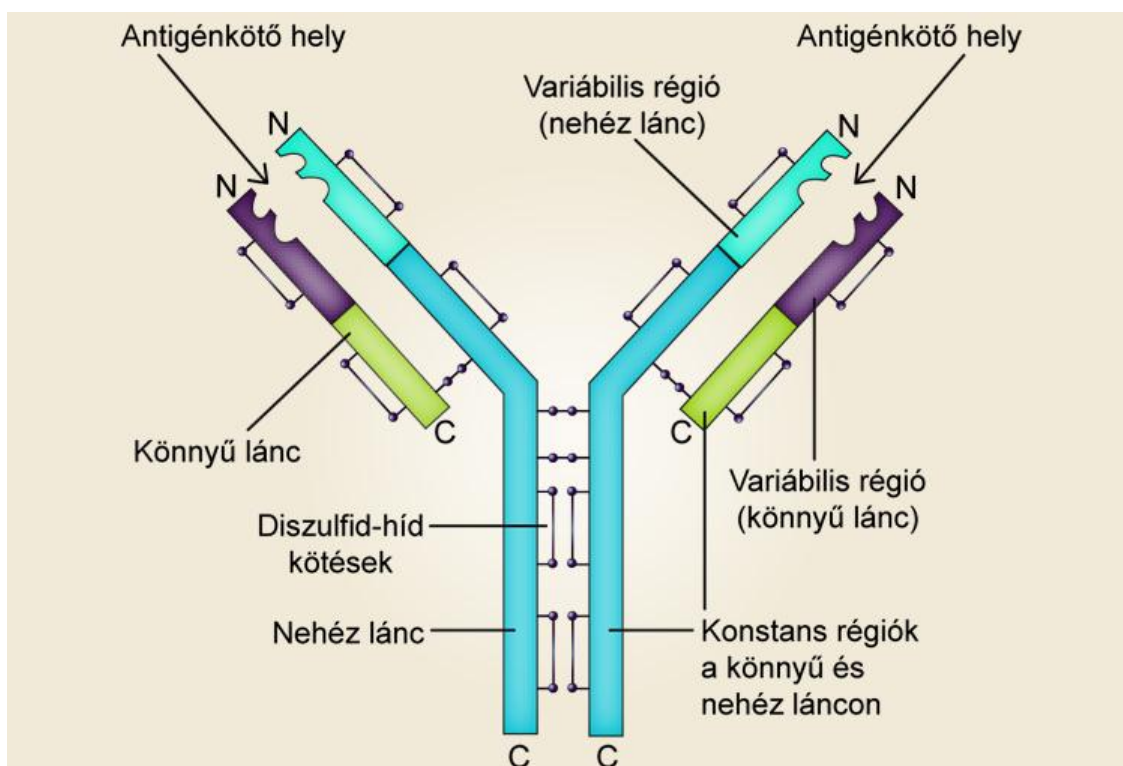
(b) Kovalens keresztkötés esetén a felületre egy keresztkötőt rögzítünk, melyhez kovalens kötéssel kapcsolódik a minta. A kovalens kötést érdemes a biomolekula valamelyik kémiai csoportján keresztül kialakítani, úgy, hogy az ne befolyásolhassa a molekula funkcionalitását.

Leggyakrabban amino-, karboxil-, vagy tiolcsoportokat használhatunk ehhez. Nukleinsavak immobilizálásánál ki lehet használni azok változatosságát is. Külön problémát jelent, ha esetleg valamilyen immunanyagot kívánunk rögzíteni, mert ezeknek az orientálását meg kell oldani [23,37].

(c) Nem-kovalens kötésnél egy már a felülethez kötött aktív réteghez történik a minta kapcsolása, például valamilyen nem specifikus elektrosztatikus kölcsönhatás által [37].

(d) egy polimer rétegbe történő fizikai csapdázás (molekula imprinting) során a célmolekulához egy rá specifikus anyagot (antitest, aptamer) rögzítünk, majd ezeket együttesen egy polimer rétegbe ágyazzuk. Ezt követően eltávolítjuk a célmolekulát, de a polimerben ott marad az őt rögzítő „lyuk”, ahová mérés során a célmolekula bekötődhet [38].

Specifikus detektáláshoz, legyen az egy vírus, baktérium vagy valamilyen biológiai célmolekula, leggyakrabban antitesteket szokás alkalmazni (7. ábra). Az antitestek fő előnye a nagyfokú specifikusság, vagyis az, hogy csak és kizárólag a célmolekulát kötik meg. Emellett nagy mennyiségben termeltethető, és irányított evolúció segítségével rengeteg változata előállítható a kutatás céljainak megfelelően [14,39].



7. ábra Az immunglobulin G felépítése. Az Y két végén találhatóak a hipervariábilis régiók, melyeknek köszönhető a fehérje specifikus kötődése az egyes célmolekulákhoz [40].

Az antitestek mellett napjainkban egyre elterjedtebb az aptamerek alkalmazása, melyek nukleinsav-felismerő elemek. Mivel a nukleinsavaknak is lehet harmadlagos szerkezete, ezért rendkívül sok formát felvehetnek, és kialakíthatóak olyan formációk, melyekhez specifikusan kötődnek különböző anyagok, akár atomok is. Mivel *in vitro*, azaz Petri-csészében is előállíthatóak, olcsó és gyors módon lehet őket kialakítani, nagyon stabilak és szélesebb körben alkalmazhatóak, mint az antitestek [41].

3. Célkitűzés

PhD tanulmányaim során egy újszerű, jelölésmentes, nagy érzékenységgű optikai bioszenzor kifejlesztése volt a cél, mely széles körben alkalmazható. A GCI (Grating Coupled Interferometry, rács csatolt interferométer) egy interferometrián alapuló bioszenzor. Céлом volt egy stabil, rutinszerűen alkalmazható rendszer kialakítása, mely előre mutat a piaci forgalmazás, és a miniatürizálható, kézben hordozható alkalmazások felé, valamint a sokcsatornás mérések irányába is. Prioritást élvezett, hogy egy olyan műszert alakítsak ki, amellyel rutinszerűen lehet a modern biológia érdeklődési területét érintő vizsgálatokat elvégezni. Fontos szempont volt a mintakezelés biztonságos megoldása is.

Egy modern optikai bioszenzornál elvárás a felhasználni kívánt minta mennyiségének csökkentése, ezért feladatomban éreztem egy olyan mikrofluidikai csatornarendszer kialakítását is, mely lehetővé teszi akár 1-2 μL térfogatú anyag megmérését is. Céлом volt, hogy ez a mikrofluidikai rendszer bárki által könnyen előállítható legyen, és egyszerűen lehessen optikai hullámvezető rendszerekkel integrálni. Elvárás volt, hogy a csatorna tervezése, kialakítása és felhasználása között minimális idő teljen el. Természetesen a biokompatibilitás és a költséghatékonyság is fontos szempont volt.

Nagy jelentőséget tulajdonítottam annak, hogy olyan fluidikai rendszert alakítsak ki, melynek alkalmazásával párhuzamos mikroszkópos mérések elvégzésére is lehetőség nyílik az optikai csip felületén. Ehhez egy átlátszó mikrofluidikai rendszerre volt szükség, amelyet baktériumok felületi adhéziónak vizsgálatára is fel kívántam használni.

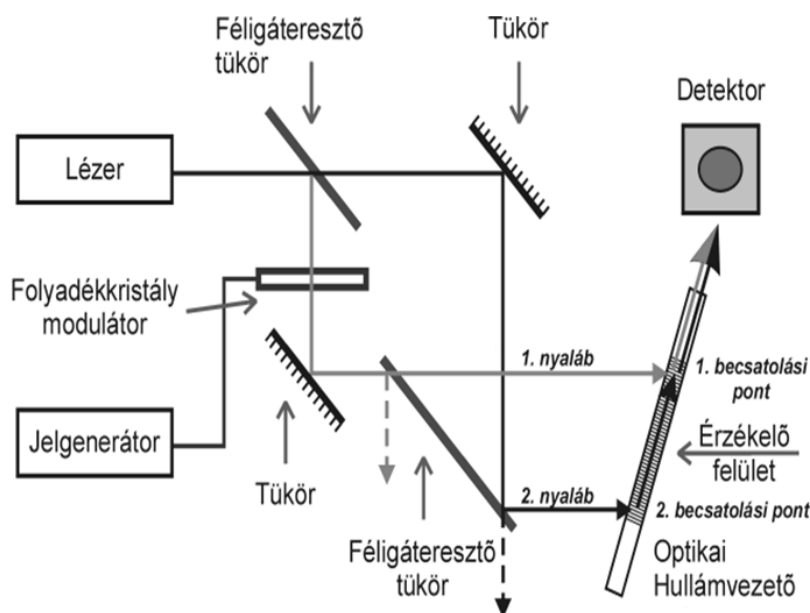
Céлом volt előre mutató, napjainkban időszerű biológiai méréseket is elvégezni a kialakított GCI szenzorról. Ezen okból tanulmányozni kívántam az extracelluláris vezikulák felületi adhézióját. A sejtek által termelt vezikulák viselkedésének és tulajdonságainak mélyebb megismerése fontos információkkal szolgál a modern orvostudomány és biológia számára. A mátrixfehérjékhez történő kötődésük pontos feltérképezése fontos információval szolgálhat a jövőbeni diagnosztikai alkalmazások szempontjából is.

4. Kutatási előzmények

Kutatásaimat 2010-ben kezdtem az MFA nanobioszenzorikai laboratóriumában. Témavezetőm, Horváth Róbert, korábbi munkakapcsolatára alapozva [42,43]. 2009-ben együttműködést alakított ki a Kaspar Cottier által vezetett Creoptix AG céggel. Kaspar Cottier 2007-ben nyújtotta be a mérési elvvel kapcsolatos szabadalmat [44].

A munkám kezdetéig két publikáció jelent meg a témában, melyekben bemutatásra került az akkor alkalmazott Mach-Zehnder interferometrius elrendezés, sikerült igazolni a működési elvet, a publikálók közölték az interferencia jelet illesztő függvényt, valamint a műszer érzékenységét is demonstrálták a szerzők [45,46].

Mindazonáltal az alkalmazott konfigurációnak voltak hátrányai is (8. ábra). A műszer beállítása nehézkes és időigényes volt, a hőmérsékletszabályozás nem volt megoldva. A hullámvezetőn nem volt referencia, valamint az interferométer ágai térben távol haladtak egymástól. Az optikai csipen egyetlen folytonos rács volt, ami azt eredményezte, hogy a törésmutató-változás következtében megváltozott a becsatolási szög, ezért azt kézzel kellett korrigálni. Mindezek miatt nem volt alkalmas a műszer rutinmérések elvégzésére.



8. ábra. Az első GCI, mely egy klasszikus Mach-Zehnder interferométer elrendezés szerint valósult meg [46].

5. Műszeres fejlesztések, egysugaras interferencia

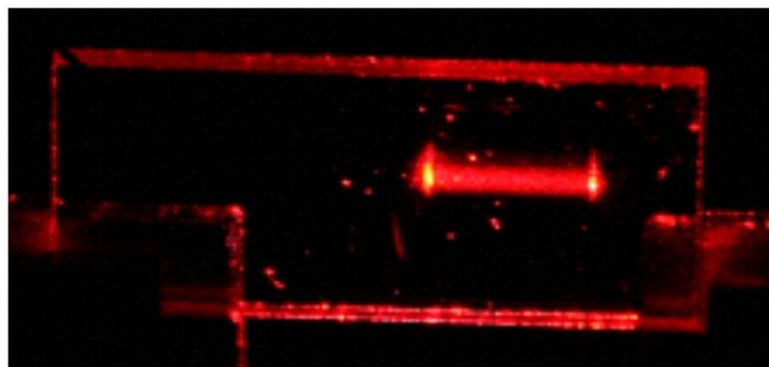
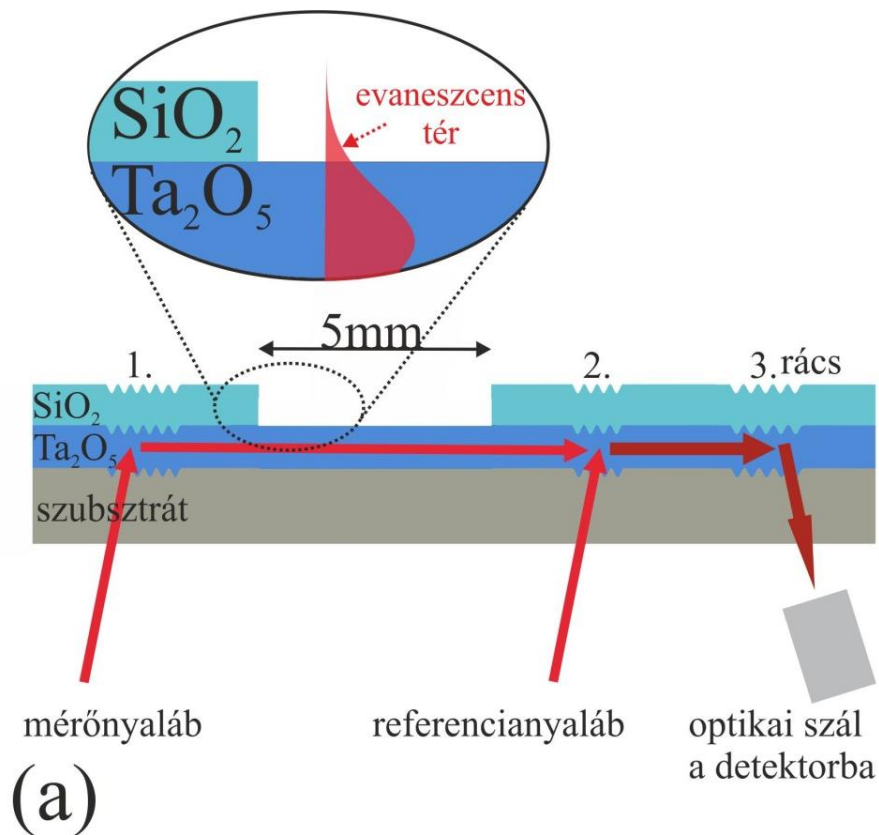
A GCI működésének alapelve, hogy egy optikai rács segítségével egy nagy törésmutatójú, vékony hullámvezető rétegbe csatoljuk a fényt. A fény teljes visszaverődések sorozatát szenved el, mely során rezonáns erősítés lép fel. Az így kialakuló módus a hullámvezető felületén egy ún. evaneszcens teret hoz létre, melynek intenzitása exponenciálisan lecseng a hullámvezető felületétől távolodva. A GCI módszer kimagaslóan érzékeny az evaneszcens térben történő törésmutató-változásokra.

5.1. Újfajta geometriájú szenzor csip és működési alapelvei

A kialakított hullámvezető keresztmetszeti ábrája (Optics Balzers, Liechtenstein) a 9. ábrán látható. A hullámvezető vékonyréteg nagyjából 1 mm vastag üveg hordozón (szubsztrát) helyezkedik el, melynek törésmutatója $n_S=1,52$ (633 nm-nél). A GCI szenzor csip kialakításához első lépésben 3 optikai rácsot kell marni a szubsztrátba, melyek periodicitása kb. 300 nm. Ezt követi a második szakasz, amely során a szubsztrátra egy nagy törésmutatójú ($n_F=2,12$), kompakt Ta_2O_5 filmet visznek fel $d_F=130-155$ nm vastagságban [1]. Az első és a második rács feladata a fény becsatolása a hullámvezető rétegbe, a harmadik rács a két becsatolt nyaláb interferenciájával létrejövő jelet csatolja ki a rétegből. A kicsatolt fényt egy optikai szál vezet a detektorba (8.(a) ábra). A második rács úgy viselkedik, mint egy miniatűr nyalábegyesítő, és keskenyebb, mint az első rács, hogy a már a hullámvezetőben terjedő módus nagy része keresztülhaladjon rajta. A munkámban bemutatott elrendezésnél a minta csak az első két rács közötti részen találkozik a terjedő fény módussal. A hullámvezető felület a két becsatoló rács közötti 5 mm hosszú szakasz kivételével, egy viszonylag vastag SiO_2 réteggel van bevonva (9.(a) ábra) [1]. A SiO_2 réteg vastagsága úgy lett megválasztva, hogy nagyobb legyen, mint a terjedő módus behatolási mélysége. Ennek köszönhetően a becsatolási és kicsatolási szögek nem változnak a törésmutató-változás hatására, és az a terület, ahol a módus a mintával érintkezhet, teljes mértékben kontrollált, precízen ellenőrzött. Az első rács által becsatolt fény, a SiO_2 -dal nem takart felület fölött bekövetkező törésmutató-változás hatására fázisváltozást szenved a második rács által becsatolt (referencia ág) fényhez képest. Az interferométer két nyalábja (a mérő- és a referencianyaláb) a hullámvezetőben egyesülnek a második rács után, és interferenciát hoznak létre (9.(a) ábra). Az így létrejövő intenzitás jelet egy a harmadik, a kicsatoló rács alatt elhelyezkedő optikai szál segítségével lehet a fotodetektorba vezetni.

A szenzor csipről készült fotó (9.(b) ábra) jól mutatja a kiváló hullámvezető képességét a kialakított elrendezésnek. Jól látható hogy a második rácson becsatolt módus szinte nem is veszt az

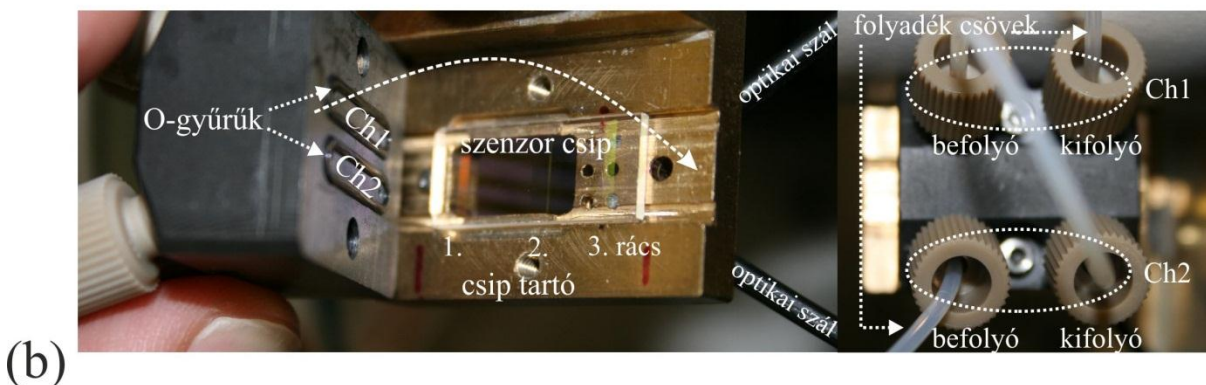
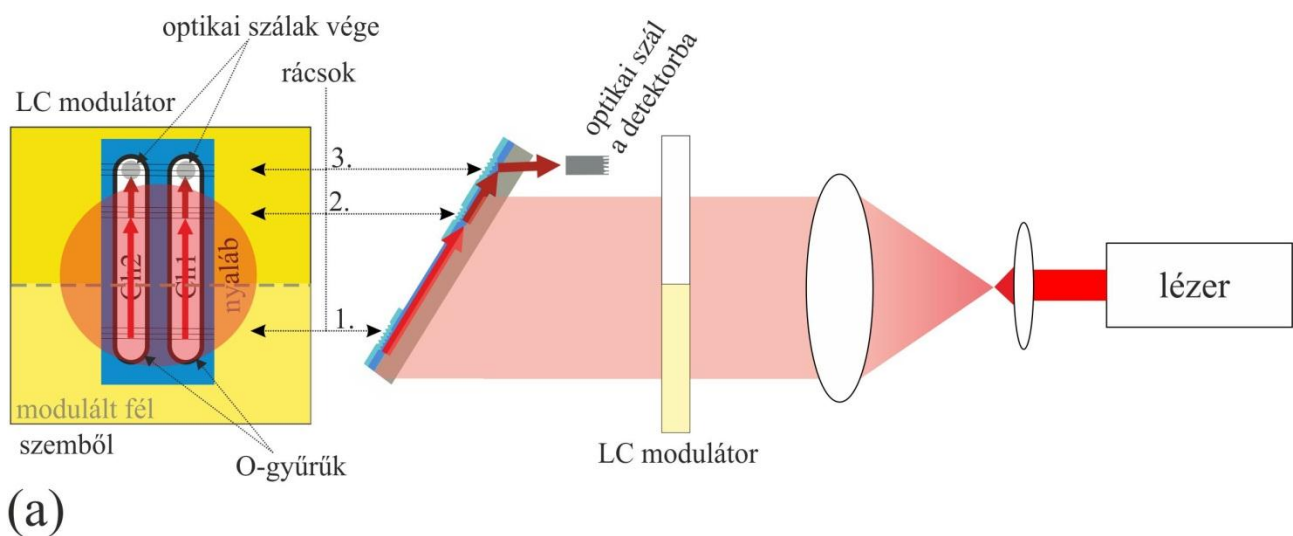
intenzitásából a kicsatoló rácsig. Ez egy jelentős fejlődés a korábban alkalmazott hullámvezetőkhez képest [45,46], ahol a módus 3-4 mm után elhalt a rosszabb optikai minőség és az alkalmazott egyrácsos geometria miatt [45,46].



9. ábra. (a) Keresztmetszeti ábra a szenzor csipről. Az első rácson csatolódik be a mérőfény, a másodikon a referencia. A harmadik rácson csatolódik ki az interferencia jel. (b) Fotó a hullámvezetőben terjedő módusról [1].

5.2. Egynyalábos interferencia

A fent bemutatott hullámvezető a módus gerjesztés és további mérések céljából a 9. ábrán látható optikai elrendezésben volt. Ebben egy 0,8 mm széles He-Ne lézer nyaláb (633 nm, 5 mW, Lasos Lasertechnik GmbH) van kitágítva egy nyalábtágító (30x-os mikroszkóp objektív és egy kollimátor lencse) segítségével 1,5 cm szélesre (10.(a) ábra). Az így kapott nyaláb egy osztott folyadékkristályos modulátoron (LCM, Liquid Crystal Modulator) keresztül világítja meg a GCI csipet. A kitágított nyaláb elég széles, hogy egyszerre világítsa meg a becsatoló rácsokat [1]. A becsatolási feltételek teljesítése érdekében a csiptartó (10.(b) ábra) enyhén megdöntve tartja a hullámvezetőt [33].



10. ábra. (a) A GCI elrendezésének sematikus rajza. (b) Fotó a küvettáról és a behelyezett szenzor csipről, jól látható a rácso elhelyezkedése és a folyadékcsatornák. Balra a felcsavarozott küvettát láthatjuk [1].

A fenti elrendezés számos előnyös tulajdonsággal rendelkezik a hagyományos kétsugaras interferométerekkel szemben. Először is, a két rácso megvilágítását célzó két külön nyaláb

párhuzamosítását jelentő probléma megoldott (a rácsokat megvilágító két nyalábot a hagyományos elrendezésekben precízen párhuzamosítani kell). Az új elrendezésnél az alsó illetve a felső része a kitágított nyalábnak (melyek az 1. és 2. rácsokat világítják meg) az interferométer két karjaként értelmezhetőek (10.(a) ábra). Ily módon a „nyalábok” teljesen párhuzamosan világítják meg a szenzor csipet, különösen egyszerűvé téve az ideális beállítást. Másodszor, a kialakított interferometrikus elrendezés szimmetrikus. A megvilágító lézerefény az interferométer karjain keresztülhalad a folyadékkristály modulátoron és körülbelül azonos távolságot tesz meg a térben. Egy kis különbség a hullámvezető enyhe ferde helyzetéből következik, de ez szükséges ahhoz, hogy a megfelelő becsatolási feltétel teljesüljön (10.(a) ábra). Mindezeknek köszönhetően a hőmérsékleti fluktuációk és vibrációk, a mindkét „nyalábban” jelentkező zavaró hatások jól kompenzálják egymást. Sőt, az osztott LCM modulátornak köszönhetően a kitágított nyaláb alsó és felső fele különállóan modulálhatóak. Az általam használt szenzor összeállításnál a nyaláb alsó fele volt modulálva, mely az 1. rácson csatolódik be (10.(a) ábra) [1].

Fontos megjegyezni, hogy a kitágított nyaláb azon részei, melyek nem a rácsokra esnek, nem tudnak a hullámvezetőbe becsatolódni és ott terjedni, így a hullámvezetőben kialakuló interferenciát nem zavarják. Egyedül intenzitás-csökkenés lép fel emiatt, de ez megfelelően intenzív megvilágítással kompenzálható.

A munka során az intenzitásvesztés minimalizálása, valamint az erősebb interferencia jel érdekében optimalizáltam a kitágított Gauss-nyaláb átmérőjét és a hullámvezető csip nyalábtágítótól való távolságát.

5.3. Kétcsatornás elrendezés és kétcsatornás átfolyó küvetta kifejlesztése párhuzamos mérésekhez

A kialakított egysugaras interferometrikus elrendezésnek van még egy jelentős előnye: párhuzamos mérőcsatornák integrálása rendkívül egyszerű. A kitágított nyalábnak köszönhetően egyszerre világítjuk meg a szenzor felületet teljes szélességében, így lehetővé válik egy referencia folyadékcsatorna alkalmazására is (10. ábra), ezáltal jelentősen javítható a műszer érzékenysége. Lehetőség van párhuzamos kísérletek végzésére is [6]. Ezt egy mechanikailag és kémiaileg ellenálló PEEK (poliéter-éter-ke-ton) anyagból készült küvetta-val demonstráltam, melynek két párhuzamos, O-gyűrűvel határolt folyadékcsatornája volt. A küvetta a szenzor csip felületére került, és csavarok segítségével egy réz küvetta tartóhoz rögzítettem. Az összeállítás módja jól látható a 10.(b) ábrán. Az O-gyűrűk nemcsak a fluidikai csatornát határozzák meg, hanem behatárolják azt a területet is, ahol a terjedő módus haladhat, mert a jel gyorsan elhal a gumigyűrű alatt. A két csatorna jele

egyszerűen a fotodetektorokba vezethető 1-1 optikai szál segítségével, melyeket a kicsatoló rács alá kell helyezni. Az optikai szálak a csiptartóban rögzítve vannak.

Nagy jelentőséggel bír a bevezetésre került Peltier-elem alapú hőmérsékletstabilizáló rendszer is, amelynek segítségével minimalizálni lehet a hőmérséklet változásából eredő zajokat, valamint az alkalmazásnak megfelelő hőmérsékletre lehet beállítani a rendszert (ez főleg biológiai objektumoknál fontos).

5.4. Fázismodulálás a nagyobb érzékenységért és belső referencia alkalmazása

Annak érdekében, hogy minél pontosabban ki lehessen értékelni az interferencia jelet, a mérőnyaláb fázisát az LCM modulátor alsó része modulálja, melyet periodikus négyszög feszültség vezérel (11. ábra).

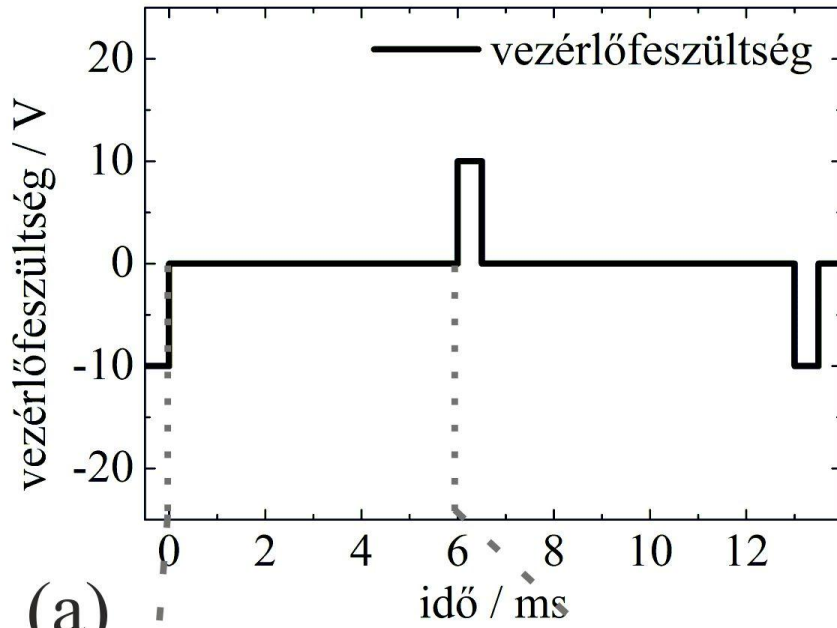
Egy relaxációs szakasz alatt felvett interferencia jel jól illeszthető a következő analitikus egyenlettel, ha $t_{rel} < \tau$ (11. (b) ábra):

$$I(t_{rel}) = I_0 + A \cos \left[\varphi_{LCM} e^{-2t_{rel}/\tau} - \varphi_{LCM} - \phi(t) \right], \quad (4)$$

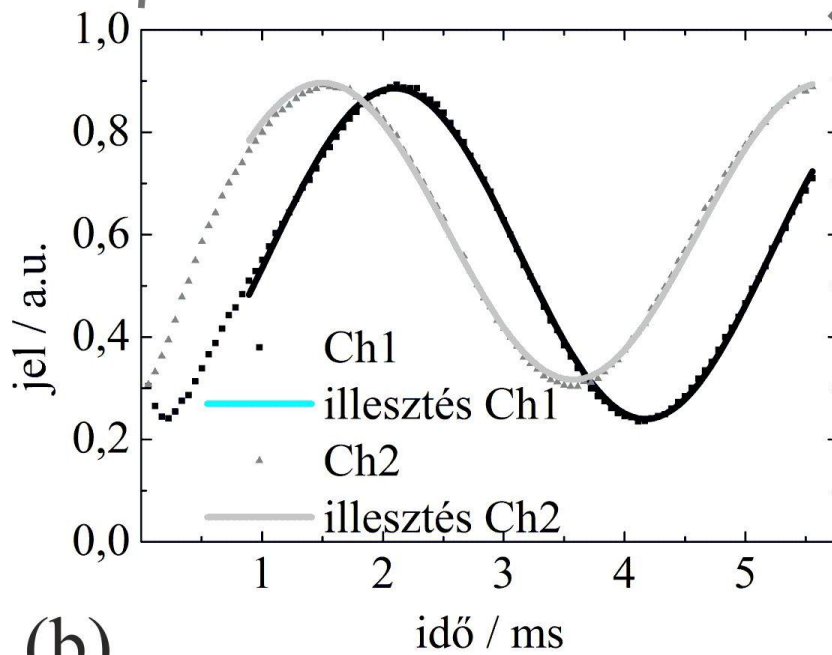
ahol A a jel amplitúdója, I_0 az offset interferencia jel, φ_{LCM} a teljes fázistolás a modulátoron, τ a modulátor relaxációjának időállandója, $\phi(t)$ a fáziskülönbség a mérő- és referenciaág között t időpillanatban és t_{rel} az időváltozás a relaxációs szakasz alatt [1,45].

Az első kísérletekben mindkét folyadékcsatornát (Ch1 és Ch2) nagytisztaságú vízzel töltöttem fel. A 11.(b) ábra mutatja a két csatornában mért interferencia jeleket. A jelek folyamatos rögzítésével, valamint az (1) egyenlet felhasználásával a minta okozta relatív fázisváltozás kiszámítható és valós időben ábrázolható. (A 12-es ábrán látható, hogy az LCM relaxációja során hogyan változik a modulált nyaláb fázisa.) Amennyiben az egyik csatornát referenciaként használjuk, úgy az esetleges zajokat (hőmérsékleti, mechanikai) jól ki lehet szűrni, ezáltal a műszer érzékenységét jelentősen meg lehet növelni. A felvett fázis zaja ily módon a 10^{-4} - $3 \cdot 10^{-3}$ rad tartományba esett. A zaj mértéke jelentősen függött a hullámvezető típusától, valamint a választott polarizációtól.

Fontos megjegyezni, hogy a dolgozatomban bemutatott műszernek a maximális időfelbontó képessége 7 ms, ami relatív gyors folyamatok valós idejű követését is lehetővé teszi.

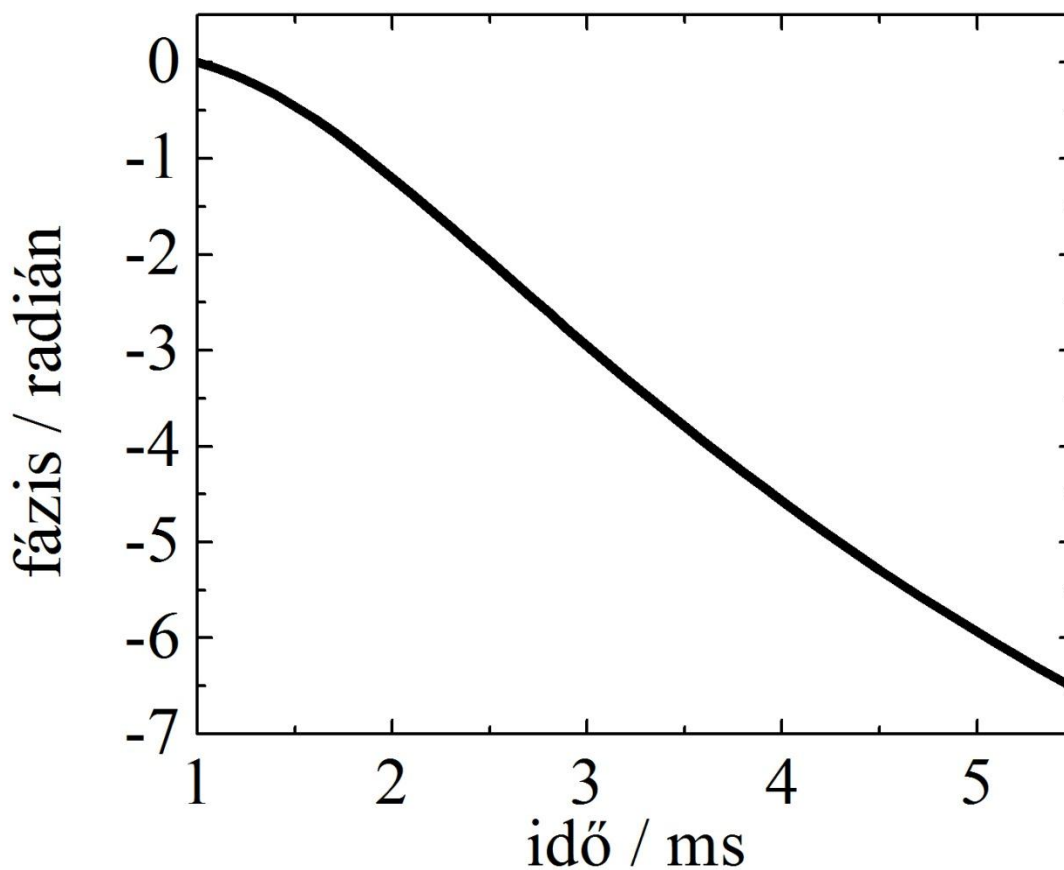


(a)



(b)

11. ábra (a) Folyadékkristály modulátort vezérlő feszültség. (b) A két csatornán mért interferencia jel az LCM egy tipikus relaxációs szakasza alatt. A (4) egyenlet alapján számolt illesztés szintén látszik a 10. ábrán, ezt a folytonos vonalak mutatják [1].

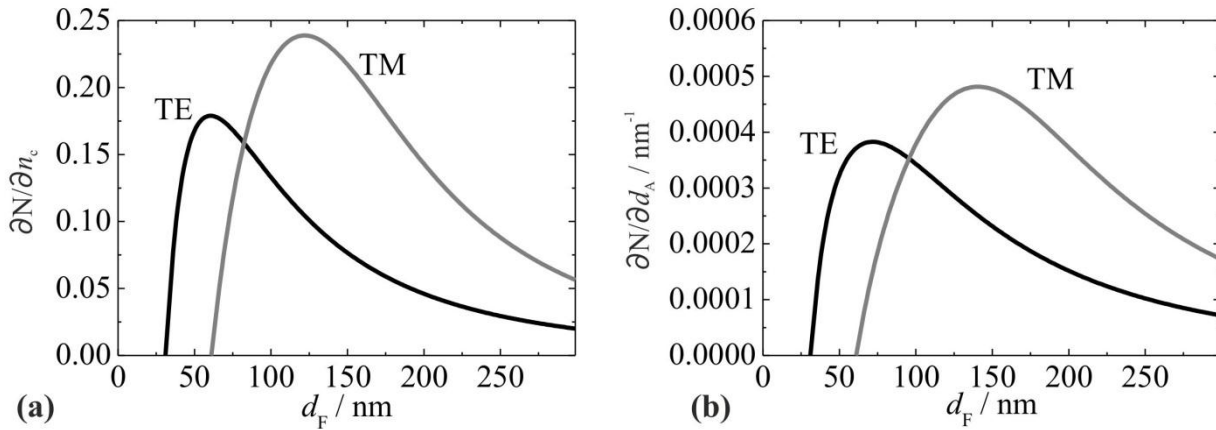


12. ábra Az LCM relaxációja során bekövetkező fázisváltozás.

5.5. Az alkalmazott hullámvezető módusok elméleti érzékenységei

Dolgozatom ezen részében az érzékelőcsip által elérhető maximális érzékenységet szeretném meghatározni. Tiefenthaler és Lukosz munkája alapján [33] a $\partial N / \partial n_c$ törésmutató-érzékenység és a $\partial N / \partial d_A$ kitapadt rétegvastagság-érzékenység (a kitapadt réteg törésmutatójának ismeretében) meghatározható a legalacsonyabb módus rendre, és a TE_0 valamint a TM_0 polarizációkra. N a vezetett módus effektív törésmutatója, n_c a hullámvezetőt borító folyadék törésmutatója, d_A a felületre kitapadt réteg vastagsága. A számolásokban a következő értékek lettek felhasználva: $n_F = 2,12$ a hullámvezető, a $n_s = 1,52$ szubsztrát, $n_c = 1,33$ felületre kerülő minta valamint a $n_A = 1,45$ (fehérjékre jellemző tipikus adat) felületre vékony rétegben kitapadt minta törésmutatója [34].

A felhasznált hullámvezető Ta_2O_5 film vastagsága 130-155 nm volt. A 13. ábra alapján egyértelműen látszik, hogy a TM_0 polarizációnak ennél a vastagságnál nagyobb az érzékenysége, mint a TE_0 -nak.



13. ábra A hullámvezető szenzor elméleti érzékenysége a hullámvezető réteg vastagságának függvényében. (a) Törésmutató-érzékenység. (b) Kitapadt rétegvastagság érzékenység.

A számolt érzékenységek alapján a minta által kiváltott fázisváltozás kiszámolható a következő egyenletek segítségével:

$$\Delta\phi = kL \frac{\partial N}{\partial n_c} \Delta n_c \quad \text{és} \quad \Delta\phi = kL \frac{\partial N}{\partial d_A} \Delta d_A, \quad (5, 6)$$

ahol k ($k=2\pi/\lambda$, $\lambda=633$ nm a mérőfény hullámhossza) a vákuum hullámvektor, L a mérőszakasz hossza (jelen esetben ez 5 mm) (a $\frac{\partial N}{\partial n_c}$ és $\frac{\partial N}{\partial d_A}$ érzékenységek levezetése megtalálható a függelékben) [1,33].

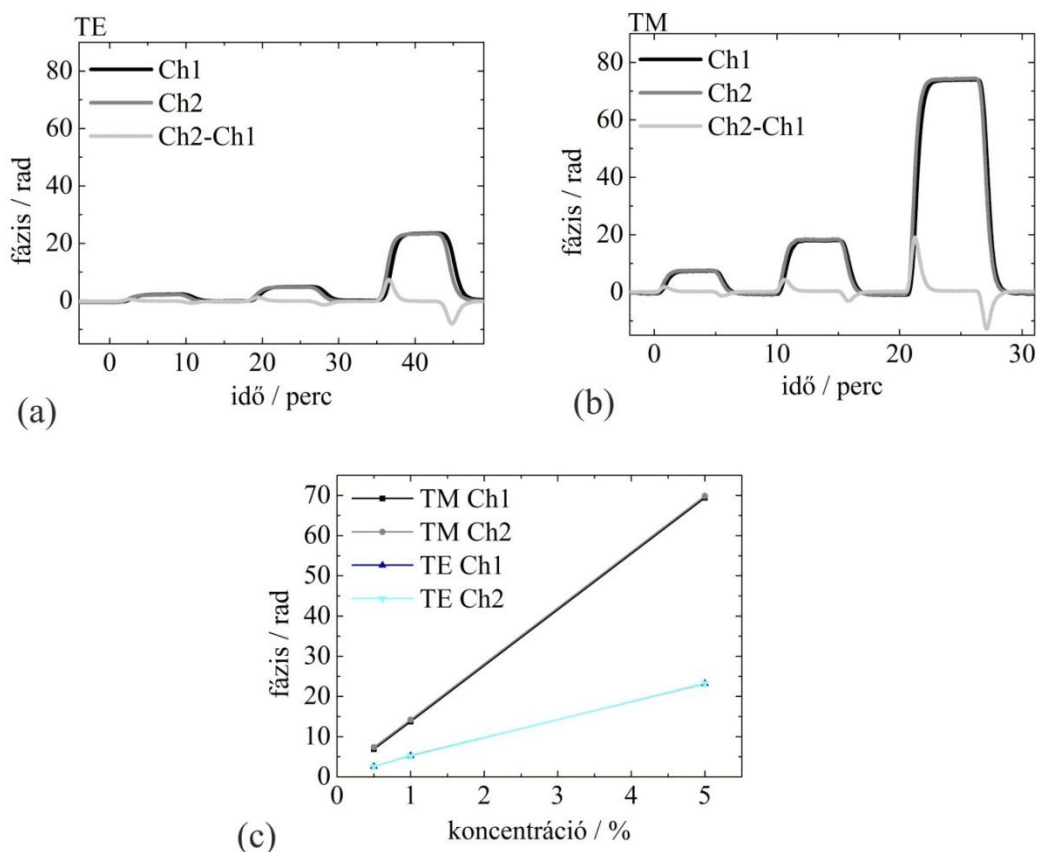
A maximális elméleti érzékenységgel, valamint a korábban említett legkisebb fáziszajjal számolva (10^{-4} rad) TM_0 módus esetén a (2) és (3) egyenletek segítségével meghatározható az a legkisebb törésmutató, illetve kitapadt rétegvastagság, ami a műszerrel még mérhető. Ez 10^{-8} törésmutatóegység-változásnak és 4×10^{-6} nm kitapadt rétegvastagság-változásnak adódott.

5.6. A szenzor linearitása és homogenitása

Egy optikai bioszenzor linearitása és az érzékelőcsip homogenitása rendkívül fontos követelmény. A GCI linearitását vizsgáló kísérlet során egy perisztaltikus pumpa (Ismatec Reglo, 12 görgős) hajtotta a folyadékot (a folyadék áramlási sebessége $v=1$ $\mu\text{l}/\text{sec}$) a küvettában. Mintaként 3 különböző koncentrációjú glicerindatot (0,5%, 1%, 5%, WVR International, nagy tisztaságú vízzel (MQ) hígítva) használtam. Az oldatok törésmutatóit egy Rudolf refraktométer segítségével

határoztam meg ($n_{\text{víz}}=1,33055$, $n_{0,5\%}=1,33115$, $n_{1\%}=1,33207$ és $n_{5\%}=1,33676$).

Azért, hogy teszteljem a GCI mérőrendszert, a következő kísérletet végeztem el mindkét polarizáció esetén. A már korábban említett PEEK küvetta csatornáit sorba kötöttem (10.(b) ábra), hogy ugyanaz a minta, ugyanazzal a sebességgel áramoljon mindkét csatornában. Az első lépésben egyenletes sebességgel nagy tisztaságú vizet áramoltattam a küvetta térbe. Ezt követte a glicerindatok áramoltatása, minden egyes koncentráció között vizes mosással (14. ábra). Jól látszik, hogy ugyanarra a törésmutató-változásra a TM polarizáció esetén a fázisváltozás háromszor nagyobb, mint TE polarizáció esetén. Az oldatok közti törésmutató különbségből, valamint a fázisváltozásból a (2) egyenlet segítségével meghatározható a szenzor érzékenysége ($\partial N / \partial n_c$), mely 0,2346-nak és 0,074-nek adódott TM illetve TE polarizáció esetén. Ezek az értékek egybevágóak az elméleti számítások során kapott eredményekkel (13. ábra) [1].



14. ábra. A két csatornában mért glicerindat okozta fázisváltozások TE polarizáció (a) és TM polarizáció(b) esetén. Mivel a csatornák sorba voltak kötve, ezért a folyadék először a Ch2-s, majd némi késéssel a Ch1-s csatornát érte el. Ez okozza a különbségjeleknél a csúcsokat. (c) A szenzor linearitása mindkét polarizáció esetén jól látható [1].

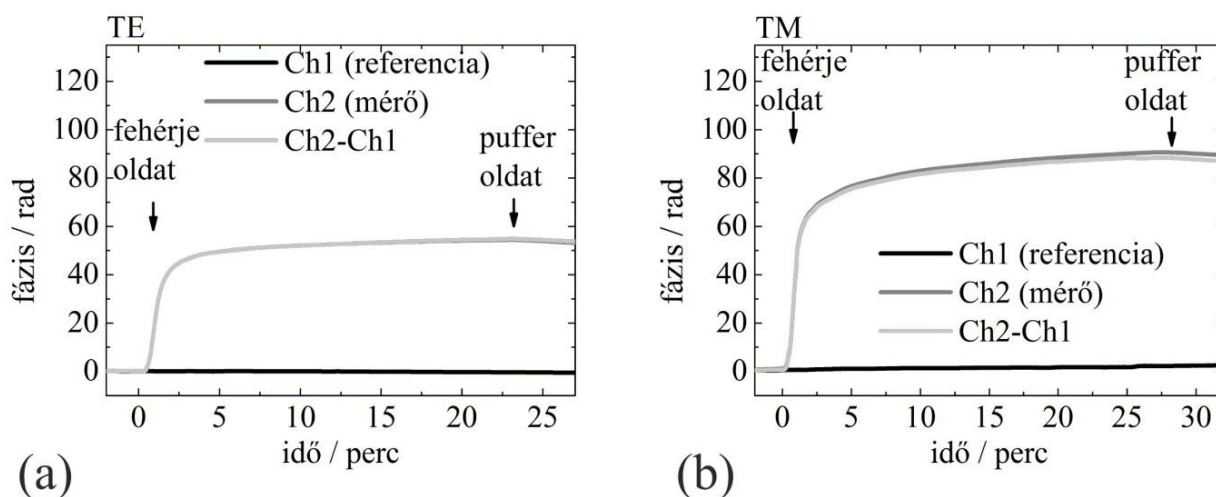
A szenzor linearitása és a különböző törésmutatókra adott válasza jól látható a 13.(c) ábrán, ahol a TE és TM polarizációk esetén mért fázisváltozást ábrázoltam a glicerinoldatok koncentrációjának függvényében. A 14.(a) és 14.(b) ábrát összehasonlítva tisztán látható, hogy a TM módus érzékenyebb, mint a TE. A 12. ábrán az is nyomon követhető, hogy a két csatorna (Ch1 és Ch2) által mért értékek között nincs jelentős eltérés. Ez mutatja a hullámvezető érzékelőcsip kiváló minőségét és a hullámvezető film laterális homogenitását [1].

Jelezni szeretném, hogy a referencia csatorna alkalmazásának köszönhetően sikerült jelentősen csökkenteni a korábbi elrendezésekben megfigyelt drift jelenséget is [45].

5.7. Fehérjeadszorpció vizsgálata a kifejlesztett GCI szenzorral

A fent említett előnyös tulajdonságok miatt a GCI kiválóan alkalmas biológiai minták vizsgálatára, legyen az nukleinsav, fehérje, vírus, baktérium vagy emlős sejt. Első lépésben egy fehérje (fibrinogén, Sigma-Aldrich) adszorpcióját mértem meg a szenzorral, mely során a műszer felületérzékenysége kísérletileg is meghatározásra került. Ebben a méréssorozatban a folyadékcsatornák párhuzamosan voltak kötve, így a Ch1 referenciaként működött. A fibrinogén foszfát pufferben (PBS pH=7,4; Sigma-Aldrich) lett feloldva 0,1 mg/ml-es koncentrációban. A törésmutatóit a felhasznált anyagoknak a már említett Rudolf refraktométerrel határoztam meg ($n_{\text{Fibr}}=1,33303$ és $n_{\text{PBS}}=1,33301$). A minta küvettába juttatását perisztaltikus pumpával oldottam meg ($v=1\mu\text{l}/\text{sec}$).

Első lépésben pufferoldatot áramoltattam a küvetta mindkét csatornájába, majd egy kis idő elteltével a Ch2-be vezető csövet áttettem a fibrinogént tartalmazó oldatba. A 15. ábra mutatja a mért fázisváltozást mindkét polarizáció esetén (15.(a) ábra a TE 15.(b) ábra a TM).



15. ábra Fehérjeadszorpciós kísérlet. A nyilak mutatják a fehérjeoldat és a fehérje nélküli pufferoldat küvetába történő injektálásának időpontjait. (a) TE polarizáció. (b) TM polarizáció [1].

A fibrinogénoldat törésmutatója 2×10^{-5} -nel nagyobb, mint a tiszta PBS-é. A korábbi érzékenységi adatok alapján ez a törésmutató-változás mindössze 0,1 rad-os fázisváltozást eredményezne. Ez az érték elhanyagolható a grafikonon (15. ábra) látható értékekhez képest. A telítődő jel annak köszönhető, hogy a fehérje kitapad a hullámvezető szenzor felületére. A mosás során beinjektált pufferoldat lemos egy kevés adszorbeálódott fehérjét, de a kitapadt fibrinogén nagy része irreverzibilisen kötődött a felülethez. Itt is megjegyzendő, és látható a 15.(a) és (b) ábrákat összevetve, hogy a TM polarizáció érzékenysége nagyobb, mint a TE módusé. Jelen esetben ez 1,8-szoros felületérzékenységet jelent, mely összhangban van a korábban leírt elméleti számolásokkal (13. ábra) [1].

A Feijter-formula segítségével meghatározhatjuk azt a legkisebb felületi tömegsűrűséget, amit a műszer még érzékelni képes:

$$\Gamma = \Delta d_A \frac{n_A - n_c}{\frac{dn}{dc}}, \quad (7)$$

ahol Δd_A a kitapad fehérje réteg vastagsága (kb. 6,8 nm fibrinogénre), n_A a kitapadt réteg törésmutatója (tipikusan 1,46 fehérjékre), dn/dc a fehérje törésmutatójának növekedése (tipikusan $0,18 \text{ cm}^3/\text{g}$) [1][34]. Az így meghatározott érzékenység jobb, mint $\Gamma=0,1 \text{ pg}/\text{mm}^2$.

5.8. Műszeres fejlesztés összefoglalása

Munkám során kialakítottam egy rendkívül nagy érzékenységű, jelölésmentes optikai hullámvezető elven működő egynyalábos interferometrikus elrendezést. Az alkalmazott hullámvezető csipen két becsatoló (melyeket egy kitágított nyalábbal egyszerre lehet megvilágítani) és egy kicsatoló rács található. Mivel megvilágító fényforrásként egyetlen kitágított nyalábot használtam, a műszer a kétnyalábos interferométerekhez képest jóval kevesebb beállítást igényel. A kitágított nyalábnak köszönhetően egy szimmetrikus interferométer elrendezést kaptam, ahol a külső zajok a szimmetria miatt jelentősen kiküszöbölhetők.

Az alkalmazott új hullámvezető minőségének köszönhetően jelentős mértékben sikerült növelni a GCI érzékenységét és működésének stabilitását. A rendszer stabilitását szolgálja az alkalmazott Peltier-elem alapú hőmérséklet-stabilizáló rendszer is. Egy osztott folyadékkristály modulátor segítségével a nyaláb egyik felén periodikus moduláció generálható, mely referenciaként szolgál, ezáltal tovább lehet növelni a rendszer érzékenységét. Összességében elmondható, hogy a műszer törésmutató-érzékenysége 10^{-7} - 10^{-8} nagyságrendbe esik, valamint a felületi tömegérzékenysége $0,1 \text{ pg/mm}^2$ alatti. Kísérletesen igazoltam, hogy a GCI szenzor két módusban is képes fehérje-adszorpció mérésére, valamint demonstráltam, hogy a TM polarizáció érzékenyebb a TE polarizációnál, ahogy az az elméleti számítások alapján várható. Megmutattam, hogy a fehérje (fibrinogén) mérése során kapott fázisugrás jóval nagyobb, mint ami a törésmutató különbség alapján várható, vagyis egy adszorpció folyamat játszódik le a szenzor felületén, mely során egy kompakt fehérje monoréteg jön létre [1].

6. Speciális, kétoldalú ragasztó alapú küvetta a mérések során felhasznált anyagmennyiség csökkentésére

Ebben a fejezetben egy költséghatékony, könnyen integrálható és gyorsan kialakítható folyadékcsatornát mutatok be, mely kétoldalú ragasztóból egy lézergravírozó segítségével készíthető el. A ragasztót védő fedőrétegek eltávolítása után a kivágott forma egyszerűen, szobahőmérsékleten integrálható jelölésmentes hullámvezető alapú optikai biocsipekkel, bármilyen későbbi módosítás, illetve processzálnási lépés nélkül. Megmutatom, hogy a jól definiált vastagságú csatornák ideálisak „stop-flow” mérések elvégzéséhez, valamint molekulakötődések vizsgálatához. Továbbá demonstrálom, hogy hogyan lehet a ragasztó segítségével könnyen és gyorsan kialakítani egy teljesen átlátszó mikrofluidikai rendszert, mely párhuzamos mikroszkópos méréseket is lehetővé tesz. Fontosnak tartom hangsúlyozni, hogy a kétoldalú ragasztó anyaga nem oldódik vizes közegben. Ezen előnyös tulajdonságok miatt ideális biológiai alkalmazásokhoz is. Igazolom, hogy a kétoldalú ragasztó segítségével reverzibilisen rögzíthető az optikai szenzor csip a műanyag és üveg hordozófelületekhez. A küvetta elkészítésének egyszerűsége, mely szobahőmérsékleten is megvalósítható, ideálissá teszi a bevezetett módszert „lab-on-a-chip” alkalmazásokhoz. Gazdaságossági szempontból is kedvező, hogy a ragasztó reverzibilis kötődésének köszönhetően a viszonylag költséges szenzor csipeket többször is fel lehet használni.

6.1. A mikrocsatornák jelentősége

Az utóbbi évtizedekben egyre nőtt az igény az olcsó, eldobható „lab-on-a-chip” és a beteg által otthon is használható diagnosztikai eszközök iránt [12,23,25,35,47]. Ezek az eszközök sok kutatási területen alkalmazhatók, a biotechnológiától kezdve az orvosi kutatásokon át az alap kutatásokig [48,49]. A kulcskérdés ezeknél a fejlesztéseknél olyan megoldások kialakítása, melyek olcsón, megbízhatóan képesek a vizsgált testfolyadékokat és a biológiai minták (pl.: fehérje, vírus, baktérium, élő sejt) vizes oldatait kezelni és a szenzor elemekhez eljuttatni. Hasonlóan fontos a minta mennyiségének a csökkentése is, mivel sokszor a minták kis mennyiségben állnak csak rendelkezésre. Ezek az igények hajtották a mikrotechnológiát olyan fejlesztések irányába, melyeknél speciális miniatürizált csatornákat alkalmaznak, melyek nagyon kis mennyiségű mintákat is képesek kezelni. Többnyire az alkalmazott csatornák szilíciumból, üvegből vagy műanyagból, nagy és költséges laborfelszereltséget igénylő maratások, sütések és kémiai lépések során készülnek el. Előállításuk és integrálásuk költséges. [50]. Jelentős előrelépést jelentett a PDMS-ből (poli-dimetil-sziloxán) kialakított mikrocsatornák megjelenése, melyek gyorsan előállíthatóak egy mester forma segítségével [50–52]. Sajnálatos módon a mester forma

kialakításához drága berendezésekre és tisztatérre van szükség. Sőt, a végső összeszereléshez plazma marás vagy sütés szükséges (különben nem tapadnak össze az egyes komponensek), ami megnehezíti a már korábban biológiai bevonatokkal (fehérjék, reagensek, immunanyagok) kezelt érzékelővel való integrálást. A csatornák esetleges módosítása és újratervezése időigényes lehet, mert új mesterforma készítését igényli.

Munkám során elkészítettem egy gyorsan kialakítható, olcsó és megbízható, kétoldalú ragasztó alapú, biokompatibilis mikrofluidikai csatornát, melynek a használhatóságát is demonstráltam. A felhasznált ragasztó többféle vastagságban is elérhető. Egy lézergravírozó segítségével vágtam ki a csatornákat. A kialakított csatorna könnyen és egyszerűen összeragasztható az általam használt sík hullámvezetőkkel (GCI csip, OWLS csip). Egy teljesen átlátszó küvetta és csatornarendszer kialakítását is megoldottam. A jól definiált vastagságú csatornákat „stop-flow” üzemmódban használtam. Rendkívül nagy előnye a módszernek, hogy gyorsan lehet tervezni, kialakítani és felhasználni a csatornákat. A kialakításhoz és az összeszereléshez semmilyen speciális eszköz és körülmény nem szükséges, nincs szükség bonyolult kémiai eljárásokra, tiszta térre stb., egy átlagos laboratóriumban elkészíthető és felhasználható [2].

6.2. A kétoldalú ragasztó típusai

A munkám során az ARCare® 8890 és 90445 (Adhesives Research Inc.) poliészter anyagú nyomásérzékeny kétoldalú ragasztókat használtam. A ragasztó anyaga orvosi tisztaságú MA-61 és As-110 akril. A ragasztó mindkét oldalát védőfólia borítja, melyet a felhasználás előtt könnyen el lehet távolítani. A teljes vastagság (a védőfóliák eltávolítása után) 50,8 μm és 81,28 μm volt. A hordozó és a rajtuk lévő ragasztóanyag is teljes mértékben biokompatibilis és oldhatatlan vizes közegben. A kísérletet követően MEK (metil-etil-keton, VWR International) oldószerrel távolítottam el a ragasztót az üveg vagy PEEK (poliéter-éter-keton) felületről [2].

6.3. Tervezés és kivágás

Első lépésben a kívánt mikrostruktúrát megrajzoltam Corel Draw-ban, majd a rajzot vektor módban vágtam ki a ragasztófóliából egy Epilog Mini 18 (25 W) CO₂ lézer gravírozóval. A lézer teljesítményét a kétoldalú ragasztó vastagságához optimalizálva 5 W-ra állítottam be. Erre azért volt szükség, hogy a lézer átvágja a ragasztót, de ne olvassza meg túlságosan, mert azzal veszítenénk a vágás ellenőrizhetőségéből. A vágás irányát és alakját teljes mértékben a rajz határozza meg, így egyszerűen módosítani lehet a formát és a vágási beállításokat [2].

6.4. Az alkalmazott hullámvezetők

A kétoldalú ragasztóból kialakított fluidikai csatornákat egy sík hullámvezető optikai csippel integráltam, jelen esetben a GCI-hez és egy optikai fénymódus spektroszkóp mérőeszközhöz (OWLS, optical lightmode spectroscopy) használt csipekkel. A GCI csip a Creoptix AG kollaborációs partnerünk terméke, dimenziói $8\text{ mm} \times 12\text{ mm} \times 1\text{ mm}$. A csipben található hullámvezető film egy 155 nm vastag Ta_2O_5 réteg, törésmutatója $n \approx 2,2$, mely egy üveghordozón található. A csipen két becsatoló és egy kicsatoló optikai rács található, hogy az interferencia jelet egy optikai szálba csatolhassa, mely azt a detektorba vezeti [1–3]. Az OWLS szenzor (OW2400, Microvacuum Ltd., Magyarország) egy $16\text{ mm} \times 48\text{ mm} \times 0,5\text{ mm}$ méretű csip, ahol az üveghordozón egy 176 nm vastag kb. $1,7\text{--}1,8$ törésmutatójú $\text{TiO}_2\text{--SiO}_2$ szol-gél réteg szolgál hullámvezetőként. A megvilágító lézertényt a csip közepén, a csip hossz tengelyére merőlegesen elhelyezkedő 1 mm széles optikai rács csatolja a hullámvezetőbe [21,53]. Ahhoz, hogy mérni tudjam a minta által okozott effektív törésmutató-változás által generált jelet, két műszert használtam: egy saját készítésű GCI berendezést [1] és egy BIOS OWLS rendszert (Microvacuum Ltd., Magyarország) [54]. Felhasználás előtt a csipeket minden esetben krómkénsavval az általánosan használt protokollok szerint tisztítottam [32,55], és tiszta nitrogén gázzal szárítottam meg.

6.5. A mikrocsatorna összeszerelése

Miután a ragasztót a szenzor csipre helyeztem, lefedésükhöz két különböző fedőegységet használtam. Az egyik anyaga megmunkált PEEK volt, a másiké pedig üveg (utóbbiról részletesebben a 6.9. fejezetben írok). A GCI-hez és az OWLS rendszerekhez különböző geometriájú fedőegységeket használtam. A PEEK alkatrészek $0,5\text{ mm}$ belső átmérőjű fúrt lyukakat tartalmaztak a bevezető és kivezető fluidikai csövek számára [2].

6.6. Folyadékkezelés

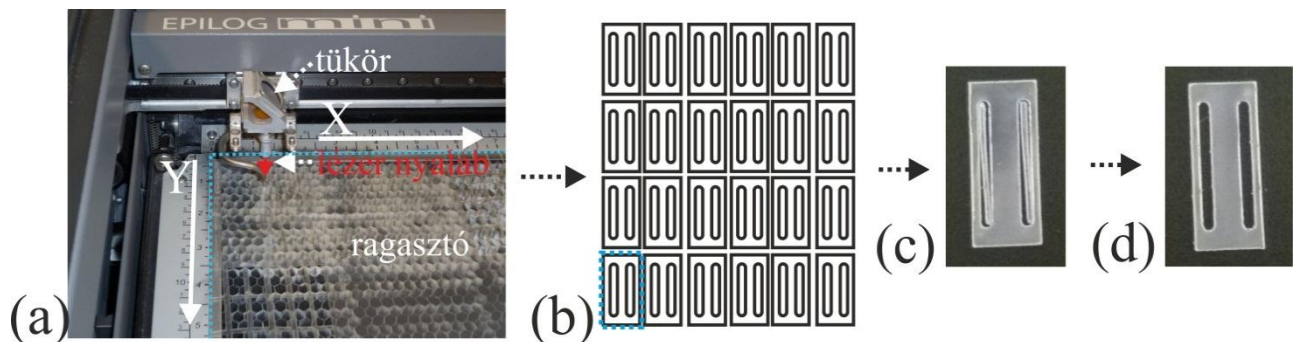
A kísérletek során minden esetben $0,5\text{ mm}$ belső átmérőjű teflon csöveket használtam a folyadék küvettatérbe juttatására. A küvetta a vizsgálni kívánt folyadékkal lett feltöltve egy Ismatec Reglo 12 görgős perisztaltikus pumpa segítségével. A teflon csövek merevségük miatt nem használhatóak perisztaltikus pumpákkal, ezért erre a célra egy $0,5\text{ mm}$ belső átmérőjű Tygon cső volt a pumpához kötve, melynek a másik vége lineárisan csatlakozott a teflon csövekhez (Omnifit csatlakozóval). Kis mennyiségű minták beinjektálására a „stop-flow” mérések során (melyeket az OWLS kísérletek során végeztem) egy szeptumos injektort illesztettem egy rövid teflon cső végére (mely a PEEK fedőegységhez csatlakozott), és ezen keresztül egy Hamilton fecskendővel jutattam a

vizsgálni kívánt mintát a küvettaérbe.

A mérések során 5%-os glicerindatot (MQ vízben oldva, $n_{MQ}=1,33676$) vagy 10 $\mu\text{g/ml}$ -es avidin (Sigma-Aldrich) oldatot PBS pufferben oldva (Sigma-Aldrich, $\text{pH}=7,4$) használtam.

6.7. Kétsatornás ragasztó alapú küvettarendszer kialakítása és összeszerelése a GCI szenzor csippel

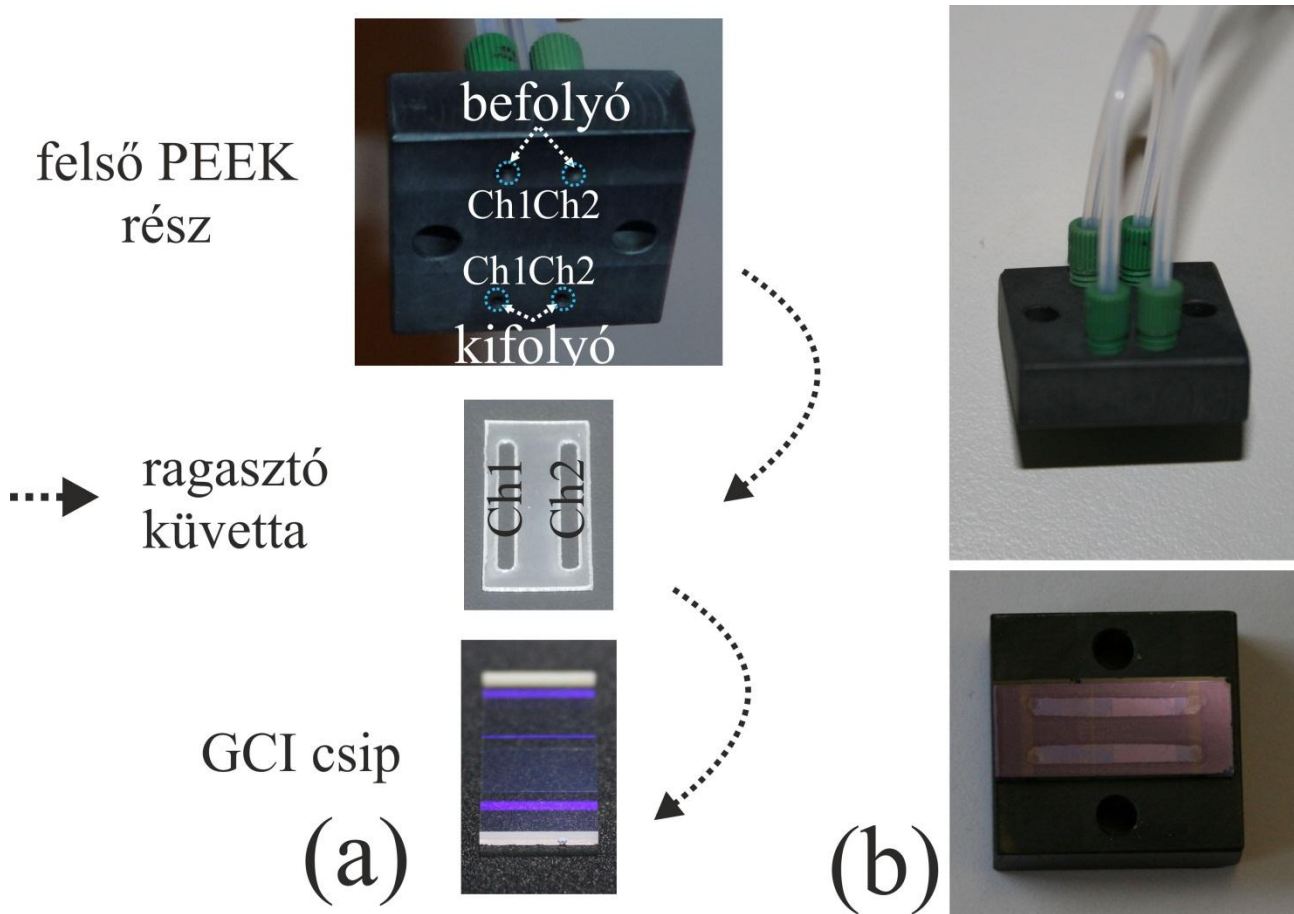
Az első kísérlet során egy kétsatornás mikroküvetta alakítottam ki a GCI szenzor csiphez. Első lépésben egy nagyjából 15×15 cm-es ragasztólapot (ARCare® 8890) helyeztem a vágókészülékbe. Ebben egy fókuszált CO_2 lézer nyaláb (fókusz távolság 2,54 cm, nyalábátmérő kb. 20-80 μm) vágta át a ragasztót a korábban Corel Draw-val elkészített rajz által meghatározott vonalak mentén. A lézerfolt pozícionálása egy motorizált tükör segítségével történt (16.(a) ábra) [2].



16. Ábra (a) Az Epilog Mini lézer gravírozó- és vágókészülék. A kétoldalú ragasztó a lézert irányító tükörhöz hasonlóan jól látszódik. A motorizált vezérlésnek köszönhetően a tükör x-z irányokban könnyen pozícionálható a ragasztó felett. (b) 24 db kivágandó csatorna (terv)rajza. (c,d) A kivágott csatorna forma a kivágott belső részekkel és nélkülük. [2]

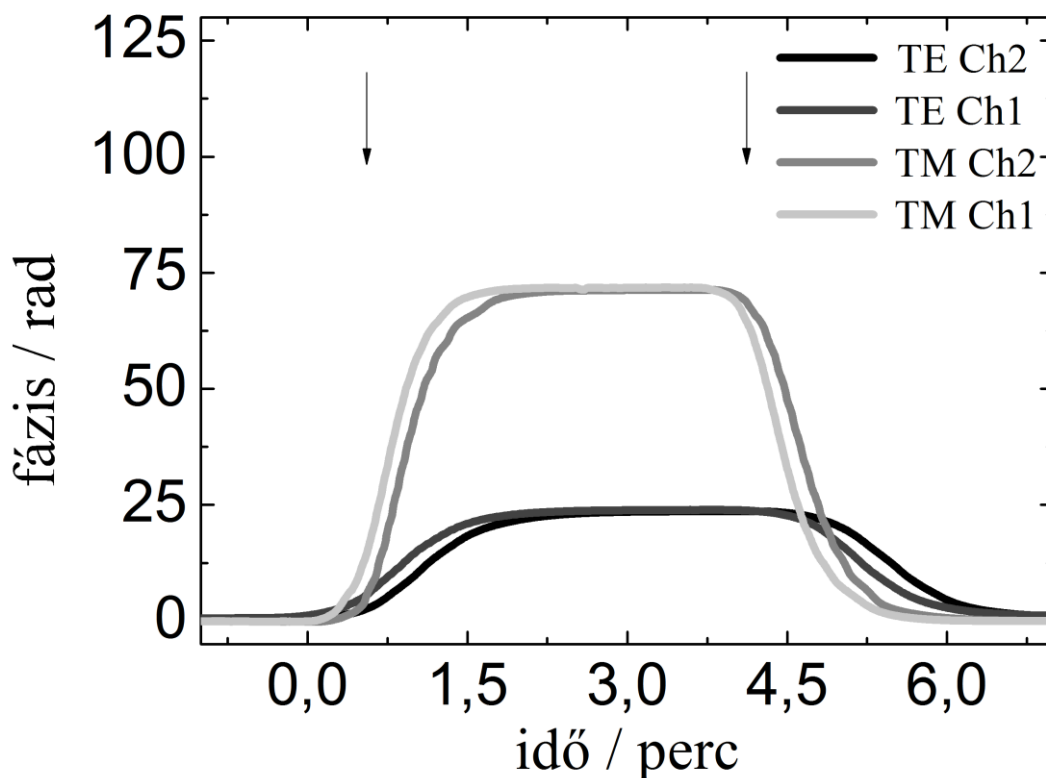
Az első munkafázisban a 24 db kétoldalú ragasztó alapú csatornaegység készült el (a csatornák elrendezése a 16.(b) ábrán látható.). A kivágást követően a csatornákat kivettem a gravírozóból és a rajtuk lévő védőfóliát eltávolítottam. Végezetül a csatornákat az optikai csipre helyeztem és egy műanyag takaró egységet alkalmaztam, kifolyó és befolyó nyílásokkal, hogy zárjam a csatornákat (16.(c-d) és 17. ábra). A végső rögzítés érdekében a teljes egységet kézzel össze kellett nyomni. Az összeragasztott küvettarendszer a 17.(b) ábrán látható. Fontosnak tartom hangsúlyozni, hogy a 16.(b) ábrán látható 24 db csatorna kivágása 2 perc alatt kivitelezhető, és a végső összeszerelés sem tart tovább 1 percnél. A legvékonyabb csatorna, ami ezzel a kivágási módszerrel az ARCare® 8890 ragasztóból kialakítható, kb. 120 μm széles. Ebből kifolyólag ez a

technika nem alkalmas nagy precizitást igénylő nanofluidikai megoldásokhoz, de egy rendkívül ár-érték arányos megoldás lehet sok alkalmazáshoz, többek között élő sejtek tanulmányozásához.



17. ábra (a) A GCI csip a kialakított kétoldalú ragasztóval, valamint a PEEK takaró egység az összeszerelés előtt. (b) Fotó az összeszerelt egységről. A kifolyó és befolyó csövek jól láthatóak. [2]

A fluidikával integrált szenzor csipet az összeragasztást követően helyeztem a GCI-be. A kialakított csatornák teszteléséhez a következő kísérletet végeztem el [2]: MQ vizet injektáltam mindkét csatornába, és a fázisjelet az idő függvényében rögzítettem (18. ábra). Az elvárásoknak megfelelően szivárgás nem volt tapasztalható. Stabil alapvonal rögzítését követően 5%-os glicerindatot juttattam mindkét csatornába egy perisztaltikus pumpa segítségével. Ennek következményeként egy folyamatosan növekvő jelet kaptam, mely rövid időn belül telítődött. Ezt követően ismételtén MQ vízzel töltöttem fel a csatornákat, melynek hatására a jel az alapvonalhoz tért vissza. A mintacserék idejére a pumpát rövid időre (maximum 3 másodpercre) leállítottam.

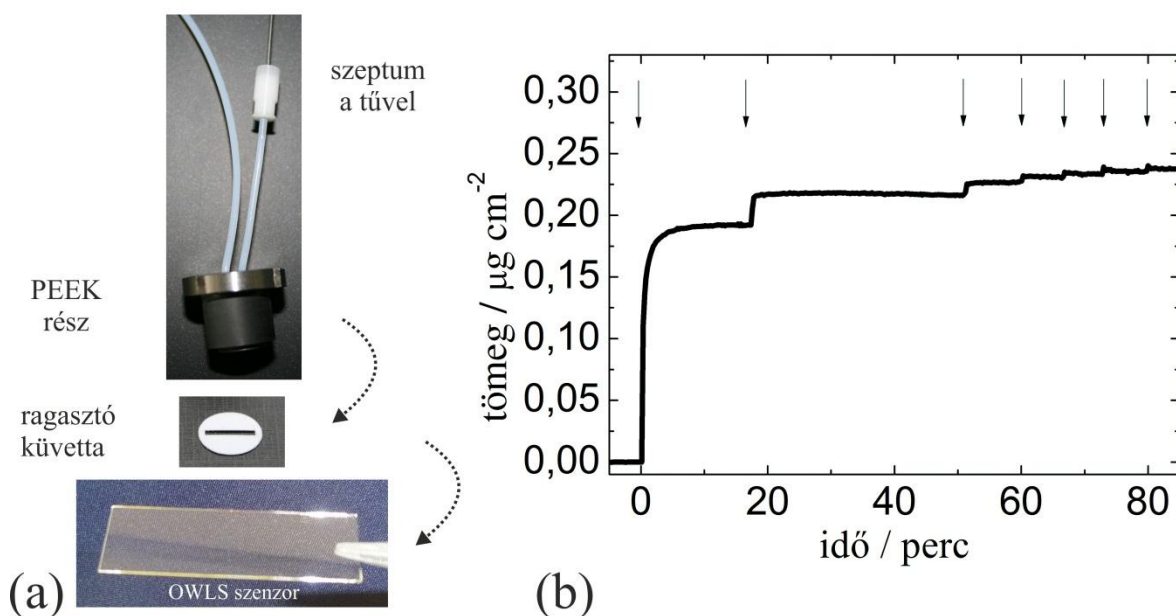


18. ábra Fázisváltozás 5%-s glicerindat, majd mosás hatására. A kísérlet mind TE, mind TM polarizációval el lett végezve. A TM módus nagyobb érzékenysége kísérletileg is igazolva lett [2].

A kísérletet mind TE, mind pedig TM módus alkalmazásával elvégeztem. A 18. ábra jól mutatja, hogy az elvárásoknak és a korábbi eredményeknek megfelelően a TM polarizációval kb. 3-szor nagyobb törésmutató-érzékenység érhető el, mint a TE-vel [1,2]. Fontosnak tartom hangsúlyozni, hogy a mért jelek mindkét csatornában azonosak voltak, amely jól mutatja a csip minőségét és homogenitását. Ennek köszönhetően az egyik csatornát referenciaként lehet használni. Szintén rendkívül lényeges, hogy nem figyelhető meg az átlagosnál nagyobb drift a rendszerben, a specifikációnak megfelelően nem tapasztalható anyagkioldódás a ragasztóból. A ragasztó könnyen eltávolítható MEK (metil-etil-keton) oldószer használatával. Ezt követően a csip és a PEEK egység a normál tisztítási eljárások szerint tisztítható, és újra felhasználható [2].

6.8. „Stop-flow” OWLS mérések egycsatornás kétoldalú ragasztó alapú küvettaival

A következő kísérletsorozatban egy egycsatornás, kétoldalú ragasztó alapú küvetta alakítottam ki OWLS csipekhez. A kísérletek során 90442 jelzésszámú ragasztót használtam. A csatorna egy kör alakú ragasztódarabkában, $9 \times 1,5$ mm méretben került kialakításra. (19.(a) ábra). A védőfóliák eltávolítása után a ragasztódarabot az OWLS csip közepére helyeztem. Ezután a PEEK takaróegységet ráhelyeztem a ragasztó másik felére, hogy befolyó és kifolyó lyukakkal szolgáljon a csatorna számára. A befolyó nyíláshoz egy szeptumos injektort szereltem, amin keresztül a minta a csipre juttatható. Az összeszerelt egységet egy BIOS-1 (Microvacuum Kft.) OWLS készülékbe helyeztem, és a kísérletek során a minták által okozott effektív törésmutató-változást mértem.



19. ábra (a) Az OWLS-hez készített küvetta és az összeszerelés rendje. (b) „Stop-flow” mérés a kialakított csatornával. A nyilak az injektálás időpontjait mutatják. A kísérlet során avidint injektáltam a csatornába egy Hamilton fecskendővel. A maximális felületi borítottság hét egymást követő injektálással érhető el [2].

Első lépésben PBS puffert injektáltam a küvettaiba, hogy rögzíthessem az alapvonalat. 5 perc elteltével $50 \mu\text{l}$ avidin oldatot injektáltam a rendszerbe egy Hamilton fecskendővel. Ez az OWLS jel növekedéséhez vezetett, amely nagyjából 10 perc után szaturálódott. A mért effektív törésmutatóból kiszámolható a felületre kitapadt fehérje mennyisége [21,48]. Az eredmények a 18.(b) ábrán

láthatóak. Az első injektálást követően a szaturáció $0,19 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ értéknél következett be. Ez a mennyiség összevethető a küvettában lévő összes fehérje mennyiségével, amiből kikövetkeztethető, hogy a dinamikus egyensúly akkor következik be, amikor a fehérjekoncentráció eléri a maximumát a felületen és a minimumát a küvetta térben. Ez az állítás egy második injektálással lett igazolva. Újabb adag $50 \mu\text{l}$ avidin oldatot injektáltam a küvetta, hogy visszaállítsam az ott található fehérje koncentrációját a kiindulási szintre, ekkor a jel tovább növekedett. Ezt az adszorpciós injektációs ciklust még 6 alkalommal ismételt meg. A hetedik injektálást követően a kitapadó fehérje mennyisége már nem növekedett szignifikáns mértékben. Ezek alapján elmondható, hogy a felület elérte a maximális fehérje borítottságot [2].

A fent bemutatott kísérleti típust, ahol az adszorpciós egyensúly az egymást követő meghatározott mennyiségű injektálásokat követően áll be, „stop-flow” mérésnek hívjuk [56]. Az általam elvégzett kísérletek jól mutatják a kétoldalú ragasztó alapú küvetta alkalmazhatóságát. Ez a rendszer bonyolultabb kémiai kölcsönhatások, illetve erősen limitált mennyiségű minták vizsgálatára egyaránt használható.

6.9. Átlátszó integrált mikrofluidikai rendszer baktériumok vizsgálatára

A korábbi kísérletekben bemutatott küvetta biokompatibilis elemekből került összeállítása, de (optikailag) nem átlátszó. A küvetta átlátszatlansága korlátozza a felhasználhatóságát, mert sok esetben hasznos, ha az érzékelőfelületet különböző optikai mikroszkópokkal is meg tudjuk figyelni. Ezért kialakítottam a GCI-hez egy teljesen átlátszó küvetta elrendezést, melyben a fedőegység üvegből készült (20.(a) ábra).

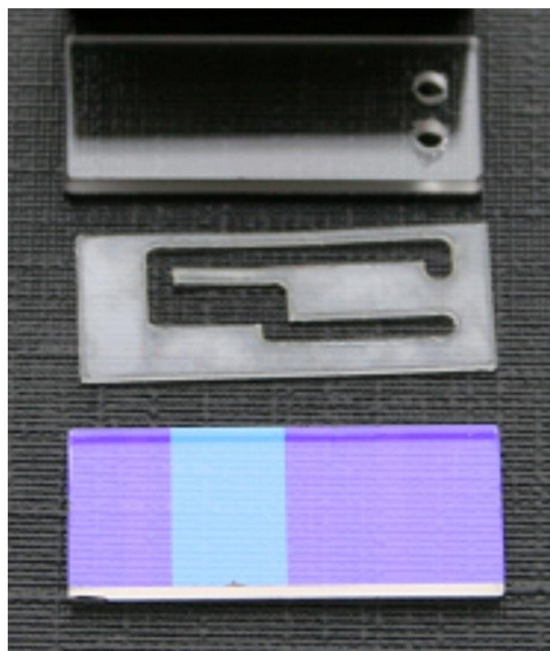
Ezeknél a kísérleteknél a fedőegység egy GCI csippel azonos méretű üveglemez volt. A lemezbe fúrt, két 1 mm -es belső átmérőjű lyuk szolgált ki- és bemeneti nyílásokként, ezeken keresztül csatlakozott a teflon csőrendszer a küvettához. Felhasználás előtt a fedőegységeket is minden alkalommal (plazmatisztítóval) megtisztítottam [2]. A tefloncsöveket hosszirányban megnyújtva elkeskenyítettem, majd bevezettem a fúrt lyukakba, amelyekbe így pontosan illeszkedtek, a túlnyúló részeket pedig egy éles penge segítségével távolítottam el. Az érzékelőcsippel összeszerelt küvettarendszer a 19.(b) ábrán látható. A folyadékcsatorna és az optikai rácscok jól láthatóak a GCI csipen.

A baktériumadhéziós kísérletekben *Salmonella typhimurium* (SJW2536) baktérium oldatát használtam. A baktérium sejtek PBS pufferben lettek felfuszpendálva. A felhasznált GCI csip felületét poli-L-lizin (PLL, Sigma-Aldrich) $0,1 \text{ mg}/\text{ml}$ koncentrációjú vizes oldatával vontam be.

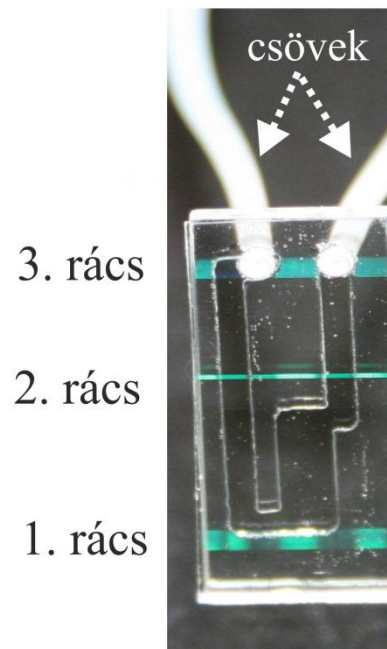
üveg
fedőrész

ragasztó
küvetta

GCI csip



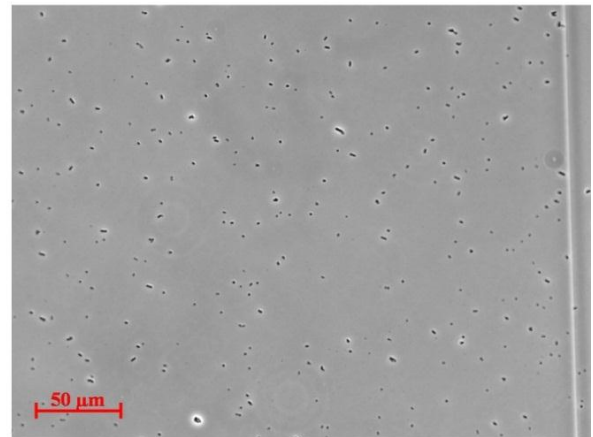
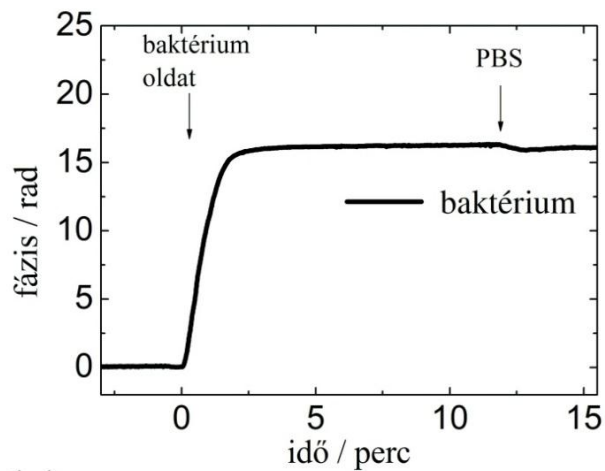
(a)



(b)

20. ábra (a) A teljesen átlátszó küvetta részei az összeszerelés sorrendjében (GCI csip, a kétoldalú ragasztó alapú küvetta, az üveg fedőegység a két kifúrt lyukkal). (b) Az összeszerelt átlátszó küvetta [2].

Az átlátszó küvetta rendszer használhatóságát GCI szenzorral végzett baktériumadhéziós kísérletekkel demonstráltam (17. ábra). Első lépésben a szenzor csipet PLL-lel vontam be, majd PBS áramoltatása során felvettem az alapvonalat. Az alapvonal rögzítését követően egy szeptumos injektoron keresztül Hamilton fecskendővel 50 μ l baktériumoldatot juttattam a küvetta bába. Az adszorbeálódó baktérium sejtek növekvő fázisjelet okoztak, mely körülbelül 3 perc után telítődött (21.(a) ábra). A telítődés után 50 μ l PBS-sel mostam le a reverzibilisen a felületre tapadt baktériumokat. Ezt követően a teljesen átlátszó egységet egy Zeiss Axio inverz kutatómikroszkóppal vizsgáltam. A felületre kitapadt *Salmonella* sejtek jól látszódtak a mikroszkóppal készített képeken (21.(b) ábra) [2].



(a)

(b)

21. ábra. (a) A baktériumadszorpció és -deszorpció által okozott fázisváltozás a GCI szenzoron. (b) Mikroszkópos kép a GCI csip felületéről a mérést követően. A kitapadt baktériumok jól láthatóak. A csipen található SiO₂ réteg határa is látszik a kép jobb oldalán [2].

Az itt bemutatott teljesen átlátszó küvetta további alkalmazásokat nyerhet a hullámvezetőkkel végzett mérések mellett, párhuzamos morfológiai vizsgálatok terén, úgy mint a különböző optikai mikroszkópok, Raman-, infravörös mikroszkópia és spektroszkópia.

6.10. Mikroküvetta fejlesztés összefoglalása

A fejezetben megmutattam, hogy biokompatibilis mikroküvetta-rendszer alakítható ki az ARCare® cég által gyártott kétoldalú ragasztóból egy egyszerű, olcsó, gyors, tisztateret nem igénylő módszerrel. A gyártáshoz nem szükségesek sem száraz, sem nedves marási technikák, normál laborkörülmények között elkészíthető a kívánt formájú küvetta. A tervezéstől a felhasználásig csak pár percre van szükség. Az általam felhasznált ragasztók kereskedelmi forgalomban kaphatók többféle vastagságban. A csatornastruktúrát egy lézer gravírozóval vágtam ki a ragasztóból. A kivágott csatornákat GCI, valamint OWLS szenzor csipekkel integráltam, és különböző oldatokkal teszteltem. A fehérjeadszorpciót „stop-flow” méréssel tanulmányoztam.

Bemutattam egy teljesen átlátszó elrendezést is, mellyel *Salmonella* adszorpcióját mértem PLL rétegen. Mivel a kialakítás során semmilyen bonyolult gyártási eljárásra nincs szükség, ezért a szenzor felületét könnyű előkezeltetni, biológiai bevonatokkal ellátni még az integrálás előtt. Az általam bemutatott kétoldalú ragasztó alapú átlátszó küvetta-rendszer igen széles területen található alkalmazásra alacsony ára, egyszerűsége és a műszerbe való könnyű integrálhatósága miatt [2].

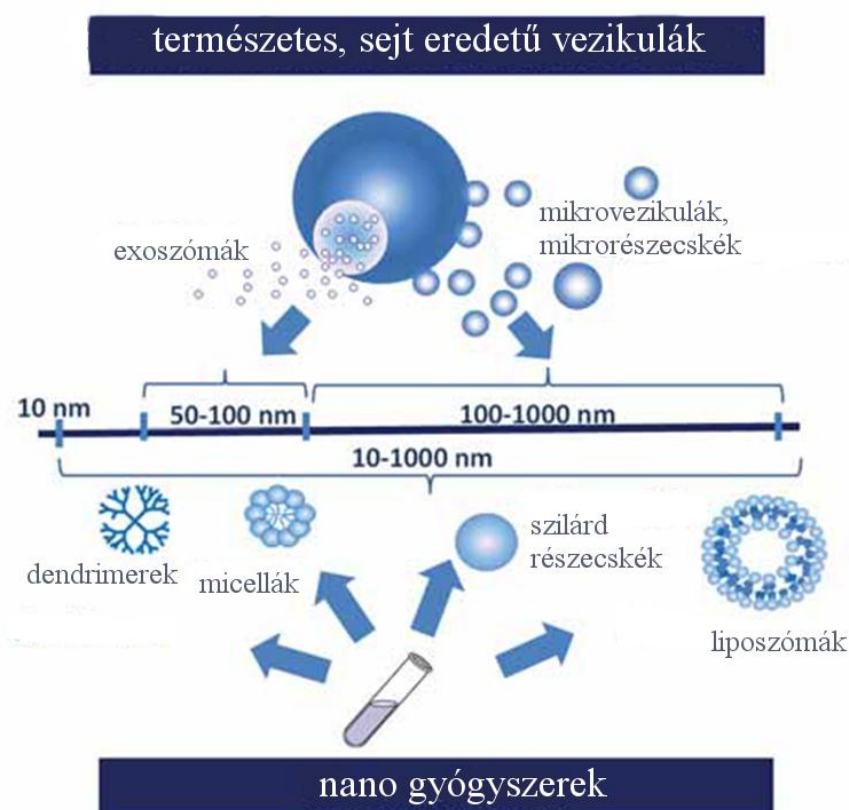
7. Extracelluláris vezikulák felületi adhéziójának monitorozása GCI-vel

Kutatásaim egyik legizgalmasabb részét az extracelluláris vezikulákkal való megismerkedés jelentette. A kutatási terület újdonsága mellett lenyűgözött a vezikulák sokfélesége, a szerepük az élővilágban és a velük kapcsolatban megszerzett ismeretek alkalmazhatósági lehetőségei. Meggyőződésem, hogy az extracelluláris vezikulák alaposabb megismerésével forradalmasítani lehet az orvostudományt és a diagnosztikát.

7.1. Az extracelluláris vezikulák

Az utóbbi szűk tíz évben az orvostudomány egyik legígéretesebb és leginkább kutatott területe az extracelluláris vezikulák (mikrovezikulák és exoszómák) tulajdonságai, keletkezésük folyamata és a szervezeten belüli pontos szerepük megismerése volt.

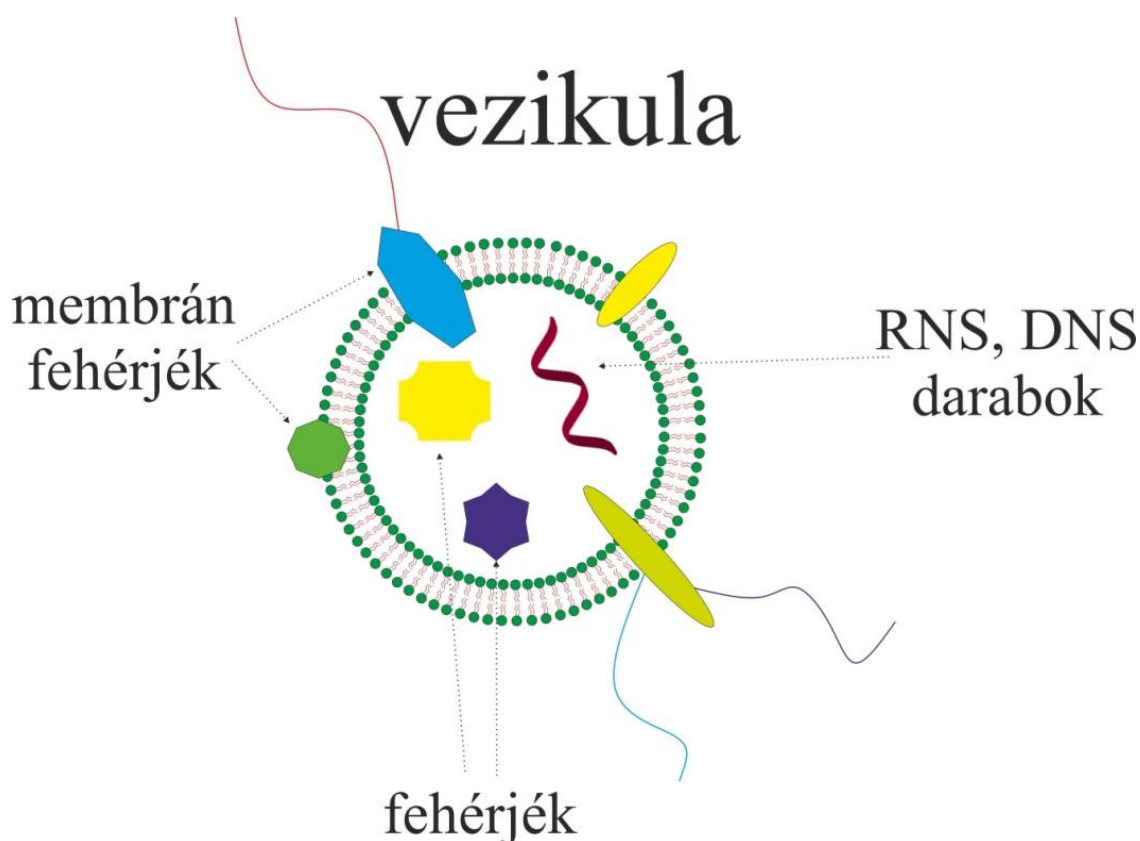
Extracelluláris vezikulákat minden sejt termel, még a sejtmag nélküli prokarióták is. Méretük 100 nm-től 1 μm -ig terjed (22. ábra) [57].



22. ábra. Az extracelluláris vezikulák és más sejt, illetve nem sejt eredetű részecskék mérete [57].

Felületüket lipid kettősréteg alkotja, mely sejtmembrán eredetű. Ennek köszönhetően felületükön a termelő sejtre specifikus membránfehérjék, lipidek, receptor molekulák, felismerő elemek találhatóak. Belsejükben fehérjék, RNS vagy akár DNS molekulák is lehetnek (23. ábra) [58,59]. Ezekből adódóan számos potenciális orvosi alkalmazási lehetőségük van.

Mivel a vezikulák specifikusak az őket termelő sejt típusra, alkalmasak lehetnek diagnosztikai célokra, pl. rákos elváltozások korai felismerésére [60,61].



23. ábra Az extracelluláris vezikula felépítése. Felületén receptorok és más felismerőelemek, belsejükben fehérje-, RNS-, sőt akár DNS-molekulák is találhatóak.

Az extracelluláris vezikulákról köztudott, hogy részt vesznek a sejt-sejt kommunikációban is, így terápiás felhasználásuk talán még ígéretesebb, mint diagnosztikai alkalmazásuk. Jelenleg retrovírusokat használnak a humán génterápiákban, hogy a kívánt génszakaszt bejuttassák a betegbe (pl. cisztás fibrózis esetén). Ennek a módszernek nagy hátránya, hogy immunválaszt vált ki. A beteg immunsejtjei idővel felismerik a vírusokat, és fellépnek ellene. Ennek következménye a terápia hatásosságának csökkenése lesz. Abban az esetben, ha a kérdéses génszakaszt a páciens saját mikrovezikuláiba csomagoljuk, a nemkívánatos immunreakció elkerülhető, a vezikula tartalma biztonságosan célba juttatható [57,62,63].

Jelentős szerepe van a vezikuláknak az immunválasz kialakításában is. A neutrofil granulocita immunsejt eredetű mikrovezikulák részt vesznek a szervezetet megtámadó baktériumok elleni harcban. Bakteriális fertőzés esetén jelentősen megnő a számuk a véráramban [64].

Látható, hogy milyen sokféle funkciója és alkalmazási lehetősége van az extracelluláris vezikuláknak, ezért is örülök, hogy ilyen jellegű kutatásokat végezhettem.

7.2. Extracelluláris vezikulák a jelölésmentes szenzorikában

Az extracelluláris vezikulák modelfelületekkel, biomolekulákkal, polimerekkel és receptorokkal történő kölcsönhatása felé egyre jelentősebb tudományos érdeklődés irányul. A jelölésmentes bioszenzorok igen fontos, akár központi szerepet tölthetnek majd be ezen kölcsönhatások vizsgálatában.

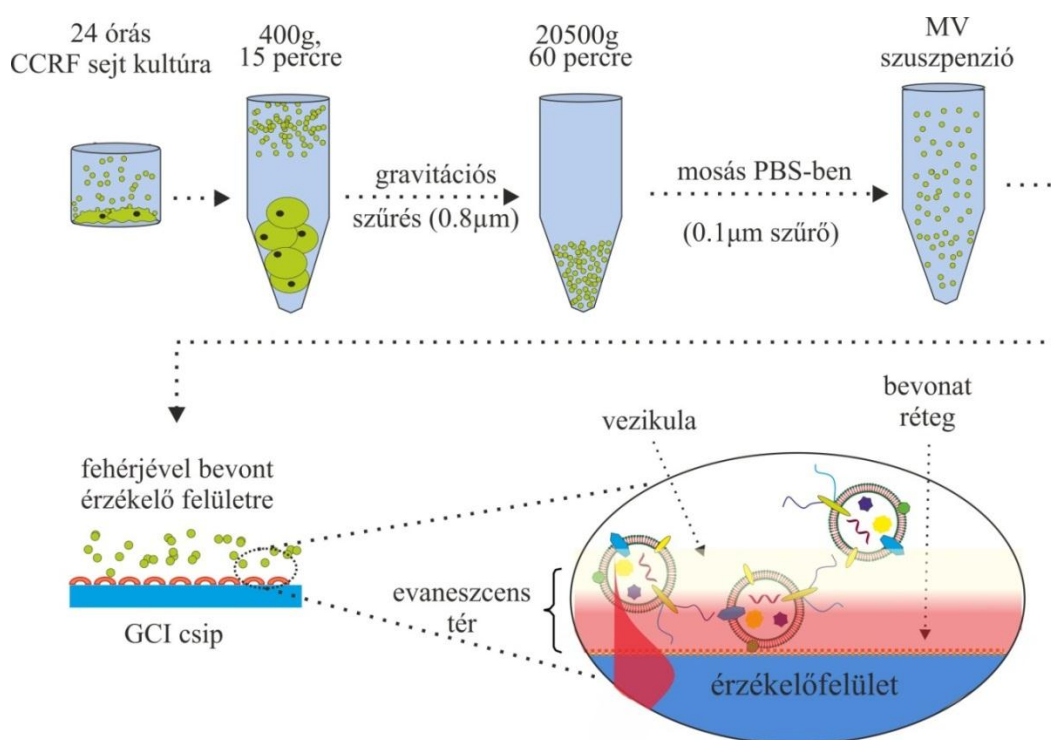
A vezikulák kis méretük miatt nem vagy csak nehezen vizsgálhatók konvencionális sejtbiológiai és labordiagnosztikai eszközökkel. Éppen ezért világszerte rendkívül erős igény mutatkozik egy olyan mérési módszerre, mely segítségével a vezikulák egyszerűen vizsgálhatóvá válnak. Az evaneszcens térben történő változásokat mérő szenzorok alkalmasak lehetnek a mikrovezikulák tanulmányozására.

A korábbi fejezetben bemutatott jelölésmentes, evaneszcens térérzékelésen alapuló optikai bioszenzor, a GCI, alkalmas lehet ilyen vizsgálatok elvégzésére [1]. A mérési stratégiát az egyszerűség, a megbízhatóság és a gazdaságosság kombinálásával alakítottuk ki. Kísérleteimmel demonstráltam, hogy a GCI az extracelluláris vezikulák vizsgálatának területén is kiválóan alkalmazható. A mérések során elsősorban arra a kérdésre kerestem a választ, hogy a CCRF-CEM T-limfocita (ECACC) sejtvonal eredetű extracelluláris mikrovezikulák kötődnek-e az extracelluláris mátrix egyes komponenseihez. Jelenleg igen kevés adat érhető el a vezikulák mátrix fehérjékkel való kölcsönhatásáról [65–67].

A vezikulák jelentős részének adhéziós receptor molekulák találhatók a felszínén. Érdekes lehet a kérdés, hogy jellemző-e egy adott mikrovezikula-típusra az integrin fehérjék jelenlétében mutatott szignalizációja [58]. Feltételezhető, hogy a vezikulák kötődnek az extracelluláris mátrixhoz (például az I. típusú kollagénnel, vagy a fibronectinnel), így lehetővé válik, hogy részt vegyenek a szövetregenerálásban és -javításban, a sejt migrációban, a gyulladás kialakításában vagy a véralvadásban.

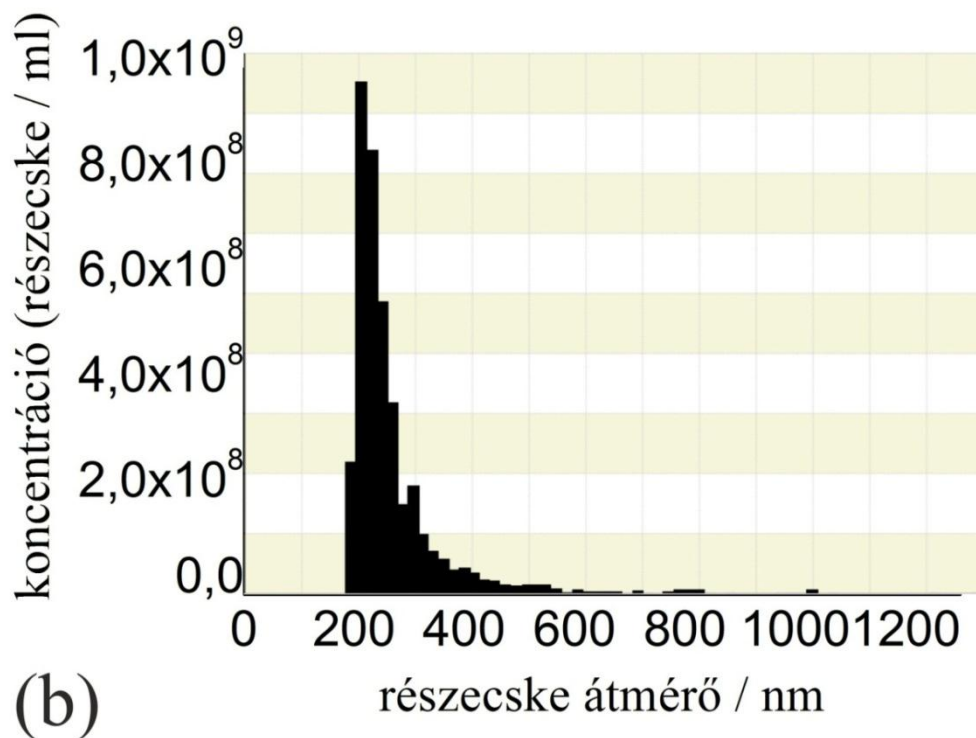
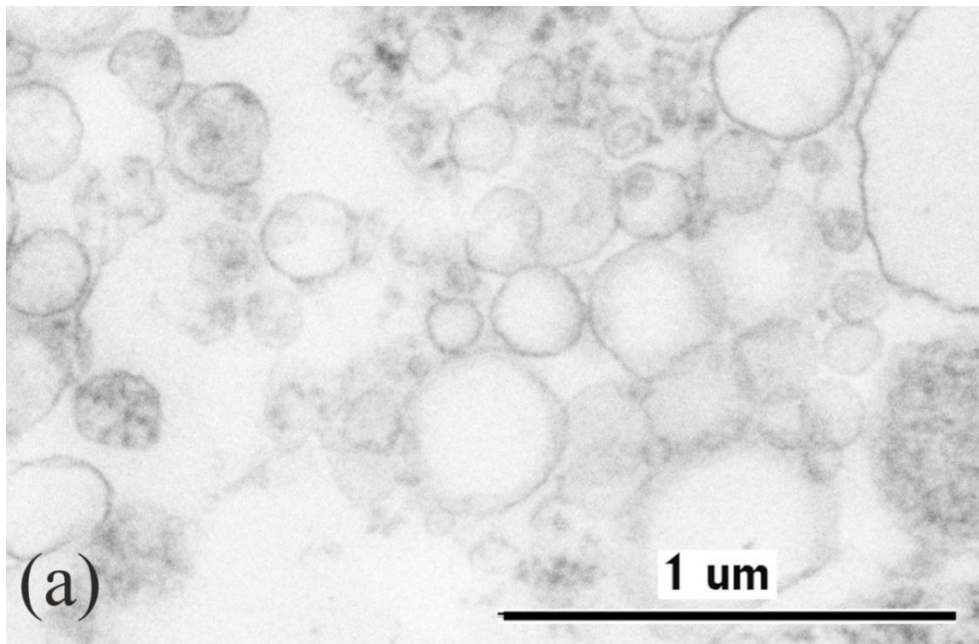
7.3. A vezikulák preparálása

A vezikulák preparálásának módszere a 24. ábrán látható. Első lépésben egy 10^6 CCRF-CEM sejt/ml koncentrációjú sejt kultúrát szérumentes tápba (médium) teszünk 24 órára (hogy elimináljuk a szérumban előforduló vezikulákat). A szérumentes tápközeg nem indukál szignifikáns apoptózist. 24 óra elteltével a médiumot $400\times g$ -n kell centrifugálni 15 percig, hogy a sejteket el lehessen választani a vezikuláktól, melyek a felülúszóban találhatók. Ezután a felülúszót egy 800 nm lyukátmérőjű szűrőn (Millipore, Billerica, CA) kell átszűrni, amelyenél csak a gravitáció a hajtóerő. A következő lépésben az átszűrt felülúszót $20.500\times g$ -n kell centrifugálni 60 percig [68–70]. Ezt követően a vezikulákat PBS oldatban kell mosni, majd egy $0,1\text{ }\mu\text{m}$ pórusú szűrőn átszűrni. A vezikula szuszpenzió fehérjekoncentrációját egy Micro BCA protein assay kit segítségével lehet meghatározni (Pierce Biotechnology, Inc.). Az átlagos fehérjekoncentráció a GCI-s mérések során $15\text{ }\mu\text{g/ml}$ volt. Felhasználásig a minták $-80\text{ }^\circ\text{C}$ voltak tárolva, legfeljebb 2 hétig. Utolsó lépésben a vezikula szuszpenzió a szenzor csip felületére került, melyet előre bevontam az vizsgálni kívánt mátrixfehérjével [3].



24. ábra A mikrovezikula-izolálás lépései. A vezikulák felületi adhézióját mátrixfehérjével előre bevont GCI csipeken mértem. Az adszorpció a vezetett módus evanescens tere segítségével lett megmérve [3].

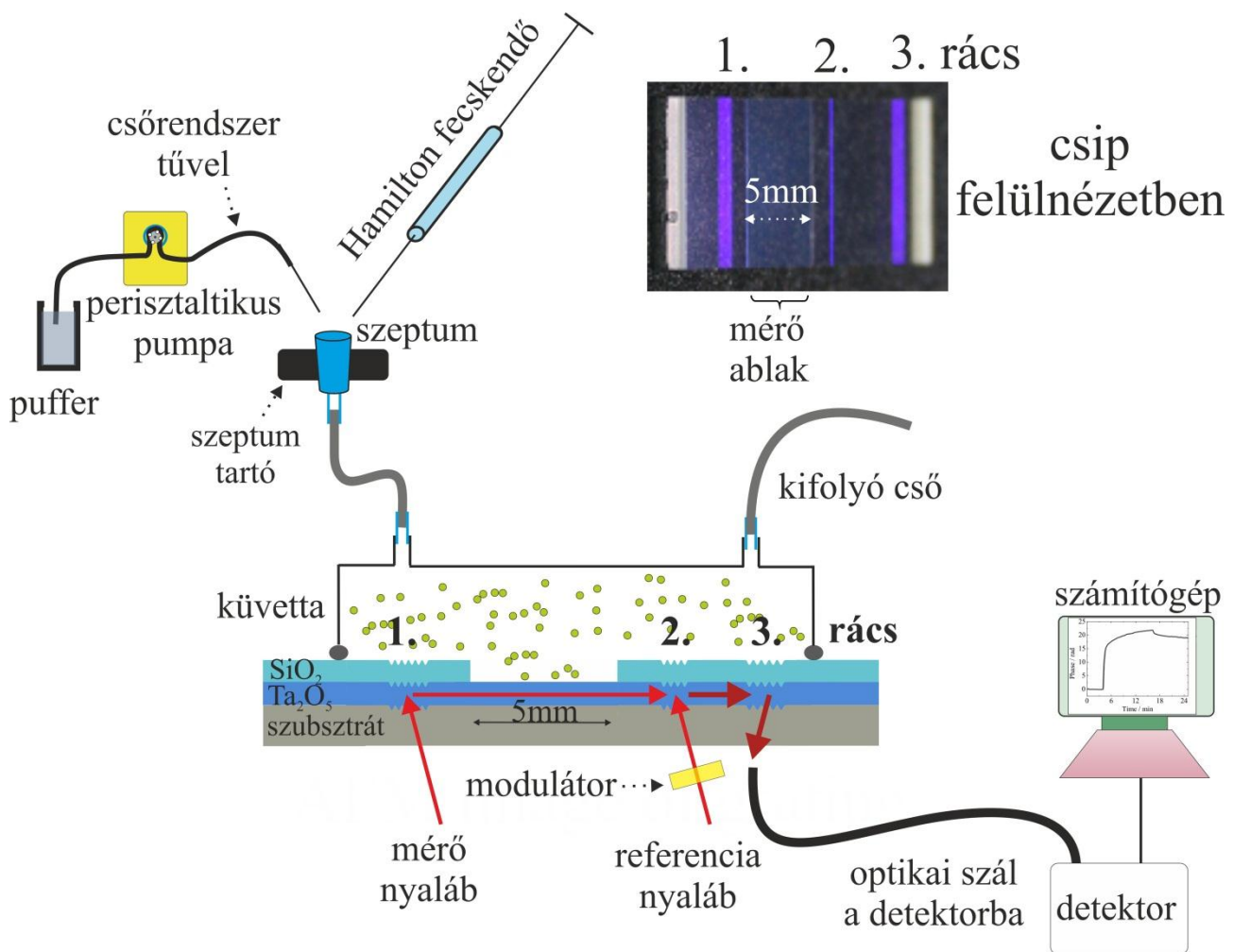
A mérések során felhasznált vezikulák minőségét és méreteloszlását egy fixálási eljárást követően elektronmikroszkóp segítségével lehetett tanulmányozni. Ennek az eredménye a 25. ábrán látható.



25. ábra (a) Transzmissziós elektronmikroszkópos kép a CCRF-CEM humán sejtvonal eredetű mikrovezikulákról. (b) A mikrovezikulák méreteloszlása ionabszorpciós méréssel lett meghatározva[3]. (Kollaborációs partnereink, Buzás Edit csoportjának munkája)

7.4. A vezikulamérés eredményei

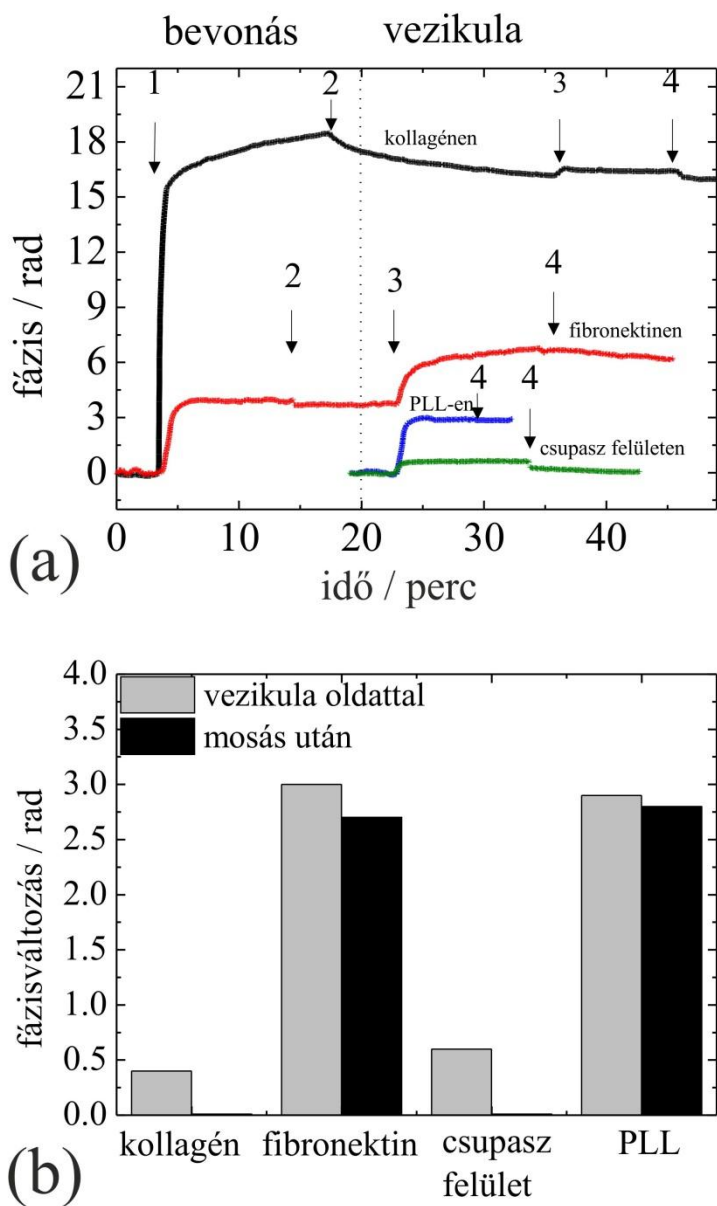
A mikrovezikulák adszorpciójának tanulmányozásához az előzőleg krómkénsavban megtisztított GCI szenzor csipet megfelelő optikai elrendezésbe helyeztem (26. ábra). A mérési elrendezésben két lineárisan poláros He-Ne lézernyaláb világította meg az első és a második becsatolórácsot, melyek szerepe a fény hullámvezetőbe csatolása volt. Az egyik nyaláb a folyadékkristályos modulátor segítségével modulálva volt, hogy referenciajelet szolgáltson a mérés során. A második rács mögött alakult ki az időfüggő interferencia jel. A jelet a harmadik rács csatolta ki, melyet egy optikai szál vezetett a detektorba. Az 5 mm-s mérőablaknál a minta által okozott fázisváltozást számítógép értékelte ki. A hőmérséklet egy Peltier-elemmel 25 °C-n lett stabilizálva. A csip fölé egy PEEK (poliéter-éter-keton) küvetta került, melyen Kalrez O-gyűrűk határolták a fluidikai teret. A minta küvettatérbe való jutását egy szeptumos injektoron keresztül oldottam meg (26. ábra). Ezzel ellenőrzötten lehetett a megfelelő mintamennyiséget alkalmazni. A küvettatér folyamatos mosása szintén megoldható volt a szeptumon keresztül egy tüben végződő csőrendszer alkalmazásával, melyben perisztaltikus pumpával áramoltattam a pufferoldatot. A szeptum egy speciális rögzítőelemmel lett stabilizálva, hogy az injektálás során okozott mechanikai zaj minél jobban kiküszöbölhető legyen.



26. ábra A vezikulaméréshez használt GCI elrendezés sematikus ábrája. Az ábra jobb felső sarkában látható a GCI csip az optikai rácsokkal és az 5 mm hosszú mérőablakkal [3].

A mérés elején a küvetnában PBS oldatot áramoltattam folyamatosan perisztaltikus pumpa segítségével. Az alapvonal felvétele után I. típusú kollagén (0,1 mg/ml, Sigma-Aldrich) vagy fibronectin (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Sigma-Aldrich) oldatot injektáltam a küvetnába Hamilton fecskendővel. A mért fázisjel folyamatosan nőtt, mutatva, hogy a mátrixfehérjék adszorbeálódnak a szenzorfelületre (27.(a) ábra). 15 perc elteltével PBS pufferrel átmostam a küvetnát, hogy eltávolítsam a reverzibilisen kitapadt fehérjéket. Ezt követte a mikrovezikula-szuszpenzió beinjektálása. Miközben a vezikulák a csip mérőfelületén adszorbeálódtak, megnövelték a törésmutatót az evanescens térben, ezért nőtt a fázis. Ezután ismételt pufferes mosást végeztem, hogy eltávolítsam az összes ki nem tapadt vezikulát a küvetta térből. A 27. ábrán látható a mérések egyes szakaszaihoz tartozó fázisváltozás. Jól látható, hogy a vezikulák nem adszorbeálódnak irreverzibilis módon az I. típusú kollagénhez. Ezzel ellentétben a fibronectin bevonatra helyezett vezikulák 3 rad-os fázisváltozást okoztak. A vezikulaadszorpció poli-L-lizin (PLL) és bevonat nélküli felületen is teszteltem. (A PLL

egy enyhén pozitívan töltött réteget hoz létre a szenzorfelületen.) A sima (Ta_2O_5) felületen nem figyelhető meg irreverzibilis adszorpció, míg a PLL-lel bevonton irreverzibilis volt a vezikulák kitapadása (2,5 rad fázisváltozás) [3].



27. ábra A mikrovezikula-adszorpció során mért fázisváltozások. A nyilak jelölik: (1) A bevonóoldat befecskendezése. (A poli-L-lizines (PLL) bevonás nem látszik, mert az nem *in-situ* került a felületre) (2) A nem kötött fehérjék lemosása pufferoldattal. (3) A mikrovezikula oldat beinjektálása. (4) Az irreverzibilisen kötött vezikulák lemosása. (b) A vezikulaoldat által okozott fázisváltozás az egyes felületek esetében (szürke oszlop). A fázisváltozás a mosás hatására (fekete oszlop) [3].

A PLL réteghez való kötődés magyarázható a vezikulák negatív felületi töltöttségével, amely a foszfatidil-szerin oldalláncoknak köszönhető [68,69,71]. Az eredmények alapján a poli-L-lizin használható vezikulák immobilizálására, és olcsó alternatívaként szolgálhat az annexin V helyett. A mikrovezikulák fibronectinhez történő irreverzibilis kötése is bizonyításra került [3]. Ez az eredmény párhuzamba állítható azzal, hogy a leukocita eredetű mikrovezikulák felületén integrinek találhatóak, melyek szerepet játszhatnak a fibronectinhez való kötődésben.

Meglepetésként szolgált, hogy a vezikulák nem tapadtak az I. típusú kollagénhez, ez valószínűleg annak tudható be, hogy a Ta₂O₅ hullámvezető felületen a kollagén nem megfelelő konformációban adszorbeálódott [3]. Fontos megjegyezni, hogy a kísérletekben használt GCI elrendezéssel mért 2×10^{-4} törésmutató-változás az evanescens térben (effektív törésmutató-változás) arányos 1 rad fázisváltozással a GCI jelben. Ebből következik, hogy a fent látható fázisváltozások (melyeket a mikrovezikulák felületi adszorpciója okozott) kimutatásához meglehetősen nagy érzékenységre van szükség.

7.5. Az extracelluláris vezikulákkal kapcsolatos eredményeim összefoglalása

Összefoglalásként elmondható, hogy a rács csatolt interferométer (GCI) új módszer a sejt eredetű vezikulák extracelluláris mátrixfehérjékkel való kölcsönhatásának vizsgálatára. A GCI technika jelölésmentes mérési módszer, vagyis a vezikulákat natív szerkezetüket megtartva tudtam vizsgálni. Ez rendkívül fontos, mivel a vezikulák új biomarkerként szolgálhatnak. Jelentős számban előfordulnak különböző biológiai folyadékokban, ideértve a vérplazmát, a vizeletet, az agygerincvelői folyadékot, az anyatejet stb. Mennyiségük, fehérjeösszetételük és miRNS-tartalmuk sok patológias elváltozással mutat összefüggést, többek között a tumorok, autoimmun betegségek, szív- és érrendszeri megbetegedések, fertőzések okozta elváltozásokkal [58]. Mindazonáltal a rutin klinikai diagnosztikájuk limitált, ezért szükség van új technikák fejlesztésére a vezikulák vizsgálatához. Munkám során az extracelluláris mikrovezikulák mátrixfehérjékhez való kötődését a GCI jelölésmentes optikai bioszenzor képességeinek kiaknázásával vizsgáltam. Jövőbeni vizsgálatok tárgyát képezhetik a vezikulák és antitest fehérjék kölcsönhatásának (mint receptor-ligand kölcsönhatás) tanulmányozása.

8. PhD eredményeim összefoglalása

PhD tanulmányaim alatt megismerkedtem a jelölésmentes hullámvezető alapú optikai bioszenzorokkal és alkalmazási lehetőségeikkel. Részt vettem a GCI (Grating Coupled Interferometry) rácscsatolt interferometria szenzor fejlesztésében. Kutatásaim során megmutattam, hogy a GCI törésmutató-érzékenysége a 10^{-7} - 10^{-8} tartományban van, a felületi tömegérzékenysége pedig $0,1 \text{ pg/mm}^2$ alatti. Az általam használt szenzornál új csip geometriát alkalmaztam, mely két becsatoló és egy kicsatoló rácst tartalmazott, hogy jobban kontrollálni lehessen a csipben haladó módust. Újítás volt továbbá az egysugaras interferencia alkalmazása, melyet úgy értem el, hogy a megvilágítónyalábot egy nyalábtágító segítségével kb. 15-szörösére tágítottam, így a becsatoló rácsokat egyszerre tudtam megvilágítani, és nem volt szükség individuális nyalábok nehézkes párhuzamosítására.

Egy bioszenzornál lényeges kritérium a hőmérséklet stabilitása és variálhatósága, ezt egy Peltier-elem segítségével oldottam meg. A mérések során új küvettarendszert alkalmaztam. A kitégített nyalábnak köszönhetően két fluidikai csatorna alkalmazására nyílt lehetőség, melyek közül az egyiket referenciaként tudtam használni, vagy akár a párhuzamos mérések is végezhetőek voltak az igényeknek megfelelően.

A GCI szenzorral fehérjeadszorpciós kísérleteket végeztem, melyek segítségével igazoltam a fentebb említett szenzorérzékenységet. Sikerült demonstrálni, hogy a felhasznált fibrinogén fehérje irreverzibilisen tapad a csip felületére.

A GCI szenzor alkalmas mind TE, mind TM polarizációs módusokban mérni. Ez könnyen megvalósítható a folyadékkristályos modulátor cseréjével és a lézerfényforrás elforgatásával. Kísérletekkel igazoltam, hogy a TM polarizációs módus nagyobb érzékenységgel rendelkezik, mint a TE, összhangban az elméleti várakozásokkal.

A bioszenzorikában alapvető követelmény a biokompatibilitás, valamint az, hogy a minta kezelésére használt csatorna anyaga ne oldódjon vizes közegben. Ezekre sikerült egy újszerű megoldást találni, egy kétoldalú ragasztóból kialakítható mikrofluidikai rendszer formájában. A módszer nagy előnye, hogy a csatornák előállításához nem szükséges tisztatér, speciális laborfelszerelés, sem marási technológia vagy utólagos kezelés. A kétoldalú ragasztóból egy lézergravírozó segítségével könnyedén kivágható a kísérlet megkívánt csatornaforma. A csatorna tervrajza Corel Draw program alkalmazásával elkészíthető. A rajzolástól a csatorna és küvetta összeszerelésig mindössze pár percre van szükség. A csatorna vastagságát a ragasztó vastagsága

határozza meg. A csatorna működőképességét glicerinnoldatos és fehérjeadszorpciós kísérletekkel demonstráltam. Fehérjék adszorpciós kinetikájának nyomon követésére egy másik bioszenzort, az OWLS-t is alkalmaztam, megmutatva a kétoldalú ragasztó alapú csatorna felhasználhatóságának lehetőségeit. A fehérjével végzett kísérleteknél stop-flow injektálást alkalmaztam, vagyis egyszerre csak egy meghatározott mennyiségű mintát injektáltam a küvettaába. Az eredményben adszorpciós lépcsők voltak láthatók, ami azt jelenti, hogy a küvettaában egyetlen injektálás során nem sikerült annyi fehérjeoldatot felhalmozni, hogy a szenzorfelület abszolút telítésbe kerüljön. Ezt csak 5-6 injektálás után történt meg.

A kétoldalú ragasztó alkalmazásának köszönhetően egy átlátszó küvettaárendszer is sikerült kialakítanom. Ennek jelentősége, hogy így egy mikroszkóp segítségével monitorozható a szenzor csip felülete, és ellenőrizhető, hogy mi okozta a fázisgörbe változását. A módszer demonstrálásához *Salmonella* baktériumokat választottam, melyeket PLL-lel bevont szenzorfelületre injektáltam. A baktériumok kitapadtak a felületre, látványos fázisjelet adva, majd sikerült jó minőségű mikroszkópos felvételeket készítenem a kitapadt sejtekről.

Legjobb tudomásom szerint elsőként tanulmányoztam jelölésmentes optikai bioszenzorral extracelluláris vezikulákat (mikrovezikulákat). A mérések során a vezikulák extracelluláris mátrixfehérjékhez (kollagén és fibronectin) való kötődését vizsgáltam alapkutatói célokkal. Fontosnak tartom hangsúlyozni, hogy a vezikulák kis méretük és alacsony koncentrációjuk miatt igazi kihívást jelentenek a jelölésmentes bioszenzorika területén, éppen ezért szükség volt egy olyan nagy érzékenységű szenzor alkalmazására, mint a GCI. A mérések során megmutattam, hogy az extracelluláris vezikulák jól tapadnak fibronectinhez, illetve a PLL-réteghez, viszont az I. típusú kollagénhez és a kezeletlen szenzorfelülethez nem. Ezen információk fontosak lehetnek az esetleges orvosi diagnosztikai és terápiás alkalmazásoknál.

9. Függelék

9.1. Elektromágneses síkhullámok terjedése szigetelő közegben

Forrásmentes, végtelen, szigetelő közegben az elektromágneses mezőket leíró Maxwell egyenletek a következő formában írhatók le:

$$\nabla \cdot \mathbf{B} = 0$$

$$\nabla \cdot \mathbf{D} = 0$$

$$\nabla \times \mathbf{E} + \frac{\partial \mathbf{B}}{\partial t} = 0 \quad (8)$$

$$\nabla \times \mathbf{H} - \frac{\partial \mathbf{D}}{\partial t} = 0$$

Ha a fenti egyenletek megoldásait $e^{-i\omega t}$ alakban keressük (időfüggő harmonikus megoldás), az egyenletek a következőképp alakulnak:

$$\nabla \cdot \mathbf{B} = 0$$

$$\nabla \cdot \mathbf{D} = 0$$

$$\nabla \times \mathbf{E} - i\omega \mathbf{B} = 0 \quad (10)$$

$$\nabla \times \mathbf{H} + i\omega \mathbf{D} = 0$$

Homogén izotróp, lineáris közegben $\mathbf{D}=\epsilon\mathbf{E}$ és $\mathbf{B}=\mu\mathbf{H}$ és veszteségmentes közeget feltételezve:

$$\nabla \times \mathbf{E} - i\omega \mathbf{B} = 0 \quad (11)$$

$$\nabla \times \mathbf{B} + i\omega\mu\epsilon\mathbf{E} = 0 \quad (12)$$

A két előző egyenletet egymásba helyettesítve a Helmholtz-hullámegyenletet kapjuk:

$$(\nabla^2 + \mu\epsilon\omega^2)\mathbf{E} = 0 \quad (13)$$

$$(\nabla^2 + \mu\epsilon\omega^2)\mathbf{B} = 0 \quad (14)$$

Amennyiben x irányba haladó $e^{ikx-i\omega t}$ síkhullámot veszünk, k hullámszám és ω frekvencia közti kapcsolat a következőképpen írható fel:

$$k = \sqrt{\mu\epsilon}\omega \quad (15)$$

A hullám fázissebessége és a közeg törésmutatója:

$$v = \frac{\omega}{k} = \frac{1}{\sqrt{\mu\epsilon}} = \frac{c}{n} \quad (16)$$

$$n = \sqrt{\frac{\mu}{\mu_0} \frac{\epsilon}{\epsilon_0}} \quad (17)$$

Így az 1 dimenziós alapmegoldás:

$$u(x, t) = ae^{ikx-i\omega t} + be^{-ikx-i\omega t} \quad (18)$$

Az $\omega = kv$ felhasználásával:

$$u_k(x, t) = ae^{ik(x-vt)} + be^{-ik(x+vt)} \quad (19)$$

Olyan ω körfrekvenciájú és $\mathbf{k}=\mathbf{kn}$ hullámszám vektorú elektromágneses síkhullámot keresünk, mely kielégíti mind a Maxwell, mind a Helmholtz egyenletek által szabott feltételeket. Az elektromos térerősséget és a mágneses indukcióvektort a következőképpen írhatjuk fel:

$$\mathbf{E}(x, t) = \mathbf{E}e^{iknx-i\omega t} \quad (20)$$

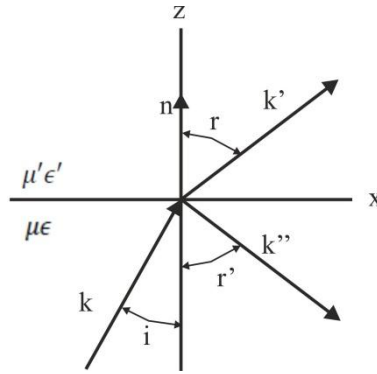
$$\mathbf{B}(x, t) = \mathbf{B}e^{iknx-i\omega t} \quad (21)$$

Ahol \mathbf{E} és \mathbf{B} állandó vektorok. \mathbf{E} és \mathbf{B} kielégíti a Helmholtz egyenletet, ha feltesszük $k^2\mathbf{n} \cdot \mathbf{n} = \mu\epsilon\omega^2$ ahol \mathbf{n} egységvektor. A Maxwell-egyenleteknél megfigyelhető divergencia miatt $\mathbf{n} \cdot \mathbf{E} = 0$ és $\mathbf{n} \cdot \mathbf{B} = 0$. Ezek értelmében \mathbf{E} és \mathbf{B} merőleges az \mathbf{n} terjedési irányra. Az ilyen típusú megoldásokat transzverzális hullámoknak nevezzük.

A rotációra vonatkozó egyenletek újabb megszorításokat tartalmaznak.

$$\mathbf{B} = \sqrt{\mu\epsilon}\mathbf{n} \times \mathbf{E} \quad (22)$$

A $\sqrt{\mu\epsilon}$ tényező $\sqrt{\mu\epsilon} = \frac{n}{c}$ -ként írható, ahol n a korábban már definiált törésmutató. Látszik, hogy a vákuumban terjedő hullámnál $c\mathbf{B}$ és \mathbf{E} között anyagi közegben a törésmutató teremt kapcsolatot.



28. ábra Elektromágneses hullámok sík dielektrikumok határán.

A 28. ábrán látható koordináta rendszert veszem alapul. A $z=0$ sík alatti közeg permeabilitása μ , permittivitása pedig ϵ . A törésmutatók $n = \sqrt{\mu\epsilon/\mu_0\epsilon_0}$, és $n' = \sqrt{\mu'\epsilon'/\mu_0\epsilon_0}$. A síkhullám (\mathbf{k} hullámszám vektorú, ω körfrekvenciájú) a μ , ϵ közegből érkezik a felület határára (a megtört paramétereket ' a visszaverteket '' jelzi). Ezek alapján:

Beeső hullám:

$$\mathbf{E} = \mathbf{E}_0 e^{i\mathbf{k}\cdot\mathbf{x} - i\omega t} \quad (23)$$

$$\mathbf{B} = \sqrt{\mu\epsilon} \frac{\mathbf{k} \times \mathbf{E}}{k} \quad (24)$$

Megtört hullám:

$$\mathbf{E}' = \mathbf{E}'_0 e^{i\mathbf{k}'\cdot\mathbf{x} - i\omega t} \quad (25)$$

$$\mathbf{B}' = \sqrt{\mu'\epsilon'} \frac{\mathbf{k}' \times \mathbf{E}'}{k} \quad (26)$$

Visszavert hullám:

$$\mathbf{E}'' = \mathbf{E}''_0 e^{i\mathbf{k}''\cdot\mathbf{x} - i\omega t} \quad (27)$$

$$\mathbf{B}'' = \sqrt{\mu''\epsilon''} \frac{\mathbf{k}'' \times \mathbf{E}''}{k} \quad (28)$$

A hullámszám vektorok hossza:

$$|\mathbf{k}| = |\mathbf{k}''| = k = \omega\sqrt{\mu\epsilon}, \quad (29)$$

$$|\mathbf{k}'| = k' = \omega\sqrt{\mu'\epsilon'}. \quad (30)$$

A $z=0$ -beli határfeltételeknek tetszőleges időben a sík minden egyes pontjára igazaknak kell lenniük. A $z=0$ -beli összes fázistényezőnek egyeznie kell.

$$(\mathbf{k} \cdot \mathbf{x})_{z=0} = (\mathbf{k}' \cdot \mathbf{x})_{z=0} = (\mathbf{k}'' \cdot \mathbf{x})_{z=0} \quad (31)$$

Az előző egyenletet és az ábrát tanulmányozva a következő észrevételt tehetjük:

$$k \sin i = k' \sin r = k'' \sin r' \quad (32)$$

A $k''=k$ miatt $i=r'$, tehát a beesési és visszaverődési szögek megegyeznek. Ezenkívül megkapjuk a Snellius-Descartes törvényt is:

$$\frac{\sin i}{\sin r} = \frac{k'}{k} = \sqrt{\frac{\mu' \epsilon'}{\mu \epsilon}} = \frac{n'}{n} \quad (33)$$

A közegethatáron \mathbf{D} és \mathbf{B} normálirányú, valamint \mathbf{E} és \mathbf{H} tangenciális komponensének folytonosan kell a közegethatáron áthaladnia. A határfeltételek így a következőképpen néznek ki.

$$[\epsilon(\mathbf{E}_0 + \mathbf{E}_0'') - \epsilon' \mathbf{E}_0'] \cdot \mathbf{n} = 0 \quad (34)$$

$$[k \times \mathbf{E}_0 + k'' \times \mathbf{E}_0'' - k' \times \mathbf{E}_0'] \cdot \mathbf{n} = 0 \quad (35)$$

$$[\mathbf{E}_0 + \mathbf{E}_0'' - \epsilon' \mathbf{E}_0'] \times \mathbf{n} = 0 \quad (36)$$

$$\left[\frac{1}{\mu} (k \times \mathbf{E}_0 + k'' \times \mathbf{E}_0'') - \frac{1}{\mu'} (k' \times \mathbf{E}_0') \right] \times \mathbf{n} = 0 \quad (37)$$

E határfeltételek alkalmazásakor két esetet különböztethetünk meg. Az elsőben a beeső síkhullám polarizációvektora a beesési síkra merőleges, a második esetben viszont a beesési síkkal párhuzamos.

Elsőként a beesési síkra merőleges esetet tárgyaljuk, az irodalomban transzverz elektromos (TE) hullámokként említett megoldásokat. A \mathbf{B} olyan irányú, hogy az energia áramlása a hullámvektorok irányába pozitív legyen. Mivel az \mathbf{E} a felülettel párhuzamos, ezért az előző egyenletek közül az első automatikusan teljesül. A második egyenlet a harmadikat ismétli meg, a Snellius-Descartes-törvényt figyelembe véve. A 3. és 4. egyenletek alapján felírhatjuk, hogy:

$$E_0 + E_0'' - E_0' = 0 \quad (38)$$

$$\sqrt{\frac{\epsilon}{\mu}} (E_0 - E_0'') \cos i - \sqrt{\frac{\epsilon'}{\mu'}} E_0' \cos r = 0 \quad (39)$$

A megtört és a visszavert hullám amplitúdóira a következő összefüggéseket kapjuk:

$$\frac{E_0'}{E_0} = \frac{2n \cos i}{n \cos i + \frac{\mu}{\mu'} \sqrt{n'^2 - n^2 \sin^2 i}} \quad (40)$$

$$\frac{E_0''}{E_0} = \frac{n \cos i - \frac{\mu}{\mu'} \sqrt{n'^2 - n^2 \sin^2 i}}{n \cos i + \frac{\mu}{\mu'} \sqrt{n'^2 - n^2 \sin^2 i}} \quad (41)$$

Amennyiben az \mathbf{E} párhuzamos a beesési síkkal (transzverz mágneses (TM) hullámok esete) a tangenciális \mathbf{E} - és \mathbf{H} - komponens folytonosságának megkövetelése a következőket eredményezi:

$$\cos i (E_0 - E_0'') - \cos r E_0' = 0 \quad (41)$$

$$\sqrt{\frac{\epsilon}{\mu}}(E_0 - E_0'') - \sqrt{\frac{\epsilon'}{\mu'}}E_0' = 0 \quad (43)$$

Így a megtört és visszavert hullámok amplitúdóira a következőket kapjuk:

$$\frac{E_0'}{E_0} = \frac{2nn'\cos i}{\frac{\mu}{\mu'}n'^2\cos i + n\sqrt{n'^2 - n^2}\sin^2 i} \quad (44)$$

$$\frac{E_0''}{E_0} = \frac{\frac{\mu}{\mu'}n'^2\cos i - n\sqrt{n'^2 - n^2}\sin^2 i}{\frac{\mu}{\mu'}n'^2\cos i + n\sqrt{n'^2 - n^2}\sin^2 i} \quad (45)$$

9.2. Interferencia

Interferencia jelenségéről akkor beszélünk, ha két monokromatikus hullám találkozik. A két hullám $A_1(\mathbf{x})$ és $A_2(\mathbf{x})$ komplex amplitúdói összegződnek. Az eredmény egy $A(\mathbf{x})$ monokromatikus hullám azonos frekvenciával [72].

$$A(\mathbf{x}) = A_1(\mathbf{x}) + A_2(\mathbf{x}), \quad (46)$$

Az egyes hullámok intenzitása az amplitúdók abszolút értékének négyzetével egyenlőek, így felírható:

$$I = |A|^2 = |A_1 + A_2|^2 = |A_1|^2 + |A_2|^2 + A_1^* A_2 + A_1 A_2^* \quad (47)$$

$$A_1 = \sqrt{I_1}e^{i\varphi_1} \text{ és } A_2 = \sqrt{I_2}e^{i\varphi_2} \quad (48)$$

Ahol a φ_1 és φ_2 a két hullám fázisai.

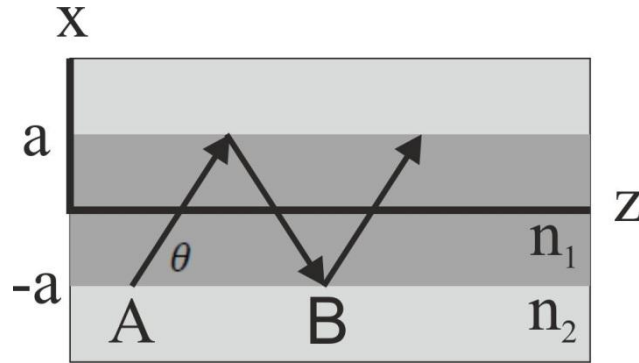
Ebből az eredő hullám intenzitására a következő kifejezést kapjuk:

$$I = I_1 + I_2 + 2\sqrt{I_1 I_2}\cos\delta \quad (49)$$

Ahol $\delta = \varphi_2 - \varphi_1$. Az (49) egyenlet utolsó tagja az ún. interferencia tag.

9.3. Sík hullámvezetők

Elsőként a plánpáralel lemez alapú dielektromos hullámvezetők esetét tárgyalom [73].



29. ábra Egy plánpáralel lemez alakú hullámvezető sematikus rajza a sugármenetekkel.

Vegyünk egy x irányban $2a$ vastagságú y és z irányban végtelen kiterjedésű dielektrikumot (29. ábra). A z irányba terjedő hullámot keressük. A plánpáralel lemez törésmutatója n_1 a körülötte lévő közegé n_2 . A síkpárhuzamos lemez határfelületei $x = \pm a$ irányban találhatók. A z irányba terjedő teljes visszaverődést szenvedő hullám zárt tartományba kényszerül, ezt fogjuk tanulmányozni. A 29. ábrán jelölt trajektóriát értelmezhetjük úgy, mint a terjedő síkhullám hullámfrontjának normálisát. A stabil és koherens z irányú terjedéshez szükséges, hogy az A ponttól a B pontig összegyűjtött (transzverzális) hullámfázis a 2π egész számú többszöröse legyen.

$$4kasin\theta + \Phi = 2m\pi \quad (50)$$

Ahol m nem negatív egész, $k = n_1 \frac{\omega}{c}$, Φ a teljes visszaverődéshez tartozó fázisugrás a határfelületeken.

$$\Phi_{TE} = -2\text{arctg}\sqrt{\frac{2\Delta}{\sin^2\theta} - 1} \quad (51)$$

$$\Phi_{TM} = -2\text{arctg}\left(\frac{1}{1-2\Delta}\sqrt{\frac{2\Delta}{\sin^2\theta} - 1}\right) \quad (52)$$

Ahol $\Delta = \left(\frac{n_1^2 - n_2^2}{2n_1^2}\right)$. TE jelölés esetén az elektromos térerősség vektor merőleges a beesési síkra, TM esetén pedig a mágneses térerősség vektor merőleges a beesési síkra. Ha bevezetjük a $V = ka\sqrt{2\Delta}$ szálparamétert, és a $\xi = \frac{\sin\theta}{\sqrt{2\Delta}}$ transzverzális változót az (50) egyenlet a következő alakot ölti:

$$\text{tg}\left(V\xi - \frac{m\pi}{2}\right) = f\sqrt{\frac{1}{\xi^2} - 1} \quad (53)$$

ahol $f=1$ TE esetén és $f = \frac{1}{1-2\Delta}$ TM módus esetén.

Bár az előző gondolatmenet csak a hullámvezető belsejében vizsgálta a hullámot, az elektromágneses mező azon kívül is jelen van. Hatását a Φ tag foglalja magába. A dielektrikum

hullámvezetőt körülvevő térrészben a térerősség $e^{-\beta|x|}$ szerint függ x -től.

$$\beta = k\sqrt{2\Delta - \sin^2\theta} = \frac{V}{a}\sqrt{1 - \xi^2} \quad (54)$$

Hullámvezetésről akkor beszélünk, ha a teljesítmény nagy része a hullámvezetőben terjed, nem pedig a szubsztrátban vagy a fedőrétegben. Ha $V=1$, akkor TE_0 módus teljesítményének a harmada terjed a köpenyben. Amennyiben $V \gg 1$, akkor a terjedés szinte teljes egészében a magban történik [73].

9.4. A módus egyenlet és a hullámvezető érzékenysége

Rácsal történő módusgerjesztés esetén a hullámvezetőbe történő becsatolás a következő képlettel írható le [33]:

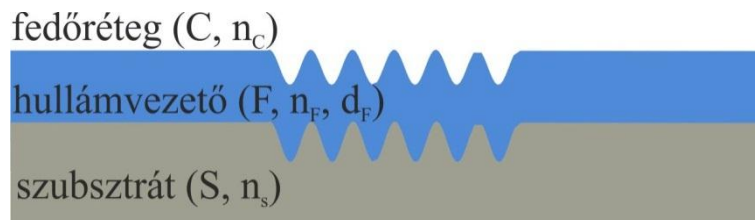
$$N = n_0 \sin\alpha + l\left(\frac{\lambda}{\Lambda}\right), \quad (55)$$

ahol N az effektív törésmutató, n_0 a levegő törésmutatója, α a becsatolás szöge, l a diffrakciós rend (ez egymódusú hullámvezető esetén 1), λ a hullámhossz és Λ a rácsállandó. Mivel a TE és TM módusok effektív törésmutatója eltér, hozzájuk más becsatolási szög tartozik.

Abban az esetben, ha valamilyen n_C törésmutatójú anyag kerül a diffrakciós rácsra, az magával vonzza a becsatolási szög megváltozását. Szintén megváltozik a becsatolási szög, ha valami adszorbeálódik a rácsra vagy deszorbeálódik a rács felületéről. Az effektív törésmutató megváltozását a becsatolási szög függvényében a következőképpen határozhatjuk meg [33]:

$$\Delta N = n(\sin(\alpha + \Delta\alpha) - \sin\alpha) \cong n \cos\alpha \Delta\alpha. \quad (56)$$

Háromrétegű hullámvezető egy fél-végtelen szubsztrátból (S, törésmutatója n_s), egy nagy törésmutatójú filmből (F, vastagsága d_F , törésmutatója n_F) és a hullámvezetőn lévő szintén fél-végtelen fedőrétegből (C, törésmutatója n_C) áll (30. ábra).



30. ábra A 3 rétegű hullámvezető modellje az egyes rétegek nevével, annak rövidítésével, valamint az egyes rétegek törésmutatójával és vastagságával.

Ebben az esetben a módus egyenlet levezetése hasonló az előző fejezetben tárgyaltakhoz, viszont itt már a beesési szögek helyett a bonyolultabb számolásokban könnyebben kezelhető effektív törésmutató alapú formalizmusra térek át. Így a módus egyenletet a következőképpen írhatjuk fel [33]:

$$\Phi_3 \equiv \pi m = 2k_{z,F}d_F + \Phi_{F,S} + \Phi_{F,C}, \quad (57)$$

ahol $k_{z,F} = k\sqrt{n_F^2 - N^2}$, $k=2\pi/\lambda$, ahol λ a hullámhossz vákuumban, $\Phi_{F,S}$ és $\Phi_{F,C}$ az egyes felületeken történő teljes visszaverődés során bekövetkező fázisváltozások. A fenti jelenséget akár úgy is meg lehet közelíteni, hogy a módus úgy terjed, mintha sorozatos oda-vissza verődéseket szenvedne a hullámvezető film két határfelületén. A Φ_3 a teljes fázisváltozást jelenti, ami az oda-vissza verődések következtében létrejön. A komplex reflexiós koefficiens a határfelületeken (J jelöli C-t vagy S-t attól függően, hogy az FC vagy FS határfelület mentén tekintjük a reflexiót) [33]:

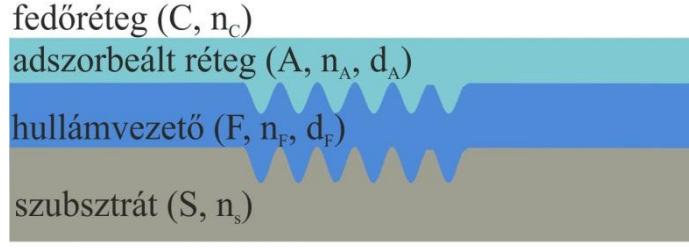
$$r_{F,J} = \frac{\frac{k_{z,F}}{n_F^{2\rho}} - \frac{k_{z,J}}{n_J^{2\rho}}}{\frac{k_{z,F}}{n_F^{2\rho}} + \frac{k_{z,J}}{n_J^{2\rho}}}, \quad (58)$$

ahol $\rho = 0$ TE és $\rho = 1$ TM módusok esetén, valamint $k_{z,J} = k\sqrt{n_J^2 - N^2}$. Abban az esetben, ha $N > n_J$, teljes visszaverődések sorozatáról beszélhetünk. Könnyen belátható, hogy ebben az esetben az elektromágneses tér a J közegben evanescens lesz [33], vagyis:

$$k_{z,J} = ik\sqrt{n_J^2 - N^2} \quad \text{és} \quad r_{F,J} = e^{i\Phi_{F,J}}, \quad \text{ahol}$$

$$\Phi_{F,J} = 2 \arctan\left(i \frac{1-r_{F,J}}{1+r_{F,J}}\right) = -2 \arctan\left(\left(\frac{n_F}{n_J}\right)^{2\rho} \frac{|k_{z,J}|}{k_{z,F}}\right). \quad (59)$$

Négyréteges hullámvezető modellről akkor beszélünk, ha a hullámvezető film felületére egy réteg adszorbeálódik (az adszorbeált réteg törésmutatója n_a , vastagsága d_A), pl. egy fehérje film. Ez a réteg a F és C közé „ékelődik” (31. ábra).



31. ábra A 4 rétegű hullámvezető modellje az egyes rétegek nevével, annak rövidítésével, valamint az egyes rétegek törésmutatójával és vastagságával.

Ebben az esetben a módus egyenlet a következőképpen módosul [33]:

$$\Phi_4 \equiv \pi m = 2k_{z,F}d_F + \Phi_{F,S} + \Phi_{F,A,C}. \quad (60)$$

Az adszorbeálódott réteg következtében a reflexiókoefficiens a következőképpen írható fel [33]:

$$r_{F,A,C} = \frac{r_{F,A} + r_{A,C} e^{2ik_{z,A}d_A}}{1 + r_{F,A} r_{A,C} e^{2ik_{z,A}d_A}}, \quad (61)$$

ahol $k_{z,A} = k\sqrt{n_A^2 - N^2}$ és $r_{F,A}$ valamint $r_{A,C}$ a reflexiókoefficiens a megfelelő határfelületeken. Mivel az elektromágneses tér a fedőrétegben (C) evanescens, ezért az (n+5) egyenletet felírhatjuk így is [33]:

$$r_{F,A,C} = e^{i\Phi_{F,A,C}}, \quad (62)$$

$$\text{ahol } \Phi_{F,A,C} = 2 \arctan\left(i \frac{1-r_{F,A,C}}{1+r_{F,A,C}}\right) = -2 \arctan\left(i \frac{1-r_{F,A}}{1+r_{F,A}} \frac{r_{A,C} e^{2ik_{z,A}d_A}}{r_{A,C} e^{2ik_{z,A}d_A}}\right). \quad (63)$$

Ha azt írjuk, hogy $r_{A,C} = e^{i\Phi_{A,C} - \bar{\Phi}_{A,C}}$ ahol $\bar{\Phi}_{A,C} \geq 0$, mert $|r_{A,C}| = \bar{\Phi}_{A,C} \leq 1$, az (n+7) egyenletet átírhatjuk a következő alakra [33]:

$$\Phi_{F,A,C} = 2 \arctan\left(\left(\frac{n_F}{n_A}\right)^{2\rho} \frac{k_{z,A}}{k_{z,F}} \tan(k_{z,A}d_A + \frac{i\bar{\Phi}_{A,C}}{2})\right). \quad (64)$$

Abban az esetben, ha az elektromágneses tér evanescens, az adszorbeálódott (A) rétegben, azt mondhatjuk az (58) egyenlet segítségével, hogy $\Phi_{A,C}=0$ ha $n_A < n_C$ és $\Phi_{A,C}=\pi$ ha $n_A > n_C$. Felhasználva a $\tanh z = -i \tan(iz)$ a (64) egyenlet a következő alakra hozható [33]:

$$\Phi_{F,A,C} = 2 \arctan\left(\left(\frac{n_F}{n_A}\right)^{2\rho} \frac{|k_{z,A}|}{k_{z,F}} (\tanh(|k_{z,A}|d_A + \frac{\bar{\Phi}_{A,C}}{2}))^\sigma\right), \quad (65)$$

$$\text{ahol } \left(\tanh \frac{\bar{\Phi}_{A,C}}{2}\right)^\sigma = \left(\frac{n_A}{n_C}\right)^{2\rho} \frac{|k_{z,C}|}{|k_{z,A}|} = \left(\frac{n_A}{n_C}\right)^{2\rho} \frac{|k_{z,C}|}{|k_{z,A}|} = \left(\frac{n_A}{n_C}\right)^{2\rho} \sqrt{\frac{N^2 - n_C^2}{N^2 - n_A^2}} \quad (66)$$

és $\sigma = 1$ ha $n_A < n_C$, valamint $\sigma = -1$ ha $n_A > n_C$.

A fenti egyenletek segítségével megmutatható, hogy abban az esetben, ha az adszorbeált réteg vastagsága jóval kisebb, mint a fény hullámhossza, a dolgotatban szereplő (2) egyenlethez ún.

linearizált négyrétegű módus egyenlethez jutunk. A további érzékenységi számolásokhoz ezt az egyenletet használhatjuk fel.

9.5. A hullámvezetők érzékenysége

A háromréteges és a négyréteges linearizált módus egyenletek segítségével meghatározhatjuk a hullámvezető szenzor csip effektív törésmutató-érzékenységét (n_C változása magával vonja az N változását is), valamint az adszorpció miatt bekövetkezett változásokra való érzékenységet is [33].

$\frac{\partial N}{\partial n_C}$ -vel jellemezzük a hullámvezető felületén a fedő médium törésmutató-változására való érzékenységet. Mielőtt még bevezetném a $\frac{\partial N}{\partial n_C}$ érzékenységet, mindenképpen szükséges a vezetett módus teljesítményéről is szót ejteni: P_J ($J=C,S,F$), mely a C, S és F rétegekben terjed [33].

$$P = P_C + P_S + P_F, \quad (67)$$

ahol a P a teljes vezetett módus teljesítménye. A C-ben és S-ben haladó teljesítményt a következőképpen határozhatjuk meg [33]:

$$\frac{P_J}{P} = \frac{n_F^2 - N^2}{n_F^2 - n_J^2} \frac{\Delta Z_{F,J}}{d_{eff}}, \quad (68)$$

ahol $J=C,S$ és d_{eff} a hullámvezető effektív vastagsága:

$$d_{eff} = d_F + \sum_{J=C,S} \Delta Z_{F,J}, \quad (69)$$

és $\Delta Z_{F,J}$ az evaneszcens tér behatolási mélységei a C és S rétegekbe TE és TM módusok esetén:

$$\Delta Z_{F,J}^{(TE)} = \frac{\lambda}{2\pi} \sqrt{N^2 - n_J^2}, \quad (70)$$

$$\Delta Z_{F,J}^{(TM)} = \frac{\frac{\lambda}{2\pi} \sqrt{N^2 - n_J^2}}{\left(\frac{N}{n_F}\right)^2 + \left(\frac{N}{n_J}\right)^2 - 1}. \quad (71)$$

Látható, hogy a hullámvezető effektív vastagsága (d_{eff}) függ a módus polarizációjától. A $\Delta Z_{F,J}$ behatolási mélységet kompaktabb formában is kifejezhető [33]:

$$\Delta Z_{F,J} = \frac{1}{2} \frac{\partial \Phi_{F,J}}{\partial k_{z,F}}. \quad (72)$$

A hullámvezetőben terjedő relatív teljesítmény

$$\frac{P_F}{P} = \frac{1}{d_{eff}} \left(d_F + \sum_{J=C,S} \frac{N^2 - n_J^2}{n_F^2 - n_J^2} \Delta Z_{F,J} \right). \quad (73)$$

A (68) és (73) egyenletek TE és TM módus esetén is érvényesek.

Amennyiben a hullámvezető szenzorunkat a törésmutató (Δn_C) megváltozás mérésére használjuk, az effektív törésmutató-változás az első rendben a következő egyenlettel számolható:[33]

$$\Delta N = \frac{\partial N}{\partial n_C} \Delta n_C. \quad (74)$$

Egy megfelelő $x=(n_S, n_F, n_C, d_F, d_A)$ paraméterű hullámvezető $\frac{\partial N}{\partial n_C}$ érzékenységet a következőképpen kell meghatározni. A kiindulási alap a (58) egyenlet implicit alakja:

$$\Phi[x, N(x)] = 2\pi m. \quad (75)$$

Megkapjuk a $\frac{\partial N}{\partial n_C}$ parciális deriváltat, ha implicit módon deriváljuk a (75) egyenletet, ami azt jelenti, hogy

$$\frac{\partial \Phi}{\partial n_C} + \frac{\partial \Phi}{\partial N} \frac{\partial N}{\partial x} = 0. \quad (76)$$

Amiből következik, hogy:

$$\frac{\partial N}{\partial x} = \frac{-\frac{\partial \Phi}{\partial n_C}}{\frac{\partial \Phi}{\partial N}}. \quad (77)$$

Az (58) és a (72) valamint a $N = \frac{k_x}{k}$ felhasználásával felírható:

$$\frac{\partial \Phi_3}{\partial N} = k \frac{\partial \Phi_1}{\partial k_{z,F}} \frac{dk_{z,F}}{dk_x} = 2kd_{eff} \frac{-k_x}{k_{z,F}}. \quad (78)$$

Ha felhasználjuk a (60) egyenletet a számolásokhoz, akkor a következőt kapjuk [33]:

$$\frac{\partial \Phi_3}{\partial n_C} = \frac{\partial \Phi_{F,C}}{\partial n_C} = k_{z,F} \Delta Z_{F,C} \frac{2n_C}{n_F^2 - n_C^2} \left(2 \left(\frac{N}{n_C}\right)^2 - 1\right)^\rho, \quad (79)$$

ahol $\rho=0$ TE módus és $\rho=1$ TM módus esetén. Ha behelyettesítjük (78) és (79) egyenleteket a (77) egyenletbe, akkor megkapjuk a hullámvezető módusra jellemző érzékenységet [33]:

$$\frac{\partial N}{\partial n_C} = \frac{n_C}{N} \frac{n_F^2 - N^2}{n_F^2 - n_C^2} \frac{\Delta Z_{F,C}}{d_{eff}} \left(2 \left(\frac{N}{n_C}\right)^2 - 1\right)^\rho. \quad (80)$$

A (68) egyenlet segítségével kifejezhetjük az érzékenységet a következőképpen is:

$$\frac{\partial N}{\partial n_C} = \frac{n_C}{N} \frac{P_C}{P} \left(2 \left(\frac{N}{n_C}\right)^2 - 1\right)^\rho. \quad (81)$$

A $\frac{\partial N}{\partial d_A}$ érzékenységet a hullámvezető film (F) és a fedőréteg (C) közé adszorbeálódó molekularétegből származtathatjuk. További fontos feltétel, hogy az adszorbeálódó réteget d_A vastagságúnak és n_A törésmutatójúnak tételezzük fel.

A $\frac{\partial N}{\partial d_A}$ érzékenységet megkapjuk az (58) egyenlet segítségével vékony adszorbeált réteg (A) esetén.

A számítások az előző fejezethez hasonlóak. A (62) egyenletből kiindulva azt találjuk, hogy [33]

$$\left. \frac{\partial \Phi_4}{\partial d_A} \right|_{d_A=0} = \left. \frac{\partial \Phi_{F,A,C}}{\partial d_A} \right|_{d_A=0}, \quad (82)$$

ahol $\frac{\partial \Phi_{F,A,C}}{\partial d_A}$ származtatható a (65) kiterjesztésével, és

$$\left. \frac{\partial \Phi_4}{\partial d_A} \right|_{d_A=0} = \frac{\partial \Phi_3}{\partial N}. \quad (83)$$

A (82) és (83) egyenletek (77) egyenletbe való behelyettesítésével megkapjuk a hullámvezető adszorbeált rétegvastagságra vonatkozó érzékenységet [33].

$$\frac{\partial N}{\partial d_A} = \frac{n_F^2 - N^2}{N d_{eff}} \frac{n_A^2 - n_C^2}{n_F^2 - n_C^2} \left\{ \frac{\left(\frac{N}{n_C}\right)^2 + \left(\frac{N}{n_A}\right)^2 - 1}{\left(\frac{N}{n_C}\right)^2 + \left(\frac{N}{n_F}\right)^2 - 1} \right\}^p \quad (84)$$

ahol TE módus esetén $p=0$, TM módus esetén pedig $p=1$.

A fenti egyenletek segítségével tervezhetjük meg a hullámvezető szenzorunkat, attól függően, hogy milyen típusú érzékelést szeretnénk végezni. Általánosan elmondható, a fenti egyenletek segítségével bizonyítható, hogy a dolgozatomban használt Ta_2O_5 hullámvezetők esetén érdemes a 0. módusokat használni, mivel ezek érzékenysége nagyobb, mint a magasabb rendű módusoké.

10. Köszönetnyilvánítás

Munkám során sok kollegámtól rengeteg segítséget és támogatást kaptam, amiért hálás köszönetemet szeretném a következő pár sorral kifejezni.

Legfőképp köszönettel tartozom Dr. Horváth Róbertnek, témavezetőmnek, akinek a támogatása, tanácsai és végtelen türelme nélkül semmit sem érhettem volna el. Hálával tartozom neki, amiért szinte teljesen ismeretlenül befogadott a kutatásaiba és a bizalmába.

Rendkívül nagy köszönettel tartozom Kaspar Cottiernek, a Creoptix AG igazgatójának, hogy részese lehettem egy fantasztikus jelölésmentes bioszenzor fejlesztésének. Kasparnak külön hálás lehetek, mert eszközökkel, hullámvezető csipekkel és rendkívül sok tanáccsal látta el munkámat.

Köszönetemet szeretném kifejezni a Nanobioszenzorika Lendület Kutatócsoport minden munkatársának. Külön kiemelném Dr. Kurunczi Sándort, akihez bármikor bátran fordulhattam, ha a kutatásaimhoz kapcsolódóan a kémia útvesztőibe kerültem. Nélkülözhetetlennek tartom Hámori András segítségét is, akihez bátran fordulhattam bármilyen problémával, sosem távoztam tőle a segítsége nélkül, amiért hálás vagyok.

Nagy köszönettel tartozom Kovács Boglárkának, Nádor Juditnak és Orgován Norbertnek, amiért segítettek kigyomlálni a disszertációmban található hibákat. Megjegyzéseik ténylegesen növelték a dolgozatom értékét.

Örülök, hogy egy laboratóriumban dolgozhattam Juhász Krisztinával, Kovács Boglárkával, Nádor Judittal, Orgován Norberttel, Péter Beatrixszal és Székács Innával, akik jelenléte nélkül nem lett volna olyan önfeledt a munka a laborban.

Köszönettel tartozom Prof. Bársony Istvánnak és Dr. Pécz Bélának, amiért az MFA-ba befogadtak és ügyes-bajos dolgaiban támogattak.

Köszönettel tartozom Dr. Fried Miklósnak a biztatásért, tanácsaiért és széles körű segítségéért.

Köszönöm Prof. Vonderviszt Ferencnek a tanulmányaim során nyújtott segítségét, szakmai tanácsait. Köszönöm, hogy lehetővé tette számomra, hogy nemzetközi, szakmai konferenciákon részt vehessek.

Köszönet illeti Klein Ágnest, akinek a munkája nélkül nem vizsgálhattam volna *Salmonella* baktériumokat a kutatásaim során.

Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Kellemayer Miklósnak és Mártonfalvi Zsoltnak, amiért lehetőséget biztosítottak a náluk található lézergravírozó használatára, és megtanítottak annak működtetésére.

Köszönöm Prof. Buzás Editnek és Dr. György Bencének, amiért részese lehettem az extracelluláris vezikulákat érintő kutatásaimnak. Köszönöm, hogy kollaborációnk keretében a GCI technikával vizsgálhattam a vezikula mintáikat.

Szeretném megköszönni Plósz Béla konstruktív tanácsait és munkáját a küvették kialakításában és megtervezésében.

Legvégül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni családom, szüleim, nagyszüleim, testvéreim, valamint barátaim támogatását és türelmét. Hálás vagyok biztatásukért és kritikus őszinteségükért a munkámmal kapcsolatban.

11. Saját publikációk jegyzéke

11.1. A disszertációhoz kapcsolódó publikációk

1. Daniel Patko, Kaspar Cottier, Andras Hamori, and Robert Horvath, „Single beam grating coupled interferometry: high resolution miniaturized label-free sensor for plate based parallel screening,” *Optics Express*, Vol. 20, Issue 21, 23162-23173 (2012).
2. D. Patko, B. Gyorgy, A. Nemeth, K. E. Szabó-Taylor, A Kitteld, E. I. Buzas and R Horvath, „Label-free optical monitoring of surface adhesion of extracellularvesicles by grating coupled interferometry” *SENSORS AND ACTUATORS B-CHEMICAL* (ISSN: 0925-4005) 188: pp. 697-701. (2013).
3. Daniel Patko, Zsolt Mártonfalvi, Boglarka Kovacs, Ferenc Vonderviszt, Miklós Kellermayer, Robert Horvath „Microfluidic channels laser-cut in thin double-sided tapes: cost-effective biocompatible fluidics in minutes from design to final integration with optical biochips” *SENSORS AND ACTUATORS B-CHEMICAL*, **196**, 352-356. (2014).

11.2. A disszertációhoz nem kapcsolódó publikációk

1. F. Dortu, H. Egger, K. Kolari, T. Haatainen, P. Furjes, Z. Fekete, D. Bernier, G. Sharp, B. Lahiri, S. Kurunczi, J.-C. Sanchez, N. Turck, P. Petrik, D. Patko, R. Horvath, S.Eiden, T. Aalto, S. Watts, N.P. Johnson, R.M. De La Rue, D. Giannone “Design and process development of a photonic crystal polymer biosensor for point-of-care diagnostics” , SPIE/OSA Biomedical Optics Munich, 22 – 26 May, Session 3: Biospectroscopy and POC Diagnostics I, Paper 8087-10 (2011).
2. Laszlo Korosi, Szilvia Papp, Viktória Hornok, Albert Oszkó, Péter Petrik, Daniel Patko, Robert Horvath, Imre Dékány „Titanate nanotube thin films with enhanced thermal stability and high-transparency prepared from additive-free sols” *Journal of Solid State Chemistry*, vol. 192, 342-352, (2012). IF.: 2.200
3. András Saftics, Emil Agócs, Bálint Fodor, Dániel Patkó, Péter Petrik, Kai Kolari, Timo Aalto, Péter Fürjes, Róbert Horváth, Sándor Kurunczi, „Investigation of thin polymer layers for biosensor applications” *Applied Surface Science*, 281, 66-72, (2013). IF.: 2.538
4. S. Kurunczi, A. Hainard, K. Juhasz, D. Patko, N. Orgovan, N. Turck, J. C. Sanchez and R. Horvath, „Polyethylene imine-based receptor immobilization for label free bioassays” *Sensors and Actuators B*. vol 180, 71-76. (2013). IF.: 3.898
5. N. Kovacs, D. Patko, N. Orgovan, S. Kurunczi, J. J. Ramsden, F. Vonderviszt, R. Horvath, „Optical anisotropy of flagellin layers: in-situ and label-free measurement of adsorbed protein orientation” *Analytical Chemistry* 85, 5382-5389. (2013). IF.: 5.856
6. N. Orgovan, D. Patko, J. J. Ramsden, S. Kurunczi, B. Szabo and R. Horvath „Sample handling in surface sensitive chemical and biological sensing: A practical review of basic fluidics and analyte transport” *Advances in Colloid and Interface Sci.* 211 1–16. (2014) doi:10.1016/j.cis.2014.03.011.a IF.: 8.636
7. I. Székács, Á. Fejes, S. Klátyik, E. Takács, D. Patkó, J. Pomóthy, M. Mörtl, R. Horváth, E. Madarász, B. Darvas, A. Székács „Environmental and Toxicological Impacts of Glyphosate

with Its Formulating Adjuvant” International J. of Biol., Vet., Agric. and Food Eng., 8, 206-211, (2014)

8. B. Peter, S. Kurunczi, D. Patko, I. Lagzi, B. Kowalczyk, Z. Rácz, et al., Label-Free in Situ Optical Monitoring of the Adsorption of Oppositely Charged Metal Nanoparticles., Langmuir. 30, 13478–13482 (2014). doi:10.1021/la5029405. IF.: 4.384

11.3. Konferencia szereplések, előadások

1. D. Patkó, K. Kolari, S. Kurunczi, T. Aalto, R. Horváth „Compact Atomic Layer Deposited Overlayers to Increase Biosensor Stability”, EuroNanoForum, Budapest, 2011. május 30-június 1, poszter
2. D. Patkó, K. Cottier, A. Hámori and R. Horváth, „Label-free optical biosensor with improved stability and sample handling”, EuroNanoForum, Budapest, 2011. május 30-június 1, poszter
3. N. Kovacs, D. Patko, N. Orgovan, S. Kurunczi, A. Vardai, A. Muskotal, F. Vonderviszt, R. Horvath „Adsorption of flagellin based protein layers”, EuroNanoForum, Budapest, 2011. május 30-június 1, poszter
4. N. Orgovan, D. Patko, N. Kovacs, S. Kurunczi, R. Horvath, „Fluid handling in biosensor experiments: OWLS fluidics”, EuroNanoForum, Budapest, 2011. május 30-június 1, poszter
5. V. Szabó, A. Muskotal, B. Tóth, D. Patkó, F. Vonderviszt „A fusion construct of flagellin and 1,4-b-xylanase a development of a xylanase a variant capable of polymerization” 4th European Conference on Chemistry for Life Sciences, Budapest, 2011. augusztus 31- szeptember 3, poszter
6. Kovács Noémi, Patkó Dániel, Orgován Norbert, Kurunczi Sándor, Várdai Attila, Muskotal Adél, Vonderviszt Ferenc, Horváth Róbert „Flagellin alapú fehérje rétegek felületi adszorpciója”, A mi világunk kémiája, Budapest, 2011. november 25., poszter
7. Orgován Norbert, Patkó Dániel, Kovács Noémi, Kurunczi Sándor, Horváth Róbert „Folyadékkezelés OWLS kísérletekben”, A mi világunk kémiája, Budapest, 2011 november 25., poszter
8. Patkó Dániel, Kaspar Cottier, Hámori András, Horváth Róbert „Jelölésmentes interferometrikus optikai bioszenzor referencia csatornával”, A mi világunk kémiája, Budapest, 2011 november 25., poszter
9. D. Patko, A. Hamori, K. Cottier, R. Horvath, „Optical Waveguide Interferometry Based Label-free Biosensor with Improved Characteristics” EurotrodeXI, Barcelona, 2012 április 1-4., poszter
10. Patkó Dániel, Kaspar Cottier és Horváth Róbert „Rácscsatolt interferometrikus bioszenzor alacsony koncentrációk és kis mennyiségek jelölésmentes vizsgálatához” Doffi, Balatonfenyves, 2012. június 15-17., előadás
11. Patkó Dániel, Kaspar Cottier és Horváth Róbert, „Rácscsatolt interferometrián alapuló optikai bioszenzor jelölésmentes vizsgálatokhoz” Kálmán Erika Doktori Konferencia,

Mátraháza, 2012. szeptember 18-20., előadás

12. András Saftics, Emil Agócs, Bálint Fodor, Dániel Patkó, Péter Petrik, Kai Kolari, Timo Aalto, Péter Fürjes, Róbert Horváth, Sándor Kurunczi, „Investigation of thin polymer layers for biosensor applications” E-MRS, Varsó, 2012. szeptember 17-21., poszter
13. Patkó Dániel, „Asztrobiológia, avagy élet a Földön kívül” Kutatók Éjszakája Székesfehérvár 2012. szeptember 29., előadás
14. Daniel Patko, Norbert Orgovan, Noemi Kovacs, Eniko Farkas, Agnes Klein, Boglarka Kovacs, Aron Horvath, Krisztina Juhasz, Noemi Varga, Sandor Kurunczi, Kaspar Cottier, Balint Szabo, Gabor Mezo, Jeremy Ramsden, Ferenc Vonderviszt and Robert Horvath, „Label-free optical monitoring of the self-assembly of functional nanofilms and living cell behavior on the deposited layers” Label-Free Technologies: Advances and Applications, Amszterdam, 2012. november 1-3., poszter
15. K. Cottier, R. Weibel, R. Gianotti, D. Patko, R. Horvath, C. Zaborosch, „Next-Generation high sensitivity waveguide interferometry instruments” Label-Free Technologies: Advances and Applications, Amszterdam, 2012, november 1-3. előadás
16. Daniel Patko, Boglarka Kovacs, Eniko Farkas, Beatrix Peter, Sandor Kurunczi, Kaspar Cottier, Agnes Klein, Ferenc Vonderviszt and Robert Horvath, „High resolution optical waveguide interferometer for label-free studies of living bacterial cells” Bio-Sensing and Technology, Sitges/Spanyolország, 2013. május 12-15. poszter
17. J. Nador, D. Patko, N. Orgovan, B. Peter, L. Korosi, M. Fried, P. Petrik, R. Horvath „Nanostructured Biosensor Coatings Using Titanate Nanotubes”, Bio-Sensing and Technology, Sitges/Spanyolország, 2013. május 12-15. poszter
18. Daniel Patko, Boglarka Kovacs, Beatrix Peter, Kaspar Cottier, Agnes Klein, Ferenc Vonderviszt, Laszlo Korosi, Tamas Kovacs, Robert Horvath, „Label-free optical sensor for monitoring biological particles” Biological Surfaces and Interfaces, Sant Feliu de Guixols/Spanyolország, 2013. június 30-július 5. poszter
19. Patkó Dániel, Kovács Boglárka, Péter Beatrix, Kaspar Cottier, Vonderviszt Ferenc, Kőrösi László, Kovács Tamás és Horváth Róbert, „Nagy érzékenységű optikai szenzor biológiai részecskék jelölésmentes vizsgálatára” Magyar Biofizikai Társaság XXIV. Kongresszus, Veszprém, 2013. augusztus 27-30. Poszter
20. Patkó Dániel, „Égitestek szerepe az életünkben, a napenergia és a bioenergia kapcsolata.”, Kutatók Éjszakája Székesfehérvár 2013. szeptember 27., előadás
21. Patkó Dániel, „Nagy érzékenységű, kétcsatornás, interferometrikus bioszenzor fejlesztése és alkalmazási lehetőségei” MTA-TTK-MFA szeminárium, Budapest MTA-TTK-MFA, 2013. december 11. szemináriumi előadás
22. Daniel Patko, Zsolt Martonfalvi, Boglarka Kovacs, Ferenc Vonderviszt, Miklos Kellermayer and Robert Horvath, „Rapid microfluidic channel design and fabrication in double sided biocompatible tapes: room temperature integration with optical biosensors” Europtrode XII, Athén/Görögország, 2014. április 13-16. Poszter
23. Patkó Dániel „Jelölésmentes optikai bioszenzorok” Kutatók Éjszakája, Székesfehérvár, 2014.

szeptember 26., előadás

24. Patkó Dániel „Biorezonancia és bioenergia, avagy miben különbözik az élő az élettelenről?” Szkeptikusok XX. Országos Konferenciája, 2014. november 15. előadás
25. Patkó Dániel, „Rácsatolt interferometrián alapuló optikai bioszenzor: fejlesztés és alkalmazás” Kálmán Erika Doktori Konferencia, Budapest 2014. December 17-19. előadás
26. Patkó Dániel, Kovács Boglárka, Gál Gabriella, Klein Ágnes, Kurunczi Sándor, Vonderviszt Ferenc, Horváth Róbert „Baktériumok jelölésmentes vizsgálata interferometrikus optikai bioszenzorral” 45. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg 2015. május 19-22. előadás

12. Irodalomjegyzék

- [1] D. Patko, K. Cottier, A. Hamori, R. Horvath, Single beam grating coupled interferometry: high resolution miniaturized label-free sensor for plate based parallel screening, *Opt. Express*. 20 (2012) 23162–23173. doi:10.1364/OE.20.023162.
- [2] D. Patko, Z. Mártonfalvi, B. Kovacs, F. Vonderviszt, M. Kellermayer, R. Horvath, Microfluidic channels laser-cut in thin double-sided tapes: Cost-effective biocompatible fluidics in minutes from design to final integration with optical biochips, *Sensors Actuators B Chem*. 196 (2014) 352–356. doi:10.1016/j.snb.2014.01.107.
- [3] D. Patko, B. Gyorgy, A. Nemeth, K.E. Szabó-Taylor, A. Kittel, E.I. Buzas, et al., Label-free optical monitoring of surface adhesion of extracellular vesicles by grating coupled interferometry, *Sensors Actuators B Chem*. 188 (2013) 697–701. doi:10.1016/j.snb.2013.07.035.
- [4] <http://www.jaist.ac.jp/~yokoyama/biosensor.html>, (n.d.).
- [5] www.tankonyvtar.hu, (n.d.).
- [6] http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/0011_1A_3D_hu_book/ch01s10.html, (n.d.).
- [7] Y.L. Leung, S.A. Burr, *Encyclopedia of Toxicology*, Elsevier, 2014. doi:10.1016/B978-0-12-386454-3.00701-6.
- [8] A.G.P. Ross, R.M. Olveda, L. Yuesheng, Are we ready for a global pandemic of Ebola virus?, *Int. J. Infect. Dis.* 28 (2014) 217–218. doi:10.1016/j.ijid.2014.09.001.
- [9] J. Reppy, A biomedical military–industrial complex?, *Technovation*. 28 (2008) 802–811. doi:10.1016/j.technovation.2008.09.004.
- [10] N. Orgovan, R. Salánki, N. Sándor, Z. Bajtay, A. Erdei, B. Szabó, et al., In-situ and label-free optical monitoring of the adhesion and spreading of primary monocytes isolated from human blood: dependence on serum concentration levels, *Biosens. Bioelectron.* (2013). doi:10.1016/j.bios.2013.10.076.
- [11] N. Kovacs, D. Patko, N. Orgovan, S. Kurunczi, J.J. Ramsden, F. Vonderviszt, et al., Optical anisotropy of flagellin layers: in situ and label-free measurement of adsorbed protein orientation using OWLS., *Anal. Chem.* 85 (2013) 5382–9. doi:10.1021/ac3034322.
- [12] Y. Fang, A.M. Ferrie, N.H. Fontaine, J. Mauro, J. Balakrishnan, Resonant waveguide grating biosensor for living cell sensing., *Biophys. J.* 91 (2006) 1925–40. doi:10.1529/biophysj.105.077818.
- [13] M.A. Liebert, Ye Fang, 4 (2006).
- [14] B.A. Forbes, D.F. Sahm, A.S. Weissfeld, *Diagnostic Microbiology*, in: *Diagnostic Microbiol.*, Mosby, 1998.

- [15] ELISA
http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/en/ch/25/orgentec/autoimmundiagnostik.vlu/Page/vsc/en/ch/25/orgentec/diagnostik_elisa_varianten_en.vscml.html, (n.d.).
- [16] C.M. Niemeyer, M. Adler, R. Wacker, Immuno-PCR: high sensitivity detection of proteins by nucleic acid amplification., *Trends Biotechnol.* 23 (2005) 208–16.
 doi:10.1016/j.tibtech.2005.02.006.
- [17] M. Minunni, M. Mascini, G.G. Guilbault*, B. Hock, The Quartz Crystal Microbalance as Biosensor. A Status Report on Its Future, *Anal. Lett.* 28 (1995) 749–764.
 doi:10.1080/00032719508001422.
- [18] C.M. Lieber, Nanowire nanosensors, (2005) 20–28.
- [19] J. Homola, S.S. Yee, G. Gauglitz, Surface plasmon resonance sensors: review, *Sensors Actuators B Chem.* 54 (1999) 3–15. doi:10.1016/S0925-4005(98)00321-9.
- [20] F. Vollmer, S. Arnold, Whispering-gallery-mode biosensing : label- free detection down to single molecules, 5 (2008) 591–596. doi:10.1038/NMETH.1221.
- [21] J. Voros, J.J. Ramsden, G. Csucs, I. Szendro, S.M. De Paul, M. Textor, et al., Optical grating coupler biosensors, *Biomaterials.* 23 (2002) 3699–3710.
- [22] N. Orgovan, B. Kovacs, E. Farkas, B. Szabó, N. Zaytseva, Y. Fang, et al., Bulk and surface sensitivity of a resonant waveguide grating imager, *Appl. Phys. Lett.* 104 (2014) 083506.
 doi:10.1063/1.4866460.
- [23] M.C. Estevez, M. Alvarez, L.M. Lechuga, Integrated optical devices for lab-on-a-chip biosensing applications, *Laser Photon. Rev.* 6 (2012) 463–487. doi:10.1002/lpor.201100025.
- [24] [Http://www.nature.com/nphoton/journal/v4/n1/fig_tab/nphoton.2009.243_F1.html](http://www.nature.com/nphoton/journal/v4/n1/fig_tab/nphoton.2009.243_F1.html), Gyűrű rezonátor, (n.d.).
- [25] J. Homola, Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological species., *Chem. Rev.* 108 (2008) 462–93. doi:10.1021/cr068107d.
- [26] W. Lukosz, Principles and sensitivities of integrated optical and surface plasmon sensors for direct affinity sensing and immunosensing, *Biosens. Bioelectron.* 6 (1991) 215–225.
 doi:10.1016/0956-5663(91)80006-J.
- [27] W. Huber, R. Barner, C. Fattinger, J. Hübscher, H. Koller, F. Müller, et al., Direct optical immunosensing (sensitivity and selectivity), *Sensors Actuators B Chem.* 6 (1992) 122–126.
 doi:10.1016/0925-4005(92)80042-V.
- [28] X. Fan, I.M. White, S.I. Shopova, H. Zhu, J.D. Suter, Y. Sun, Sensitive optical biosensors for unlabeled targets : A review, 0 (2008) 8–26. doi:10.1016/j.aca.2008.05.022.
- [29] S. Kurunczi, A. Hainard, K. Juhasz, D. Patko, N. Orgovan, N. Turck, et al., Polyethylene imine-based receptor immobilization for label free bioassays, *Sensors Actuators B Chem.* 181 (2013) 71–76.

- [30] R. Horváth, L.R. Lindvold, N.B. Larsen, Reverse-symmetry waveguides: theory and fabrication, *Appl. Phys. B Lasers Opt.* 74 (2002) 383–393. doi:10.1007/s003400200823.
- [31] R. Horvath, H.C. Pedersen, N. Skivesen, C. Svanberg, N.B. Larsen, Fabrication of reverse symmetry polymer waveguide sensor chips on nanoporous substrates using dip-floating, *J. Micromechanics Microengineering.* (2005) 1260–1264.
- [32] R. Horvath, H.C. Pedersen, N. Skivesen, D. Selmeczi, N.B. Larsen, Monitoring of living cell attachment and spreading using reverse symmetry waveguide sensing, *Appl. Phys. Lett.* 86 (2005) 071101. doi:10.1063/1.1862756.
- [33] K. Tiefenthaler, W. Lukosz, Sensitivity of grating couplers as integrated-optical chemical sensors, *J. Opt. Soc. Am. B.* 6 (1989) 209. doi:10.1364/JOSAB.6.000209.
- [34] J.A. De Feijter, J. Benjamins, F.A. Veer, Ellipsometry as a tool to study the adsorption behavior of synthetic and biopolymers at the air-water interface, *Biopolymers.* 17 (1978) 1759–1772. doi:10.1002/bip.1978.360170711.
- [35] Y. Fang, Label-Free Receptor Assays., *Drug Discov. Today. Technol.* 7 (2011) e5–e11. doi:10.1016/j.ddtec.2010.05.001.
- [36] D. Patko, B. Gyorgy, a. Nemeth, K.E. Szabó-Taylor, a. Kittel, E.I. Buzas, et al., Label-free optical monitoring of surface adhesion of extracellular vesicles by grating coupled interferometry, *Sensors Actuators B Chem.* 188 (2013) 697–701. doi:10.1016/j.snb.2013.07.035.
- [37] M. a Cooper, Optical biosensors in drug discovery., *Nat. Rev. Drug Discov.* 1 (2002) 515–28. doi:10.1038/nrd838.
- [38] J.P. Chambers, B.P. Arulanandam, L.L. Matta, A. Weis, J.J. Valdes, Biosensor recognition elements., *Curr. Issues Mol. Biol.* 10 (2008) 1–12.
- [39] T. Sampson, Aptamers and SELEX: the technology, *World Pat. Inf.* 25 (2003) 123–129. doi:10.1016/S0172-2190(03)00035-8.
- [40] Antitest.
http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/0011_2A_6_modul/1150/index.html, (n.d.).
- [41] J.-O. Lee, H.-M. So, E.-K. Jeon, H. Chang, K. Won, Y.H. Kim, Aptamers as molecular recognition elements for electrical nanobiosensors., *Anal. Bioanal. Chem.* 390 (2008) 1023–32. doi:10.1007/s00216-007-1643-y.
- [42] R. Horvath, K. Cottier, H.C. Pedersen, J.J. Ramsden, Multidepth screening of living cells using optical waveguides, *Biosens. Bioelectron.* 24 (2008) 799–804. doi:10.1016/j.bios.2008.06.059.
- [43] K. Cottier, R. Horvath, Imageless microscopy of surface patterns using optical waveguides, *Appl. Phys. B Lasers Opt.* 91 (2008) 319–327. doi:10.1007/s00340-008-2994-6.
- [44] K. Cottier, Integrated optical sensor, patent US 8325347 B2, 2012.

- [45] P. Kozma, A. Hámori, S. Kurunczi, K. Cottier, R. Horvath, Grating coupled optical waveguide interferometer for label-free biosensing, *Sensors Actuators B Chem.* 155 (2011) 446–450. doi:10.1016/j.snb.2010.12.045.
- [46] P. Kozma, A. Hamori, K. Cottier, S. Kurunczi, R. Horvath, Grating coupled interferometry for optical sensing, *Appl. Phys. B.* 97 (2009) 5–8. doi:10.1007/s00340-009-3719-1.
- [47] H.K. Hunt, A.M. Armani, Label-free biological and chemical sensors., *Nanoscale.* 2 (2010) 1544–59. doi:10.1039/c0nr00201a.
- [48] J. Ramsden, *Biomedical Surfaces*, (2007).
- [49] M. Malmsten, *Biopolymers at interfaces*, (2003).
- [50] S.K. Mitra, S. Chakraborty, *Microfluidics and Nanofluidics Handbook: Fabrication, Implementation, and Applications*, 2011.
- [51] J.D. Wang, N.J. Douville, S. Takayama, M. ElSayed, Quantitative analysis of molecular absorption into PDMS microfluidic channels., *Ann. Biomed. Eng.* 40 (2012) 1862–73. doi:10.1007/s10439-012-0562-z.
- [52] V. Chokkalingam, B. Weidenhof, M. Krämer, W.F. Maier, S. Herminghaus, R. Seemann, Optimized droplet-based microfluidics scheme for sol-gel reactions., *Lab Chip.* 10 (2010) 1700–5. doi:10.1039/b926976b.
- [53] W. Lukosz, Integrated optical chemical and direct biochemical sensors, *Sensors Actuators B. Chem.* 29 (1995) 37–50.
- [54] The web page of Microwacuum Ltd. www.microwacuum.com, (n.d.).
- [55] S. Kurunczi, a. Hainard, K. Juhasz, D. Patko, N. Orgovan, N. Turck, et al., Polyethylene imine-based receptor immobilization for label free bioassays, *Sensors Actuators B Chem.* 181 (2013) 71–76. doi:10.1016/j.snb.2012.12.097.
- [56] A. Lionello, J. Jossierand, H. Jensen, H.H. Girault, Dynamic protein adsorption in microchannels by “stop-flow” and continuous flow., *Lab Chip.* 5 (2005) 1096–103. doi:10.1039/b506009e.
- [57] a Kittel, a Falus, E. Buzás, Microencapsulation technology by nature: Cell derived extracellular vesicles with therapeutic potential., *Eur. J. Microbiol. Immunol. (Bp).* 3 (2013) 91–96. doi:10.1556/EuJMI.3.2013.2.1.
- [58] B. György, T.G. Szabó, M. Pásztói, Z. Pál, P. Misják, B. Aradi, et al., Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles., *Cell. Mol. Life Sci.* 68 (2011) 2667–88. doi:10.1007/s00018-011-0689-3.
- [59] G. Raposo, W. Stoorvogel, Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends., *J. Cell Biol.* 200 (2013) 373–83. doi:10.1083/jcb.201211138.
- [60] S. Szanyi, S. Békási, Z. Szabó, K. Pálóczi, É. Pállinger, S. Tóth, et al., Do microvesicles represent potential novel diagnostic markers in pancreatic cancer?, *Pancreatology.* 12 (2012) 551. doi:10.1016/j.pan.2012.11.169.

- [61] A.L.S. Revenfeld, R. Bæk, M.H. Nielsen, A. Stensballe, K. Varming, M. Jørgensen, Diagnostic and Prognostic Potential of Extracellular Vesicles in Peripheral Blood., *Clin. Ther.* 36 (2014) 830–846. doi:10.1016/j.clinthera.2014.05.008.
- [62] T. Wurdinger, N.N. Gatson, L. Balaj, B. Kaur, X.O. Breakefield, D.M. Pegtel, Extracellular vesicles and their convergence with viral pathways., *Adv. Virol.* 2012 (2012) 767694. doi:10.1155/2012/767694.
- [63] B. György, Z. Fitzpatrick, M.H.W. Crommentuijn, D. Mu, C.A. Maguire, Naturally enveloped AAV vectors for shielding neutralizing antibodies and robust gene delivery in vivo., *Biomaterials.* 35 (2014) 7598–609. doi:10.1016/j.biomaterials.2014.05.032.
- [64] C.I. Timár, A.M. Lorincz, R. Csépanyi-Kömi, A. Vályi-Nagy, G. Nagy, E.I. Buzás, et al., Antibacterial effect of microvesicles released from human neutrophilic granulocytes., *Blood.* 121 (2013) 510–8. doi:10.1182/blood-2012-05-431114.
- [65] A. Clayton, A. Turkes, S. Dewitt, R. Steadman, M.D. Mason, M.B. Hallett, Adhesion and signaling by B cell-derived exosomes: the role of integrins., *FASEB J.* 18 (2004) 977–9. doi:10.1096/fj.03-1094fje.
- [66] R.B. Koumangoye, A.M. Sakwe, J.S. Goodwin, T. Patel, J. Ochieng, Detachment of breast tumor cells induces rapid secretion of exosomes which subsequently mediate cellular adhesion and spreading., *PLoS One.* 6 (2011) e24234. doi:10.1371/journal.pone.0024234.
- [67] A. Janowska-Wieczorek, M. Wysoczynski, J. Kijowski, L. Marquez-Curtis, B. Machalinski, J. Ratajczak, et al., Microvesicles derived from activated platelets induce metastasis and angiogenesis in lung cancer., *Int. J. Cancer.* 113 (2005) 752–60. doi:10.1002/ijc.20657.
- [68] B. György, K. Módos, E. Pállinger, K. Pálóczi, M. Pásztói, P. Misják, et al., Detection and isolation of cell-derived microparticles are compromised by protein complexes resulting from shared biophysical parameters., *Blood.* 117 (2011) e39–48. doi:10.1182/blood-2010-09-307595.
- [69] A.S. Leroyer, P.-E. Rautou, J.-S. Silvestre, Y. Castier, G. Lesèche, C. Devue, et al., CD40 ligand+ microparticles from human atherosclerotic plaques stimulate endothelial proliferation and angiogenesis a potential mechanism for intraplaque neovascularization., *J. Am. Coll. Cardiol.* 52 (2008) 1302–11. doi:10.1016/j.jacc.2008.07.032.
- [70] M.E.T. Tesselaar, F.P.H.T.M. Romijn, I.K. Van Der Linden, F.A. Prins, R.M. Bertina, S. Osanto, Microparticle-associated tissue factor activity: a link between cancer and thrombosis?, *J. Thromb. Haemost.* 5 (2007) 520–7. doi:10.1111/j.1538-7836.2007.02369.x.
- [71] E. van der Pol, A.N. Böing, P. Harrison, A. Sturk, R. Nieuwland, Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles., *Pharmacol. Rev.* 64 (2012) 676–705. doi:10.1124/pr.112.005983.
- [72] B.E.A. Saleh, M.C. Tiech, *Fundamentals of Photonics*, Wiley Interscience, n.d.
- [73] J.D. Jackson, *Klasszikus elektrodinamika*, 2nd ed., Typotex, Budapest, 2004.