



Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

Σχολή Επιστημών Τροφίμων

Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

### ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών με την χρήση νανοσωματιδίων χρυσού

BSc Thesis

Detection of pathogenic microorganisms by using golden nanoparticles

### ΟΝΟΜΑΤΑ ΦΟΙΤΗΤΩΝ / NAMES OF STUDENTS

Θεριανός Θεοφάνης / Therianos Theofanis 17024

Κωνσταντικάκης Δημήτριος / Konstantikakis Dimitrios 17048

### ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΡΙΑΣ / NAME OF THE SUPERVISOR

Χούχουλα Δήμητρα / Houhoula Dimitra

ΑΙΓΑΛΕΩ, ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2024 / AIGALEO, OCTOBER 2024



## Επιτροπή Αξιολόγησης

Οι υπογράφωντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει τη πτυχιακή διπλωματική εργασία με τίτλο «Αξιολόγηση αντιμικροβιακής δράσης αιθέριων ελαίων φυτών» που παρουσιάστηκε από τους Θεριανός Θεοφάνης / Κωσταντικάκης Δημήτριος, υποψήφιοι για τον πτυχιακό τίτλο σπουδών στην Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

α/α	Ονοματεπώνυμο	Βαθμίδα/Ιδιότητα	Ψηφιακή Υπογραφή
1.	Χούχουλα Δήμητρα	Καθηγήτρια και Αντιπρόεδρος του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων	
2.	Μπατρίνου Ανθιμία	Επίκουρη Καθηγήτρια του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων	
3.	Τσακάλη Ευσταθία	Επίκουρη Καθηγήτρια του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων	

## Δήλωση περί λογοκλοπής/Copyright

Οι κάτωθι υπογεγραμμένοι Θεριανός Θεοφάνης του Νικολάου με αριθμό μητρώου 17024 Κωνσταντικάκης Δημήτριος του Ιωάννη με αριθμό μητρώου 17048 φοιτητές του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, δηλώνουμε υπεύθυνα ότι:

«Είμαστε συγγραφείς αυτής της διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχαμε για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες κάναμε χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς, είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνουμε ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από εμάς αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μας, όσο και του Ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μας ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μας».

Θεριανός Θεοφάνης



Κωνσταντικάκης Δημήτριος



## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Ευχαριστούμε αρχικώς την επιβλέπουσα καθηγήτρια μας, Δήμητρα Χούχουλα, για την εμπιστοσύνη και την αποδοχή της να συνεργαστούμε μαζί στο θέμα της πτυχιακής μας, για τις γνώσεις και το χρόνο που μας μεταλαμπάδευσε σε όλο αυτό το διάστημα της συνεργασίας μας. Γνώσεις και συμβουλές όχι όμως μόνο στο θέμα της εργασίας μας, αλλά στο θέμα της επιμονής που πρέπει έχουμε στη ζωή μας να παλεύουμε για τους στόχους μας. Αξιοσημείωτη ήταν φυσικά η κατεύθυνση που μας έδωσε στο διάστημα αυτό για την ομαλή και σωστή διεκπεραίωση της πτυχιακής μας, στο πλαίσιο της πειραματικής διαδικασίας, καθώς και κατά την συγγραφή του κειμένου. Τέλος, θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε συγγενείς και φίλους για την υποστήριξη τους στο σύνολο της ακαδημαϊκής μας πορείας.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ</b> .....	5
<b>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ</b> .....	6
<b>ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ</b> .....	8
<b>ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ</b> .....	9
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	10
<b>ABSTRACT</b> .....	11
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	12
<b>1. ΤΟ ΓΕΝΕΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ</b> .....	15
1.1. Η Ανακάλυψη του Γενετικού Υλικού .....	15
1.2. Η Δομή και η Λειτουργία του DNA .....	16
1.3. Το Κεντρικό Δόγμα της Βιολογίας .....	18
1.3.1. Η αντιγραφή του DNA .....	18
1.3.2. Η μεταγραφή του DNA σε mRNA .....	19
1.3.3. Η μετάφραση του DNA σε πρωτεΐνη .....	20
1.4. Ο Εντοπισμός του Γενετικού Υλικού .....	21
<b>2. ΤΑ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ ΧΡΥΣΟΥ</b> .....	24
2.1. Η Ανακάλυψη των Νανοσωματιδίων Χρυσού .....	24
2.2. Τα Είδη και η Δομή των Νανοσωματιδίων Χρυσού .....	24
2.3. Οι Ιδιότητες των Νανοσωματιδίων Χρυσού .....	26
2.4. Οι Χρήσεις των Νανοσωματιδίων Χρυσού .....	29
2.5. Η Εφαρμογή των Νανοσωματιδίων Χρυσού για τον Εντοπισμό Βιομορίων .....	30
<b>3. ΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ</b> .....	32
3.1. Τί Είναι οι Μικροοργανισμοί .....	32
3.2. Οι Κατηγορίες των Μικροοργανισμών .....	32
3.3. Η Λοίμωξη .....	33
3.4. Οι Παθογόνοι Μικροοργανισμοί που Χρησιμοποιήθηκαν στην Παρούσα Εργασία .....	34
3.4.1. Η Salmonella Enteritidis .....	34
3.4.2. Ο Bacillus Cereus .....	35
3.4.3. Η Klebsiella Pneumoniae .....	36
3.4.4. Η Escherichia Coli .....	36
3.4.5. Η Candida Albicans .....	37
<b>ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ</b> .....	38
Ο Σκοπός της Παρούσας Εργασίας .....	38

Ο Βασικός Πειραματικός Άξονας που Ακολουθήθηκε στην Παρούσα Εργασία.....	38
Το πρώτο μέρος του πειράματος: .....	38
Το δεύτερο μέρος του πειράματος: .....	39
Το τρίτο μέρος του πειράματος:.....	40
Τα Υλικά που Χρησιμοποιήθηκαν στην Παρούσα Εργασία .....	40
Τα Πειράματα που έγιναν Αναλυτικά ανά Ημερομηνία .....	42
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b> .....	51
<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b> .....	78
<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b> .....	80
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	81

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1 Τα νανοσωματίδια χρυσού που χρησιμοποιήθηκαν.....	41
Πίνακας 2 οι ακολουθίες βάσεων, η θερμοκρασία τήξης και το μέγεθος των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για τους εκκινητές .....	41
Πίνακας 3. Προσθήκη HCl .....	46
Πίνακας 4 Προσθήκη HCl .....	46
Πίνακας 5 Προσθήκη HCl .....	47
Πίνακας 6 Προσθήκη HCl .....	47
Πίνακας 7 Ποσότητα HCL .....	48
Πίνακας 8 Ποσότητα HCL .....	48
Πίνακας 9 Αποτελέσματα 22/10/2023 .....	51
Πίνακας 10 Αποτελέσματα 22/10/2023 .....	51
Πίνακας 11 Αποτελέσματα 23/10/2023 .....	54
Πίνακας 12 Αποτελέσματα 23/10/2023 .....	55
Πίνακας 13 Αποτελέσματα 24/10/2023 .....	56
Πίνακας 14 Αποτελέσματα 27/10/2023 .....	57
Πίνακας 15 Αποτελέσματα 30/10/2023 .....	59
Πίνακας 16 Αποτελέσματα 31/10/2023 .....	60
Πίνακας 17 Αποτελέσματα 17/1/2024 .....	62
Πίνακας 18 Αποτελέσματα 21/1/2024 .....	63
Πίνακας 19 Αποτελέσματα 21/1/2024 .....	63
Πίνακας 20 Αποτελέσματα 3/2/2024 .....	67
Πίνακας 21 Αποτελέσματα 3/3/2024 .....	67
Πίνακας 22 Αποτελέσματα 3/3/2024 .....	68
Πίνακας 23 Αποτελέσματα 7/3/2024 .....	69
Πίνακας 24 Αποτελέσματα 7/3/2024 .....	69
Πίνακας 25 Αποτελέσματα 7/3/2024 .....	70
Πίνακας 26 Αποτελέσματα 7/3/2024 .....	70
Πίνακας 27 Αποτελέσματα 3/2/2024 .....	71
Πίνακας 28 Αποτελέσματα 9/3/2024 .....	72
Πίνακας 29 Αποτελέσματα 12/3/2024 .....	73
Πίνακας 30 Αποτελέσματα 28/3/2024 .....	74
Πίνακας 31 Αποτελέσματα 17/4/2024 .....	75
Πίνακας 32 Αποτελέσματα 17/4/2024 .....	75
Πίνακας 33 Αποτελέσματα 17/4/2024 .....	76



## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

<b>Εικόνα 1</b> Η δομή του DNA (Cano Londoño et al., 2020).....	17
<b>Εικόνα 2</b> Το κεντρικό δόγμα της μοριακής βιολογίας (Μουλιού, 2022).....	18
<b>Εικόνα 3</b> Η PCR (Alberts, 2014). ....	23
<b>Εικόνα 4</b> Τα είδη των AuNPs βάσει του σχήματος και της μορφολογίας τους (Hossain et al., 2022). ....	25
<b>Εικόνα 5.</b> Η σκόνη γάλακτος 15/3/2024.....	49
<b>Εικόνα 6</b> Καμπύλη απορρόφησης 22/10/2023.....	53
<b>Εικόνα 7</b> Δείγματα 22/10/2023.....	53
<b>Εικόνα 8</b> Δείγματα 23/10/2023.....	54
<b>Εικόνα 9</b> Αποτελέσματα 23/10/2023.....	55
<b>Εικόνα 10</b> Δείγματα 23/10/2023.....	56
<b>Εικόνα 11</b> Αποτελέσματα 24/10/2023.....	57
<b>Εικόνα 12</b> Αποτελέσματα 27/10/2023.....	58
<b>Εικόνα 13</b> Αποτελέσματα 30/10/2023.....	59
<b>Εικόνα 14</b> Αποτελέσματα 31/10/2023.....	60
<b>Εικόνα 15</b> Αποτελέσματα 31/10/2023.....	61
<b>Εικόνα 16</b> Αποτελέσματα 1/15/2024.....	62
<b>Εικόνα 17</b> Αποτελέσματα 17/1/2024.....	63
<b>Εικόνα 18</b> Αποτελέσματα 21/1/2024.....	64
<b>Εικόνα 19</b> Αποτελέσματα 22/1/2024.....	65
<b>Εικόνα 20</b> Αποτελέσματα 22/1/2024.....	65
<b>Εικόνα 21</b> Αποτελέσματα 22/1/2024.....	66
<b>Εικόνα 22</b> Αποτελέσματα 22/1/2024.....	66
<b>Εικόνα 23</b> Αποτελέσματα 22/1/2024.....	67
<b>Εικόνα 24</b> Αποτελέσματα 3/3/2024.....	69
<b>Εικόνα 25</b> Αποτελέσματα 7/3/2024.....	71
<b>Εικόνα 26</b> Αποτελέσματα 9/3/2024.....	71
<b>Εικόνα 27</b> Αποτελέσματα 9/3/2024.....	72
<b>Εικόνα 28</b> Αποτελέσματα 9/3/2024.....	72
<b>Εικόνα 29</b> Αποτελέσματα 9/3/2024.....	73
<b>Εικόνα 30</b> Αποτελέσματα 28/3/2024.....	74
<b>Εικόνα 31</b> Αποτελέσματα 17/4/2024.....	75
<b>Εικόνα 32</b> Αποτελέσματα 17/4/2024.....	76
<b>Εικόνα 33</b> Αποτελέσματα 17/4/2024.....	77

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα μελέτη έγινε επάνω στην χρήση των νανοσωματιδίων χρυσού για τον εντοπισμό παθογόνων μικροοργανισμών. Τα εν λόγω νανοσωματίδια έχουν σημαντικές ιδιότητες που τα καθιστούν πολύτιμα σε πολλές επιστημονικές και άλλες εφαρμογές, όπως η χρήση τους στις βιοεπιστήμες και η εφαρμογή τους για τον εντοπισμό βιομορίων, όπως το γενετικό υλικό. Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί διερευνήθηκαν μέσα από κλινικά δείγματα για τον εντοπισμό του γενετικού τους υλικού στην παρούσα εργασία είναι η *Salmonella Enteritidis* και ο *Bacillus Cereus* ενώ κάποιοι άλλοι χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες. Σε πρώτη φάση, δημιουργήθηκε το διάλυμα νανοσωματιδίων χρυσού και εκκινητών για τους μικροοργανισμούς - στόχους *Salmonella Enteritidis* και *Bacillus Cereus*. Στη συνέχεια απομονώθηκε το DNA των στόχων και μετρήθηκε, και τέλος ακολούθησε η δοκιμασία με HCl για την παρατήρηση των τελικών αποτελεσμάτων. Η μικρότερη ανιχνεύσιμη ποσότητα DNA για την *Salmonella Enteritidis* ήταν 0,01ng , σε πείραμα που έγινε με αρκετές αραιώσεις. Η αποδιαταξη του DNA έγινε στους 95 °C για 5 λεπτά και ο υβριδισμός στους 58 °C για 20 λεπτά. Κατά την προσθήκη HCl παρατηρήθηκαν θετικά αποτελέσματα στα 5,7μl. Για τον *Bacillus Cereus* η μικρότερη ποσότητα DNA που ανιχνεύθηκε ήταν 11,2ng . Η αποδιαταξη έγινε στην ίδια θερμοκρασία αλλά για 10 λεπτά και ο υβριδισμός στους 56 °C για 20 λεπτά, ενώ προστέθηκαν 5μl HCl για να παρατηρήσουμε αλλαγή χρώματος. Έτσι, βάσει αυτών των πειραμάτων συνιστούμε να ακολουθούνται αυτές οι παράμετροι σε νέα πειράματα.

**Λέξεις – Κλειδιά:** νανοσωματίδια χρυσού, ανίχνευση μικροοργανισμών, υβριδισμός, πλασμονική απορρόφηση, χρωματογραφική αλλαγή, εκκινητές

## **ABSTRACT**

The present study was done on the use of golden nanoparticles for the detection of pathogenic microorganisms. These nanoparticles have important properties that make them valuable in many scientific and other applications, such as their use in the life sciences and their application in locating biomolecules such as genetic material. The pathogenic microorganisms investigated through clinical samples to identify their genetic material in the present work are Salmonella Enteritidis and Bacillus Cereus while some others were used as negative controls. In the first phase, the solution of gold nanoparticles and primers was created for the target microorganisms Salmonella Enteritidis and Bacillus Cereus. The DNA of the targets was then isolated and measured, followed by the HCl assay to observe the final results. The lowest detectable amount of DNA for Salmonella enteritidis was 0.01ng, in an experiment with several dilutions. DNA desegregation was performed at 95 °C for 5 min and hybridization at 58 °C for 20 min. Upon addition of HCl results were observed at 5.7µl. For Bacillus cereus the smallest amount of DNA detected was 11.2ng. The desegregation was done at the same temperature but for 10min and hybridization at 56°C for 20min and 5µl of HCl was added to observe color change. Thus, based on these experiments we recommend following these parameters in new experiments.

**Keywords:** golden nanoparticles, detection of microorganisms, hybridization, plasmonic absorption, chromatographic change, primers

# ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο άνθρωπος και τα ζώα είναι ένα πολύ μικρό κομμάτι της βιοποικιλότητας της γης, στην οποία φαίνεται να επικρατούν ως επί το πλείστον τα μικρόβια και οι μικροοργανισμοί, δηλαδή η γη είναι μικροβιακή, επειδή οι μικροοργανισμοί καλύπτουν περισσότερο από το 1/3 ολόκληρης της βιοποικιλότητας και της βιομάζας της, ωστόσο υπάρχει και μια πληθώρα ειδών στον πλανήτη τα οποία δεν έχουν ακόμη μελετηθεί, τόσο στην στεριά όσο και στην θάλασσα αυτής της γης (Mora et al., 2011).

Εκτιμάται πως αν όλοι οι πολυκύτταροι οργανισμοί της γης εξαφανιστούν, τότε οι μικροοργανισμοί δεν θα πάθουν κάτι σοβαρό ώστε να εξαφανιστούν κι αυτοί, ενώ, αντιθέτως, αν εξαφανιστούν οι μικροοργανισμοί ενδεχομένως να εξαφανιστεί μαζί και η ζωή επί της γης, αφού δεν δύναται να υπάρξει πολυκύτταρος οργανισμός χωρίς την έμμεση υποστήριξη των μικροβίων. Τα μικρόβια έχουν αναγνωριστεί ως πολύ σημαντικές δυνάμεις της εξέλιξης των ευκαρυωτών, όμως αυτή τους η αναγνώριση έχει σχετικά παγώσει, επειδή δεν έχει εντοπιστεί επακριβώς το όριο μεταξύ αμοιβαίας συμβίωσης και παρασιτισμού έως τελικής λοίμωξης. Μπορεί να υπάρχει ένα δεδομένο πλαίσιο ερμηνείας του τρόπου με τον οποίο οι παρασιτικές αλληλεπιδράσεις προωθούν την ευεξία των παρασιτικών μικροοργανισμών, όμως η μεριά των μικροβίων έχει αγνοηθεί στις αμοιβαίες συμβιώσεις και είναι άγνωστο το κατά πόσο αυτά τα μη παρασιτικά μικρόβια τελικά ωφελούνται από τους ξενιστές τους (Garcia & Gerardo, 2014).

Είναι γεγονός, στις μέρες μας, πως οι περισσότερες έρευνες στρέφονται γύρω από τον ξενιστή, όπως για παράδειγμα τον άνθρωπο και τις αλληλεπιδράσεις του με τους μικροοργανισμούς. Μάλιστα, έχει πολυσυζητηθεί το γεγονός πως υπάρχουν άπειροι μικροοργανισμοί, οι οποίοι κατοικούν στο ανθρώπινο σώμα και επηρεάζουν τη συμπεριφορά μας κατά φανταστικούς τρόπους, ενώ εικάζεται πως υπάρχουν περισσότερα από 39 τρισεκατομμύρια μικροοργανισμοί μέσα μας –όταν ένα ανθρώπινο σώμα έχει λιγότερα κύτταρα, κάπου στα 30 τρισεκατομμύρια! (Looi, 2020).

Όμως, από τη μια έχει προταθεί η συμβίωση με αρκετούς μικροοργανισμούς, όπως για παράδειγμα στην περίπτωση της χλωρίδας του εντέρου που ελέγχει την εντερική φυσιολογία και κατ' επέκτασιν την φυσιολογία ολόκληρου του ανθρωπίνου σώματος, ενώ από την άλλη ο ίδιος ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (ΠΟΥ) έχει δημοσιεύσει ένα πασίγνωστο ακρωνύμιο, το «ESKAPE» όπου το κάθε γράμμα του συμβολίζει και από ένα βακτήριο που είναι ύψιστης απειλής για την ανθρώπινη υγεία (Mancuso et al., 2021; Vicentini et al., 2021).

Πράγματι, οι μικροοργανισμοί μπορούν να αποβούν έως και θανατηφόροι, κάτι το οποίο απέδειξε και η πρόσφατη πανδημία της ασθένειας του κορονοϊού (Coronavirus Disease 2019; COVID-19), παρά το γεγονός πως τελικά δεν επρόκειτο και για ένα τόσο μεταδοτικό ή φονικό μικρόβιο. Η πανδημία της COVID-19 ήταν η αφορμή όπου τα διαγνωστικά τεστ έγιναν ευρέως γνωστά σχεδόν σε κάθε γωνιά της γης, και μάλιστα ήταν η αφορμή όπου οι κοινωνίες εξοικειώθηκαν με τα καινοτόμα γρήγορα διαγνωστικά αλλά και αυτοδιαγνωστικά τεστ (με μέθοδο τον ανοσοπροσδιορισμό πλευρικής ροής) για τον εντοπισμό αντιγόνων του κορονοϊού αλλά και αντισωμάτων κατά αυτού –βάσει των νανοσωματιδίων χρυσού (Mouliou & Gourgouljanis, 2021).

Τα εν λόγω σωματίδια βρίσκουν εφαρμογή και στον εντοπισμό και την αναγνώριση λοιμωδών νοσημάτων και βιοαπειλών εξαιτίας των παθογόνων μικροοργανισμών ήδη τουλάχιστον μια δεκαετία πριν την πανδημία, και συνεχίζουν να χρησιμοποιούνται πιο εκτεταμένα (Lin et al., 2013). Ο δε εντοπισμός του γενετικού υλικού των παθογόνων μικροοργανισμών έχει σχετικά σύντομη ιστορία και πρωτοεμφανίστηκε προς τα τέλη του προηγούμενου αιώνα με την ανίχνευση του παθογόνου βακτηρίου *Haemophilus Influenzae*, το οποίο ευθύνεται για δευτερογενείς λοιμώξεις μετά από τις αρχικές εξαιτίας άλλων παθογόνων μικροβίων (Fleischmann et al., 1995). Η ανάγκη ανίχνευσης των μικροβίων μέσω του γενετικού τους υλικού ήταν γνωστή ήδη εδώ και δεκαετίες –αφού κάτι τέτοιο θα μπορούσε να έχει αποτρέψει και την έκταση της περιβόητης ισπανικής γρίπης- και φυσικά παρά την διατήρηση των κεντρικών σημείων λίγων κλασικών μεθόδων -όπως αυτών της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης που θα συζητηθεί εκτενέστερα σε παρακάτω παραγράφους-, αδιαμφισβήτητα οι τεχνολογίες εντοπισμού έχουν εξελιχθεί αρκετά έως τις μέρες μας. Φυσικά, ακόμη και η πρόσφατη πανδημία της COVID-19 απέδειξε την εν λόγω ανάγκη, και μάλιστα υπογράμμισε και την ανάγκη πιο εξελιγμένων, εύχρηστων και γρήγορων διαγνωστικών αλλά και αυτοδιαγνωστικών δοκιμασιών.

Η παρούσα μελέτη έγινε επάνω στην χρήση των νανοσωματιδίων χρυσού για τον εντοπισμό παθογόνων μικροοργανισμών. Αρχικά, στο πρώτο κεφάλαιο του θεωρητικού μέρους γίνεται μια εισαγωγή στην θεωρία μέσω της οριοθέτησης του γενετικού υλικού μέσα από την ανακάλυψή του, τη δομή του, το κεντρικό δόγμα της βιολογίας και τον εντοπισμό του με έμφαση στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, στη συνέχεια, στο δεύτερο κεφάλαιο γίνεται μια πιο εξειδικευμένη παρουσίαση των νανοσωματιδίων χρυσού, από την ανακάλυψή τους, τις χρήσεις και την εφαρμογή τους στις βιοεπιστήμες έως και για τον εντοπισμό βιομορίων και πιο συγκεκριμένα του γενώματος, και τέλος, στο τρίτο κεφάλαιο παρουσιάζονται συνοπτικά πληροφορίες για τους μικροοργανισμούς, το τί είναι, τις κατηγορίες τους, τους παθογόνους και τις λοιμώξεις και το κεφάλαιο κλείνει με πληροφορίες επάνω στους μικροοργανισμούς που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία. Μετέπειτα, στο ειδικό μέρος παρουσιάζονται αναλυτικά η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε στην παρούσα εργασία, τα αποτελέσματα και η συζήτησή τους, και τέλος τα συμπεράσματα της έρευνας.

# 1. ΤΟ ΓΕΝΕΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

## 1.1. Η Ανακάλυψη του Γενετικού Υλικού

Η ιστορία της γενετικής φαίνεται πως άρχισε με τα πειράματα υβριδισμού των μπιζελιών από τον Γκρέγκορ Μέντελ το 1865, ο οποίος ονομάστηκε και πατέρας της γενετικής αφού ανακάλυψε τους νόμους της κληρονομικότητας μέσα από τα πειράματά του, αφού εισήγαγε την έννοια των γονιδίων και έθεσε τις βάσεις για επικρατή και υπολειπόμενα γονίδια. Στις αρχές του 20<sup>ου</sup> αιώνα, το έργο του Μέντελ ξαναμελετήθηκε και παγιώθηκε (Gayon, 2016).

Στα μισά του ίδιου αιώνα, το 1953, οι Τζέιμς Γουότσον και Φράνσις Κρικ, με συνεισφορές από τους Ρόζαλιν Φράνκλιν και Μάουρις Γουίλκινς, πρότειναν μεταξύ άλλων πως το γενετικό υλικό, το δεσοξυριβονουκλεϊκό οξύ (Deoxyribonucleic Acid; DNA), είναι μια δίκλωνη ελικοειδής έλικα (θα συζητηθεί εκτενέστερα σε παρακάτω παραγράφους) και τελικά η δική τους προτεινόμενη δομή εγκρίθηκε ως το γενετικό υλικό του ανθρώπου (Watson & Crick, 1974).

Περί το 1960, ερευνητές συμπεριλαμβανομένων των Μαρσάλ Νίρεμπεργκ και Χαρ Γκόμπαϊντ Χοράνα αποκρυπτογράφησαν τον γενετικό κώδικα και έδειξαν πως οι αλληλουχίες του αντιστοιχούν σε ειδικά αμινοξέα, τα οποία με την σειρά τους αποτελούν τις δομικές βάσεις των πρωτεϊνών. Φυσικά, μετά από αυτό, οι προαναφερθέντες αλλά και ο Ρόμπερτ Χόλεϊ μοιράστηκαν οι τρεις τους το Νόμπελ Φυσιολογίας ή Ιατρικής το 1968 για την «ερμηνεία του γενετικού κώδικα και τη λειτουργία του στη σύνθεση πρωτεϊνών» (Raju, 1999).

Προς τα τέλη του ίδιου αιώνα, κατά το 1970, ορισμένοι επιστήμονες ανέπτυξαν τεχνικές χειρισμού του DNA, μέσω των οποίων επέτρεπαν σε γονίδια να εισέρχονται σε καινούρια γενετικά περιβάλλοντα, κάτι που άνοιξε τον δρόμο για την γενετική μηχανική. Το 1983 ο Κάρυ Μούλις εφηύρε την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction; PCR) η οποία εφαρμόζει σε μικρές αλληλουχίες DNA και είναι ένα ορόσημο για την επιστήμη της γενετικής (Towbin, 1995).

Το 1972, ο Βάλτερ Φίερς ανακάλυψε με την ερευνητική ομάδα του για πρώτη φορά την αλληλουχία ενός γονιδίου και μια πενταετία αργότερα οι Ρίτσαρντ Ρόμπερτς και Φίλιπ Σαρπ βρήκαν πως τα γονίδια είναι σε θέση να διαιρούνται σε γονιδιακά θραύσματα. Το 1986 έγιναν για πρώτη φορά εικασίες για τον περιβόητο «κόσμο του RNA», από τον Βάλτερ Γκίλμπερτ, βάσει του οποίου στο πρωταρχικό σύστημα, δεν υπήρχαν το DNA και οι πρωτεΐνες αλλά μόνο το RNA (Ribonucleic Acid) ριβονουκλεϊκό οξύ), λειτουργώντας την ίδια στιγμή ως φορέας της γενετικής πληροφορίας και ως καταλύτης (Μουλιού, 2022).

Από το 1990 έως και το 2003 έγινε μια διεθνής συλλογική προσπάθεια χαρτογράφησης και αλληλουχίας με επιτυχία ολόκληρου του ανθρώπινου γονιδιώματος, παρέχοντας μια ολοκληρωμένη αναφορά της ανθρώπινης γενετικής πληροφορίας, και πραγματοποιήθηκε με ακρίβεια 99,99%. Το έργο καταγραφής του ανθρώπινου γονιδιώματος ήταν ένα τεράστιο επίτευγμα, το οποίο παρείχε τη βάση για αμέτρητες εξερευνήσεις στη γενετική και τη γονιδιωματική του ανθρώπινου είδους. Ωστόσο, για πολλά χρόνια, η αλληλουχία αναφοράς του ανθρώπινου γονιδιώματος παρέμενε ημιτελής και δεν αντιπροσώπευε την ανθρώπινη γενετική ποικιλότητα. Έως σήμερα, φαίνεται πως αρκετές εξελίξεις έχουν σταθεί ορόσημο για μια καινούρια εποχή γονιδιωματικής έρευνας, που ενισχύει την ακρίβεια της γονιδιωματικής ανάλυσης, ανοίγει το δρόμο για την ιατρική ακριβείας και συμβάλλει σε βαθύτερες γνώσεις για τη βιολογία του ανθρώπου (Taylor et al., 2024).

## **1.2. Η Δομή και η Λειτουργία του DNA**

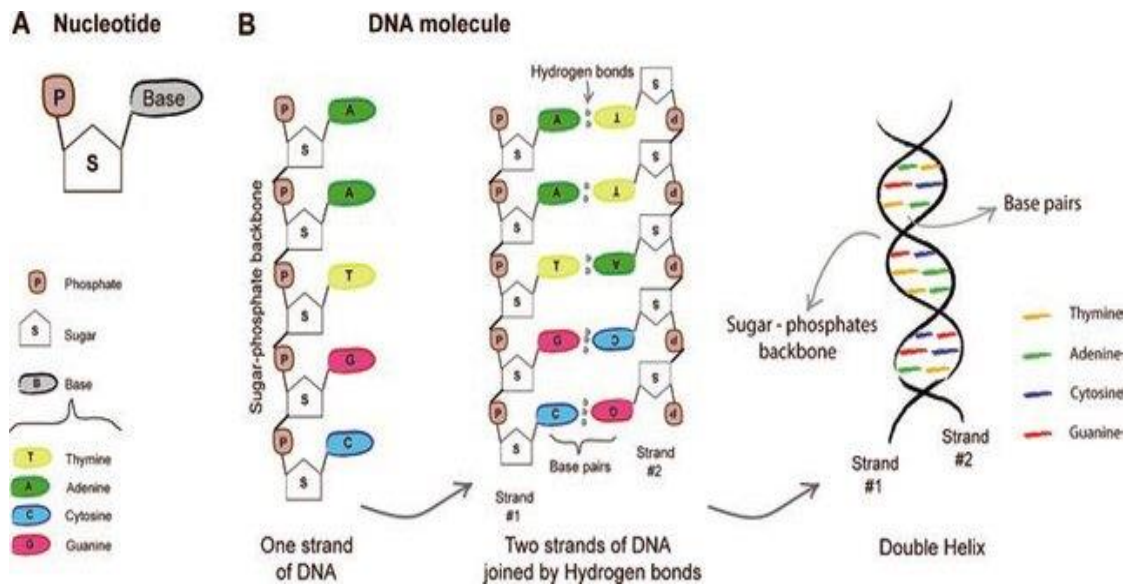
Σχεδόν όλο το DNA εντοπίζεται στον πυρήνα του κυττάρου και είναι ένα πολυμερές που λειτουργεί ως μήτρα αντιγραφής για το RNA (Gartner et al., 1998).

Η δομική μονάδα του μορίου του DNA ονομάζεται νουκλεοτίδιο και έχει τρία συστατικά: ένα σάκχαρο πέντε άνθρακα, μια φωσφορική ομάδα και μια βάση που περιέχει άζωτο. Τα νουκλεοτίδια συνδέονται μεταξύ τους μέσω του μορίου φωσφορικού άλατος δημιουργώντας δύο ανεξάρτητες αλυσίδες που συγκρατούνται μεταξύ τους μέσω δεσμών υδρογόνου μεταξύ των συμπληρωματικών βάσεων αζώτου.



Στην παρακάτω Εικόνα 1 φαίνεται πως λόγω της δομικής δομής του, το DNA σχηματίζει ένα μόριο μιας δίκλωνης έλικας (Cano Londoño et al., 2020).

**Εικόνα 1** Η δομή του DNA (Cano Londoño et al., 2020).



Υπάρχουν δύο είδη αζωτούχων βάσεων, οι πουρίνες δηλαδή η αδενίνη και η γουανίνη, και οι πυριμιδίνες δηλαδή η κυτοσίνη και η θυμίνη, και σχηματίζονται δυο δεσμοί υδρογόνου μεταξύ αδενίνης και θυμίνης και τρεις δεσμοί υδρογόνου μεταξύ κυτοσίνης και γουανίνης (Gartner et al., 1998).

Αναφορικά με την λειτουργία του, αρχικά το DNA περιέχει όλες τις απαραίτητες λειτουργίες για την εξέλιξη, την ανάπτυξη, την λειτουργία, και την αναπαραγωγή όλων των ζώντων οργανισμών. Έπειτα, μέσω της αντιγραφής το DNA αυτοδιπλασιάζεται –κάτι απαραίτητο για την κυτταρική διαίρεση επιτρέποντας έτσι την διαίωση της γενετικής πληροφορίας από το μητρικό κύτταρο στα θυγατρικά από αυτό και από την μια γενιά στην άλλη (Sinden, 1994).

Το DNA επίσης ελέγχει την παραγωγή των πρωτεϊνών μέσω της μεταγραφής και της μετάφρασης οι οποίες θα συζητηθούν παρακάτω, ενώ υπόκειται σε μεταλλάξεις, οι οποίες είναι αλλαγές στην νουκλεοτιδική αλληλουχία του με αποτέλεσμα να υπάρχει η δύναμη εξέλιξης σε έναν πληθυσμό αφού κάποιες μεταλλάξεις είναι ωφέλιμες και κάποιες άλλες είναι επιβλαβείς. Ακόμη, το DNA μεταφέρει την γενετική πληροφορία από τους γονείς στους απογόνους, αφού κατά την σεξουαλική αναπαραγωγή, οι

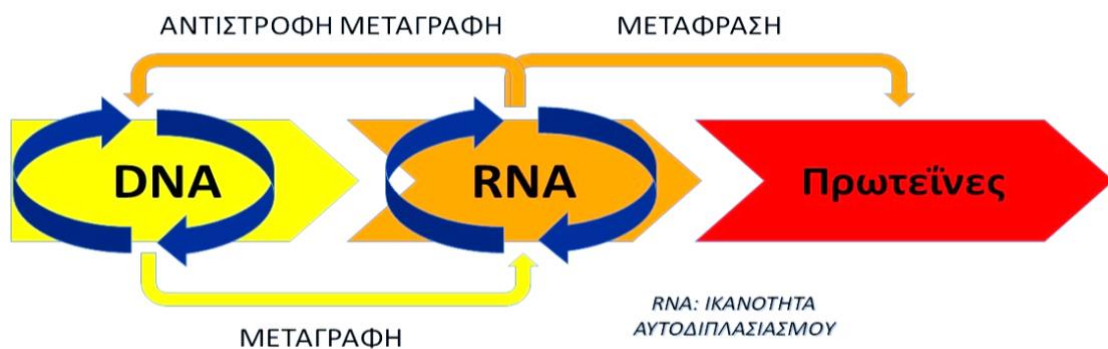
απόγονοι κληρονομούν το μισό γενετικό υλικό από τον κάθε γονέα τους και ουσιαστικά αποτελούν έναν μοναδικό συνδυασμό γενετικού υλικού (Sinden, 1994).

Επιπροσθέτως, το DNA εμπεριέχει ρυθμιστικά στοιχεία που ελέγχουν τον χρόνο, την τοποθεσία και την ποσότητα της γονιδιακής έκφρασης, και τέλος, μπορεί να τροποποιηθεί χημικά από επιγενετικές διαδικασίες που την επηρεάζουν και μπορεί να είναι κληρονομήσιμες, καθώς επίσης και να έχουν ρόλο στην ανάπτυξη, την εκδήλωση ασθενειών και την προσαρμογή σε περιβαλλοντικούς παράγοντες (Sinden, 1994).

### 1.3. Το Κεντρικό Δόγμα της Βιολογίας

Οι Τζώρτζ Μπιντλ και Έντουαρντ Τάτουμ κέρδισαν το Νόμπελ στην Φυσιολογία της Ιατρικής το 1958, αφού απέδειξαν πως οι μεταλλάξεις γονιδίων οδηγούν σε βλάβες σε μεταβολικά μονοπάτια, ενώ κατέληξαν πως κάθε γονίδιο κωδικοποιεί μια χαρακτηριστική πρωτεΐνη, και τελικά πως «ένα γονίδιο, μια πρωτεΐνη». Το κεντρικό δόγμα της βιολογίας, που αναπαρίσταται στην Εικόνα 2, ειπώθηκε αρχικά από τον Φράνσις Κρικ, το 1957 που συζητήθηκε προηγουμένως, φαίνεται πως η αντίστροφη μεταγραφή δεν υπακούει στο δόγμα αυτό (Μουλιού, 2022).

**Εικόνα 2** Το κεντρικό δόγμα της μοριακής βιολογίας (Μουλιού, 2022).



#### 1.3.1. Η αντιγραφή του DNA

Κατά την αντιγραφή του DNA, το ίδιο το DNA διπλασιάζεται από μόνο του μέσα σε ένα κύτταρο για να διατηρηθούν και να μεταβιβαστούν οι γενετικές πληροφορίες από ένα κύτταρο στα θυγατρικά του, καθώς και από έναν οργανισμό στους απογόνους του.

Η διαδικασία της αντιγραφής, όπως μαρτυρά και η δομή της διπλής έλικας και ο ημισυντηρητικός μηχανισμός, φαντάζει απλή· παρ' όλ' αυτά, έχει διαπιστωθεί πως τα κύτταρα έχουν ένα σπουδαίο οπλοστάσιο εξειδικευμένων ενζύμων και αρκετών άλλων πρωτεϊνών που λειτουργούν την ίδια χρονική στιγμή, και δρουν καταλυτικά σε χημικές αντιδράσεις με ταχύτητα και ακρίβεια (Kornberg & Baker, 2005).

Μπορεί ο μηχανισμός της αντιγραφής να έχει μελετηθεί πολύ περισσότερο στα κύτταρα των προκαρυωτών -κυρίως στο βακτήριο *Escherichia Coli*- γιατί το γενετικό υλικό τους είναι φανερά αρκετά μικρότερο και πολύ πιο απλά οργανωμένο από το DNA των κυττάρων των ευκαρυωτών, όμως τα κύρια στάδια του μηχανισμού της αντιγραφής έχουν σπουδαίες ομοιότητες και στα δύο είδη κυττάρων. Η αντιγραφή του DNA ξεκινά από συγκεκριμένα σημεία, τις θέσεις έναρξης αντιγραφής. Το DNA των βακτηρίων είναι κυκλικό και έχει μονάχα μία θέση έναρξης της αντιγραφής και αντιγράφεται σε λιγότερο από ένα μισάωρο –υπό φυσιολογικές συνθήκες. Στα κύτταρα των ευκαρυωτών, το DNA έχει πολλές θέσεις έναρξης της αντιγραφής, αφού πριν από αυτή είναι ένα γραμμικό μόριο, με αποτέλεσμα να αντιγράφεται ταυτόχρονα από εκατοντάδες σημεία ανά το μήκος του, και στο τέλος τα πολλά τμήματα που παράγονται ενώνονται μεταξύ τους (Kornberg & Baker, 2005).

Τα κύρια ένζυμα της αντιγραφής είναι η DNA ελικάση που προκαλεί αρχικά υδρόλυση των δεσμών υδρογόνου στις αλυσίδες προς το ξετύλιγμά τους, η τοποϊσομεράση που μεταβάλλει το ξετύλιγμα της δίκλωνης έλικας, το πριμόσωμα που είναι ένα ειδικό σύμπλοκο πρωτεϊνών αποτελούμενο από πολλά ένζυμα που συνθέτουν στις θέσεις έναρξης της αντιγραφής μικρούς εκκινήτες (πρωταρχικά τμήματα), οι DNA πολυμεράσες που επιμηκύνουν τις νεοσχηματιζόμενες αλυσίδες, η DNA λιγκάση που ενώνει τα διάφορα νεοσχηματιζόμενα τμήματα που προκύπτουν και τα επιδιορθωτικά ένζυμα τα υπεύθυνα για τυχόν λάθη (Kornberg & Baker, 2005).

### **1.3.2. Η μεταγραφή του DNA σε mRNA**

Κατά την μεταγραφή του DNA, η γενετική πληροφορία που έχει αποθηκευτεί στο DNA μεταφέρεται μέσω του RNA, και πρόκειται για μια διαδικασία κρίσιμη ως προς την έκφραση των γονιδίων και την τελική παραγωγή των απαραίτητων πρωτεϊνών για την κυτταρική λειτουργία. Το γονίδιο είναι η μονάδα κληρονομικότητας που εντοπίζεται σε συγκεκριμένες περιοχές του μορίου του DNA και πρόκειται για βιολογικές

πληροφορίες που μεταβιβάζονται από τη μια κυτταρική γενιά στην άλλη, ενώ κάθε γονίδιο αντιπροσωπεύει ένα συγκεκριμένο τμήμα του μορίου DNA που είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση μιας ή περισσότερων πρωτεϊνών (Gartner et al., 1998).

Η μεταγραφή του DNA ξεκινά με τη δέσμευση της RNA πολυμεράσης στον υποκινητή του γονιδίου, ενώ οι μεταγραφικοί παράγοντες είναι πρωτεΐνες που την βοηθούν να τον εντοπίσει. Στη συνέχεια το μόριο επιμηκύνεται και ακολουθεί ο τερματισμός της επιμήκυνσής του όταν η RNA πολυμεράση πέσει επάνω σε μια ειδική αλληλουχία τέλους του γονιδίου, ενώ μετέπειτα ακολουθούν μεταμεταγραφικές τροποποιήσεις στο παραγόμενο μόριο αγγελιαφόρου RNA ή mRNA (messenger RNA) (Gartner et al., 1998).

Αναφορικά με την αντίστροφη μεταγραφή πρόκειται για μια βιολογική διαδικασία όπου το RNA χρησιμεύει ως μήτρα για τη σύνθεση DNA, και είναι αντίθετη από την κανονική ροή της γενετικής πληροφορίας από το DNA στο RNA. Η αντίστροφη μεταγραφή καταλύεται από την αντίστροφη μεταγραφάση, και λαμβάνει χώρα ως επί το πλείστον σε συγκεκριμένους ιούς κυρίως ρετροϊούς –όπως ο HIV (Human Immunodeficiency Virus; Ιός της Ανθρώπινης Ανοσοανεπάρκειας)-, ενώ βρίσκει ευρεία εφαρμογή στη μοριακή βιολογία και την έρευνα (Xavier & Arnold, 2020).

### **1.3.3. Η μετάφραση του DNA σε πρωτεΐνη**

Κατά την μετάφραση του DNA, η γενετική πληροφορία που έχει αποθηκευτεί μέσω της μεταγραφής στο mRNA αποτελεί τον κώδικα για την παραγωγή πρωτεϊνών, και έπεται μετά της μεταγραφής του DNA σε RNA, ενώ λαμβάνει χώρα στα ριβοσώματα ενός κυττάρου. Η μετάφραση είναι μια θεμελιώδης διαδικασία για την μοριακή βιολογία, επειδή είναι το τελικό στάδιο της γονιδιακής έκφρασης που οδηγεί στις αναγκαίες για την ύπαρξη της ζωής πρωτεΐνες (Gartner et al., 1998).

Αρχικά, το mRNA συνδέεται σε αυτό και κάποια άλλα μεταφορικά RNA (transport RNA; tRNA) φέρουν στο σημείο αυτό αμινοξέα και συνδέονται με το mRNA, ενώ το ριβόσωμα κινείται κατά μήκος του mRNA καταλύοντας τον τελικό σχηματισμό της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Φυσικά, υπάρχουν συγκεκριμένες

αλληλουχίες έναρξης της μετάφρασης και όπου προσδένεται το ριβόσωμα στο mRNA αλλά και δεδομένες αλληλουχίες τερματισμού της μετάφρασης του γονιδίου (Gartner et al., 1998).

Συνοπτικά, από το γονίδιο του DNA γίνεται μετάβαση στο mRNA που είναι το ενδιάμεσο μόριο μεταξύ του γενετικού υλικού και των πρωτεϊνών, και τελικά η μεταγραφή οδηγεί στην μετάφραση στην τελική πρωτεΐνη, η οποία είναι ουσιαστικά μια αλληλουχία συγκεκριμένων αμινοξέων, που μπορεί να οδηγήσουν μετά από μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις και σε διαφορετικές πρωτεΐνες.

## **1.4. Ο Εντοπισμός του Γενετικού Υλικού**

Το DNA ανιχνεύθηκε για πρώτη φορά κατά το 1869, όταν ο Miescher ανακάλυψε μια ουσία που ονόμασε «νουκλεΐνη» στους πυρήνες των λευκών αιμοσφαιρίων. Αυτή η ουσία, η οποία αργότερα μετονομάστηκε σε DNA, βρέθηκε περιείχε φώσφορο και άζωτο, ώστε να διακρίνεται από τις πρωτεΐνες. Για τον εντοπισμό του γενετικού υλικού, ο Miescher σύλλεξε δείγμα από χειρουργικούς επιδέσμους όπου υπήρχαν αρκετά λευκοκύτταρα, πραγματοποίησε λύση κυττάρων με αλκαλικό διάλυμα, κατέστρεψε τις πρωτεΐνες μέσω οξέος, και είδε πως μια μοναδική φωσφορο-εμπεριέχουσα ουσία παρέμεινε στο διάλυμα, την οποία και απομόνωσε περαιτέρω μέσω ξεπλύματος με αλκοόλη, την χαρακτήρισε μέσω χημικών αναλύσεων και κατέληξε στο συμπέρασμα πως επρόκειτο για το γενετικό υλικό (Miescher, 1871).

Παρά την περιορισμένη τεχνολογία του και το μεγάλο διάστημα σιγής μετά την έρευνά του -δεδομένου πως τότε πιστευόταν πως οι πρωτεΐνες ήταν ο μοναδικός φορέας της γενετικής πληροφορίας-, σήμερα, υπάρχουν αρκετές μέθοδοι για τον εντοπισμό και την απομόνωση του DNA, συμπεριλαμβανομένων της ηλεκτροφόρησης σε τζελ, της αλληλούχησης DNA, της υβριδοποίησης *in situ*, της ανάλυσης μικροσυστοιχιών, της γονοτύπησης μεμονωμένων πολυμορφισμών, και της μεθόδου που παρουσιάζεται συνοπτικά στην παρακάτω παράγραφο (Alberts et al., 2014).

### **1.4.1. Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)**

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction; PCR) είναι μία μέθοδος που χρησιμοποιείται για την απομόνωση και τον πολλαπλασιασμό μίας

δεδομένης αλληλουχίας DNA, όπου το DNA αναπαράγεται ενζυματικά χωρίς τη μεσολάβηση ζωντανών μικροοργανισμών. Η PCR είναι μία μέθοδος που λαμβάνει σε δοκιμαστικό σωλήνα χώρα δίχως περιορισμούς στη μορφή του δεδομένου DNA, ενώ δύναται να διαφοροποιηθεί εκτενώς για ποικίλες μεθόδους, και μέσω αυτής δεδομένα θραύσματα DNA κλωνοποιούνται απουσία ζωντανών κυττάρων. Μέσω της PCR, μια δεδομένη γονιδιακή περιοχή δύναται να πολλαπλασιαστεί ακόμη και δισεκατομμύρια φορές, αρκεί να είναι γνωστή η νουκλεοτιδική αλληλουχία της, αφού είναι αναγκαία για το σχεδιασμό των συνθετικών DNA εκκινητών, ο καθένας συμπληρωματικός με μία εκ των αλυσίδων του δίκλωνου DNA. Οι εκκινητές αυτοί πρέπει να δεσμεύονται σε αντίθετες θέσεις επάνω στην αλληλουχία που θα ενισχυθεί έκαστος σε κάθε κλώνο της, και ουσιαστικά κρίνουν τα άκρα του θραύσματος DNA που θα ενισχυθεί (Alberts, 2014).

Στην εν λόγω μέθοδο, ένας ολοκληρωμένος κύκλος περιλαμβάνει τρία στάδια: (1) την αποδιάταξη του DNA (denaturation), (2) την προσαρμογή των εκκινητών στο DNA εκμαγείο (annealing), και (3) την επιμήκυνση των εκκινητών και την υβριδοποίηση (extension). Ένας τέτοιος ολοκληρωμένος κύκλος περιλαμβάνει ουσιαστικά την επώαση των δειγμάτων σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες και σήμερα πραγματοποιείται αυτοματοποιημένα από ειδικά μηχανήματα. Σε μια κλασική αντίδραση, το δίκλωνο μόριο DNA αρχικά αποδιατάσσεται με αύξηση της θερμοκρασίας στους 95°C, μετέπειτα οι εκκινητές που είναι σε περίσσια προσαρμόζονται και υβριδοποιούνται στις συμπληρωματικές αλληλουχίες του μορίου εκμαγείου με ελάττωση της θερμοκρασίας στους 50-60°C, και στο τέλος συμβαίνει η επώαση στους 72°C για να επιμηκυνθούν οι εκκινητές από μία DNA πολυμεράση, φυσικά υπό την παρουσία των τεσσάρων απαραίτητων νουκλεοτιδίων. Επί του πρακτέου σε 20-30 κύκλους ενισχύεται αποτελεσματικά μια αλληλουχία του επιθυμητού DNA, ενώ σε κάθε κύκλο διάρκειας περίπου 5 λεπτών η ποσότητα του αρχικού DNA διπλασιάζεται (Alberts, 2014).

Εικόνα 3 Η PCR (Alberts, 2014).

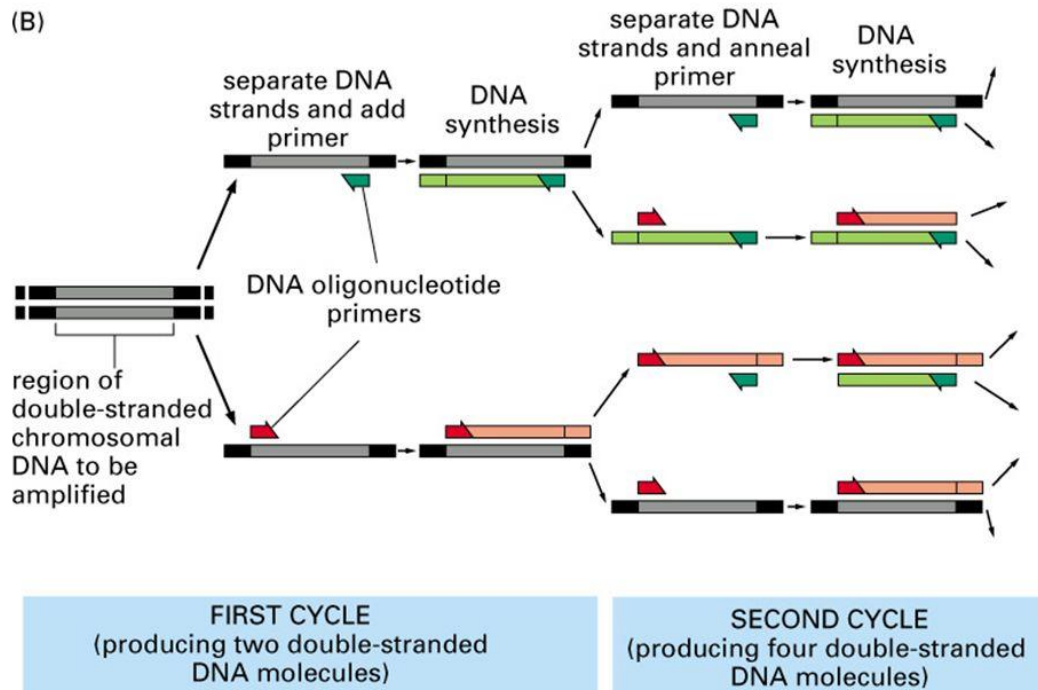


Figure 8–39 part 2 of 3. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Φυσικά, στις μέρες μας χρησιμοποιούνται και παραλλαγές της κλασικής PCR, όπως η PCR πραγματικού χρόνου (real time PCR; RT-PCR) ή η PCR αντίστροφης μεταγραφής (Reverse Transcription PCR; RT-PCR), η ποσοτική PCR (quantitative PCR; q-PCR), κ.α..

## **2. ΤΑ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ ΧΡΥΣΟΥ**

### **2.1. Η Ανακάλυψη των Νανοσωματιδίων Χρυσού**

Το ρωμαϊκό γυάλινο κύπελλο του Λυκούργου του 4<sup>ου</sup> αιώνα από διχρωμικό γυαλί που δείχνει διαφορετικό χρώμα ανάλογα με το αν το φως περνάει ή όχι, ιδιότητα που οφείλεται στα νανοσωματίδια χρυσού ((Golden (Au) NanoParticles; AuNPs)), τα οποία φαίνεται να υπάρχουν από την αρχαιότητα (Freestone et al., 2007). Στον μεσαίωνα τα AuNPs χρησιμοποιήθηκαν πολύ από καλλιτέχνες για να δημιουργήσουν έντονες χρωματικές δονήσεις σε γυάλινα παράθυρα, ενώ στην παραδοσιακή Κινέζικη ιατρική τα AuNPs χρησιμοποιούνταν για χιλιάδες χρόνια για τις θεραπευτικές τους επιδράσεις (Brill, 1999; Sreekumar et al., 2012). Στην σύγχρονη επιστήμη η ανακάλυψή τους έγινε περί το 1857 από τον Φάραντεϊ (Faraday, 1857).

### **2.2. Τα Είδη και η Δομή των Νανοσωματιδίων Χρυσού**

Τα AuNPs μπορεί να έχουν ποικίλα είδη τα οποία παρουσιάζονται παρακάτω (Burda et al., 2005; Dreaden et al., 2012b; Hossain et al., 2022; Murphy et al., 2005):

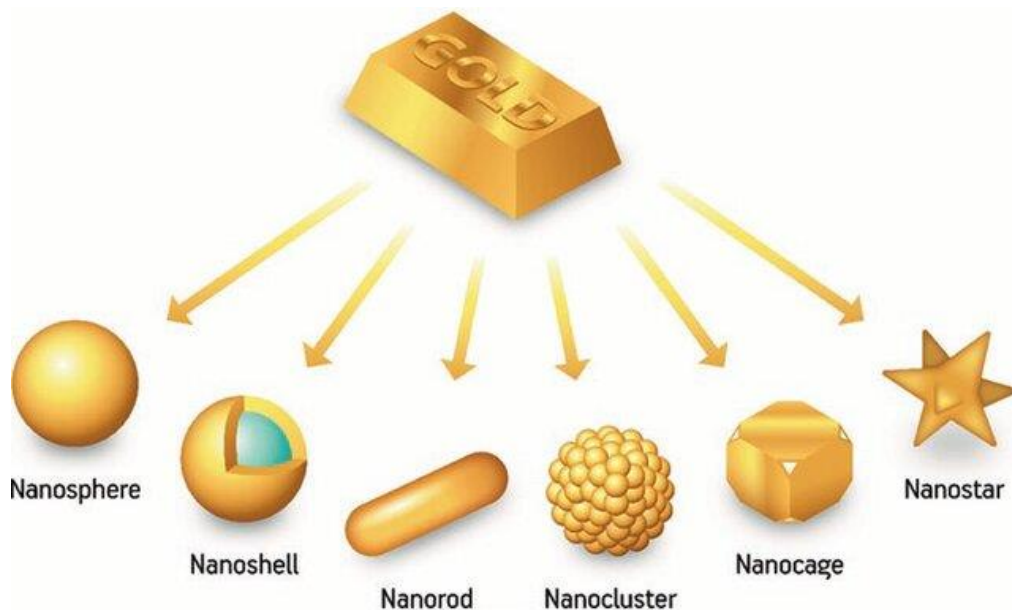
- σφαιρικά, όπου είναι τα πιο κοινά με τέλεια γεωμετρία, έχουν μεγάλη επιφάνεια σχετικά με τον όγκο τους και χρησιμοποιούνται με ευκολία στην ιατρική διαγνωστική, ως φορείς φαρμάκων και ως καταλύτες,
- νανοράβδοι, οι οποίοι έχουν ανισότροπο σχήμα που οδηγεί σε μοναδικές οπτικές ιδιότητες όπως ο συντονισμός επιφανειακών πλασμονίων στη διαμήκη και στην εγκάρσια κατεύθυνση και βρίσκουν εφαρμογή στην φωτοθερμική θεραπεία, την ιατρική απεικόνιση και ως αισθητήρες,
- νανοκελύφη, που αποτελούνται από έναν διηλεκτρικό πυρήνα καλυμμένο με λεπτή στρώση χρυσού, έχουν ρυθμιζόμενες οπτικές ιδιότητες αναλόγως την αναλογία πυρήνα/κελύφους και χρησιμοποιούνται ως φορείς φαρμάκων, στην ιατρική απεικόνιση και στην φωτοθερμική θεραπεία,



- νανοκλουβιά, που είναι πορώδεις δομές σαν σπήλαια, έχουν μεγάλη επιφάνεια με μικρή πυκνότητα και αυξημένη διαπερατότητα, και βρίσκουν εφαρμογή στην μεταφορά φαρμάκων, την ιατρική απεικόνιση και την κατάλυση,
- νανοαστέρες, οι οποίοι έχουν αρκετές προεκβολές που αυξάνουν κατά πολύ την επιφάνειά τους και οδηγούν σε έντονα τοπικά ηλεκτρομαγνητικά πεδία, και εφαρμόζονται σε αισθητήρες, στην ιατρική απεικόνιση και στην φωτοθερμική θεραπεία,
- νανοπρίσματα, που είναι τριγωνικά ή εξαγωνικά, έχουν ανισότροπες οπτικές ιδιότητες και εφαρμόζουν σε αισθητήρες, στην ιατρική απεικόνιση και στην φωτοθερμική θεραπεία, και
- νανολουλούδια, τα οποία μοιάζουν με λουλούδια με πολλαπλά πέταλα, έχουν και αυτά μεγάλη επιφάνεια με πολλά πλασμόνια, ενώ χρησιμεύουν κυρίως ως καταλύτες και ως αισθητήρες.

Σαφώς, τα παραπάνω είδη που έχουν διαφορετικά σχήματα, οδηγούν σε διαφορετικές οπτικές ιδιότητες αφού επηρεάζονται από το σχήμα και το μέγεθός τους, διαφορετική χημική αντιδραστικότητα, καθώς επίσης και διαφορετική βιοσυμβατότητα και λειτουργικότητα.

**Εικόνα 4** Τα είδη των AuNPs βάσει του σχήματος και της μορφολογίας τους (Hossain et al., 2022).



## 2.3. Οι Ιδιότητες των Νανοσωματιδίων Χρυσού

Κατά τον Smith (2023), νανοσωματίδια χρυσού έχουν αρκετές ιδιότητες ώστε να θεωρούνται ελκυστικά σε πολλές επιστημονικές αλλά και βιομηχανικές εφαρμογές, όπως οι:

- οπτικές ιδιότητες που είναι (i) η πλασμονική απορρόφηση όπου για αυτά είναι χαρακτηριστική στο ορατό φάσμα συχνά στα 520-550nm αναλόγως μεγέθους τους και οφείλεται στην συνολική ταλάντωση των ηλεκτρονίων τους καθώς εκτίθενται σε φως όπου αποκτούν έντονο χρώμα και άλλες κατάλληλες ιδιότητες, και (ii) ο φθορισμός και η ενίσχυση Raman, τα σήματα της οποίας έτσι μπορούν και αποκτούν ιδιότητες φθορισμού εάν συνδυαστούν με κατάλληλα μόρια,
- καταλυτικές ιδιότητες –ιδιαίτερα σε αντιδράσεις οξειδοαναγωγής όπως η οξείδωση του μονοξειδίου του άνθρακα,
- χημική σταθερότητα και βιοσυμβατότητα, αφού εξαιτίας της πρώτης είναι ανθεκτικά στην οξείδωση και τη διάβρωση και έτσι είναι κατάλληλα για τη στοχευμένη παράδοση φαρμάκων, την απεικόνιση και άλλες βιοιατρικές εφαρμογές, και
- μαγνητικές και ηλεκτρικές ιδιότητες, επειδή αν και από μόνα τους δεν είναι μαγνητικά, συνδυαστικά με άλλα υλικά μπορούν τελικά να δώσουν νέα σύνθετα υλικά με μαγνητικές ιδιότητες και χρησιμοποιούνται σε νανοηλεκτρικές συσκευές λόγω καλής αγωγιμότητας.

Ο πλασμονιακός συντονισμός επιφανείας στα νανοσωματίδια χρυσού αξιοποιείται ευρέως λόγω των μοναδικών οπτικών ιδιοτήτων τους, και είναι έντονος σε αυτά λόγω της συνολικής ταλάντωσης των ελεύθερων ηλεκτρονίων τους κατά την έκθεσή τους σε ηλεκτρομαγνητικά κύματα –όπως το φως, Σε συγκεκριμένες συχνότητες χαρακτηριστικές για το μέγεθος, το σχήμα και το περιβάλλον τους, τα νανοσωματίδια έχουν έντονη απορρόφηση φωτός. Αν είναι σφαιρικά, η απορρόφηση γίνεται συχνά στα 520-550nm με αποτέλεσμα το χαρακτηριστικό κόκκινο ή μωβ χρώμα στα διαλύματά τους. Ο πλασμονιακός συντονισμός επιφανείας επηρεάζεται από το μέγεθος και το

σχήμα και το περιβάλλον τους, ενώ εφαρμόζουν σε βιοαισθητήρες, στην ιατρική απεικόνιση και στην νανοτεχνολογία λόγω αυτού (Zhang & Schwartz, 2021).

Ο τοπικός πλασμονιακός συντονισμός επιφανείας υπάρχει όταν ηλεκτρομαγνητικά κύματα αλληλεπιδρούν με ελεύθερα ηλεκτρόνια της επιφάνειας των νανοσωματιδίων χρυσού, προκαλώντας συλλογικές ταλαντώσεις ηλεκτρονίων, τα επιφανειακά πλασμόνια, και συγκριτικά με τον πλασμονιακό συντονισμό επιφανείας, εδώ υπάρχει περιορισμός σε δεδομένες νανοδομές, αναλόγως το μέγεθος, το σχήμα και το περιβάλλον τους. Εξαιτίας του, τα νανοσωματίδια χρυσού αποκτούν έντονο χρώμα λόγω απορρόφησης και σκέδασης του φωτός, με δεδομένη συχνότητα βάσει των ίδιων παραμέτρων, ενώ και σε αυτή την περίπτωση τα σφαιρικά νανοσωματίδια απορροφούν στα ίδια, όμως αυτό αλλάζει αναλόγως τον δείκτη διάθλασης του μέσου επιτρέποντας τον εντοπισμό μοριακών αλληλεπιδράσεων μέσω των μετατοπίσεων στο μήκος κύματος του τοπικού πλασμονιακού συντονισμού επιφανείας, και οι εφαρμογές του είναι παρόμοιες με αυτές του πλασμονιακού συντονισμού επιφανείας (Kelly et al., 2003).

### **2.5.1. Η τροποποίηση των νανοσωματιδίων χρυσού με βιολογικά μόρια**

Τα νανοσωματίδια χρυσού συνδέονται με βιολογικά μόρια με τη βοήθεια θειολικών ομάδων που έχουν υψηλή συγγένεια με τον χρυσό δημιουργώντας σταθερούς δεσμούς με αυτόν και επιτρέποντας την εύκολη προσκόλληση πολλών βιομορίων. Επίσης, λειτουργικοποιούνται με πρωτεΐνες ή αντισώματα για να εντοπίσουν στοχευμένα καρκινικά κύτταρα, συγκεκριμένα αντιγόνα και άλλους βιολογικούς στόχους, και ακόμη, συνδεόμενα με νουκλεϊκά οξέα επιτρέπουν την εφαρμογή τους σε γονιδιακές διαγνωστικές δοκιμές ή την νανομεταφορά γενετικού υλικού. Έπειτα, μέσω πολυσακχαριτών και γλυκανών μπορούν να έχουν καλύτερη βιοσυμβατότητα και να αναγνωρίσουν επιλεκτικά κύτταρα μέσω των επιφανειακών υποδοχέων που αυτά έχουν. Έτσι, χρησιμοποιούνται σε βιοαισθητήρες για την ανίχνευση βιομορίων με πολύ καλή ευαισθησία αφού η δέσμευση ενός στόχου μεταβάλλει την πλασμονιακή απορρόφηση και αυτό μπορεί και μετριέται με κατάλληλες τεχνικές -όπως ο τοπικός πλασμονιακός συντονισμός επιφανείας, σε στοχευμένη παράδοση φαρμάκων σε συγκεκριμένα κύτταρα ή ιστούς μέσω σύνδεσής τους με φαρμακευτικά μόρια ή αντισώματα και έτσι

μειώνονται οι παρενέργειες και αυξάνεται η αποτελεσματικότητα της θεραπείας, και στην βιοαπεικόνιση όπου τα τροποποιημένα νανοσωματίδια εφαρμόζουν στην απεικόνιση βιολογικών συστημάτων ενισχύοντας τα σήματα φθορισμού ή δρώντας ως αντιθετικές ουσίες σε απεικονιστικές μεθόδους. Ακόμη, όταν τροποποιούνται με βιολογικά μόρια είναι συχνά πιο σταθερά και βιοσυμβατά στο βιολογικό περιβάλλον, καθώς έτσι ελαττώνεται η τοξικότητα και μπορούν να κυκλοφορούν μακροχρόνια στον οργανισμό (Dreaden et al., 2012a).

Φυσικά, η σταθεροποίηση των νανοσωματιδίων χρυσού είναι σπουδαία για να εξασφαλιστεί η σταθερότητα, η διασπορά και η διατήρηση των ιδιοτήτων τους όταν εφαρμόζουν σε βιολογικά ή/ και χημικά περιβάλλοντα, και πραγματοποιείται με αρκετές τεχνικές, στις οποίες περιλαμβάνονται η χρήση σταθεροποιητικών παραγόντων, η λειτουργικοποίηση με βιολογικά μόρια και η φυσικοχημική προσέγγιση. Το κιτρικό οξύ είναι ένα αρκετά κοινό σταθεροποιητικό για την αναγωγική σύνθεση των νανοσωματιδίων χρυσού και δρα ως αναγωγικό και ως σταθεροποιητικό μέσω ηλεκτροστατικών απωθήσεων μεταξύ των νανοσωματιδίων, ενώ πολυμερή όπως η πολυβινυλοπυρρολιδόνη ή η πολυαιθυλενογλυκόλη μπορούν να τα καλύψουν προσφέροντας σταθερότητα μέσω στερεοχημικής απόθησης και ελαττώνοντας την πιθανότητα συγκόλλησης. Στην σταθεροποίηση μέσω λειτουργικοποίησης, οι ομάδες θειολών μέσω σταθερών δεσμών χρυσού-θείου συμβάλλουν στην προστασία τους από οξείδωση και υπερβολική συγκόλληση, ενώ σε περίπτωση βιολογικών μορίων όπως το DNA βελτιώνεται η σταθερότητα και μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε βιολογικά περιβάλλοντα διατηρώντας την βιοσυμβατότητά τους. Σε περίπτωση σταθεροποίησης μέσω ιοντικής ισχύος ή βαθμού οξύτητας τα οποία την επηρεάζουν, αν ρυθμιστούν κατάλληλα διατηρούν την διασπορά τους, ενώ στην θερμική σταθεροποίηση η κατάλληλη θερμοκρασία είναι αναγκαία για την αποφυγή συσσωματωμάτων και τη διατήρηση των ιδιοτήτων των νανοσωματιδίων χρυσού. Τέλος, η ηλεκτροστατική απόθεση μεταξύ φορτισμένων νανοσωματιδίων δεν επιτρέπει την συγκόλλησή τους εξασφαλίζοντας την σταθερότητα της διασποράς τους, ενώ τα ποικίλα στερεοχημικά σταθεροποιητικά όπως τα πολυμερή και τα μακρομόρια προσφέρουν έναν φυσικό φραγμό εμποδίζοντας έτσι την επαφή τους. (Daniel & Astruc, 2004).

Η σύνθεση των νανοσωματιδίων χρυσού με τη χρήση εκκινητών (ή αναγωγικών παραγόντων) είναι μια από τις πιο κοινές και αποτελεσματικές μεθόδους παραγωγής τους, αφού αυτοί είναι σπουδαίοι κατά την αναγωγή του χλωροχρυσικού οξέος

( $\text{HAuCl}_4$ ) σε στοιχειακό χρυσό, ένα βήμα που οδηγεί στο σχηματισμό νανοσωματιδίων. Στις πιο κοινές μεθόδους ανήκουν η σύνθεση μέσω της μεθόδου Τουρκέβιτς όπου ουσιαστικά κιτρικό νάτριο μειώνει το  $\text{HAuCl}_4$  σε στοιχειακό χρυσό προς τον σχηματισμό των νανοσωματιδίων χρυσού, η σύνθεση μέσω της μεθόδου βοροπυριτικού όπου το  $\text{HAuCl}_4$  διαλύεται σε νερό με την σταδιακή προσθήκη ασκορβικού οξέος που είναι ισχυρός αναγωγικός παράγοντας και η σύνθεση πραγματοποιείται σε χαμηλότερη θερμοκρασία συγκριτικά με τη μέθοδο Τουρκέβιτς, η σύνθεση μέσω της μεθόδου Μραστ-Σχιφριν όπου εκκινητής είναι το βοριοϋδρίδιο του νατρίου ως αναγωγικό, αλλά και η πράσινη σύνθεση με εκκινητές πολυσακχαρίτες, εκχυλίσματα φυτών και άλλες φυσικές ενώσεις ως αναγωγικά στοιχεία (Turkevich et al., 1951).

## 2.4. Οι Χρήσεις των Νανοσωματιδίων Χρυσού

Μία χρήση των AuNPs είναι αυτή στην ακτινολογία, όπου ενισχύουν την αντίθεση στην αξονική και την μαγνητική τομογραφία, ενώ χρησιμοποιούνται και σε διαγνωστικές εξετάσεις λόγω των ισχυρών οπτικών τους ιδιοτήτων (Dreaden et al., 2012b).

Τα AuNPs επίσης χρησιμεύουν ως φορείς φαρμακευτικών ενώσεων στην στοχευμένη θεραπεία, και μπορούν να τροποποιηθούν κατάλληλα για να στοχεύσουν εξειδικευμένα κύτταρα, να βελτιώσουν την ικανότητα του φαρμακευτικού προϊόντος αλλά και να ελαττώσουν τις πιθανές παρενέργειές του (Zhang et al., 2011).

Επίσης, τα εν λόγω νανοσωματίδια βρίσκουν εφαρμογή και στην φωτοθερμική θεραπεία κατά του καρκίνου, όπου απορροφούν φως και το μετατρέπουν σε θερμότητα ώστε να θανατώσουν τα καρκινικά κύτταρα, ενώ χρησιμοποιούνται επίσης ως μεταφορείς χημειοθεραπευτικών φαρμάκων κατευθείαν στοχευμένα στους καρκίνους (Huang et al., 2008).

Τα AuNPs επίσης χρησιμοποιούνται για να ενισχύσουν τον εντοπισμό σήματος σε βιοαισθητήρες και βρίσκουν εφαρμογή σε πολλούς αισθητήρες συμπεριλαμβανομένων των χρωματομετρικών, των ηλεκτροχημικών και των βασισμένων στον φθορισμό, προς την ανίχνευση βιολογικών μορίων όπως το DNA, οι πρωτεΐνες και διάφορα παθογόνα (Baptista et al., 2007).

Ακόμη, τα AuNPs χρησιμοποιούνται ως καταλύτες σε αρκετές χημικές αντιδράσεις λόγω της μεγάλης επιφάνειάς τους αλλά και των μοναδικών ηλεκτρονιακών ιδιοτήτων τους, και πρόκειται, μεταξύ άλλων, για αντιδράσεις οξειδοαναγωγής και σχηματισμού δεσμών άνθρακα (Corma et al., 2007).

Στις περιβαλλοντικές χρήσεις τους περιλαμβάνονται ο εντοπισμός και η αφαίρεση των ρυπαντών, αφού ενισχύουν την ευαισθησία των αισθητήρων για τον εντοπισμό βαρέων μετάλλων και άλλων μολυσματικών ουσιών στον αέρα και στο νερό (Rai et al., 2009).

Τέλος, τα AuNPs βρίσκουν εφαρμογή στον κλάδο των ηλεκτρονικών και των οπτικών, αφού χρησιμοποιούνται στην κατασκευή ηλεκτρονικών εξαρτημάτων όπως αγωγίμων μελανιών, αισθητήρων και νανοηλεκτρονικών συσκευών και οι οπτικές ιδιότητές τους τα καθιστούν πολύτιμα για τις διόδους εκπομπής φωτός (Light-Emitting Diodes; LED), τα φωτοβολταϊκά στοιχεία και για άλλες οπτικές εφαρμογές (Grzelczak et al., 2008).

## **2.5. Η Εφαρμογή των Νανοδομημάτων Χρυσού για τον Εντοπισμό Βιομορίων**

Οι εξαιρετικές ιδιότητες των AuNPs τα έχουν καταστήσει ως ένα πολυδύναμο εργαλείο στις βιοεπιστήμες για τον εντοπισμό βιομορίων. Αρχικά, χρησιμοποιούνται στην χρωματογραφική ανίχνευση όπου λειτουργούν μέσω ειδικών προσδετών ή αντισωμάτων που στοχεύουν βιομόρια και μετά την πρόσδεσή τους συσσωρεύονται προς την πρόκληση ορατής χρωματικής αλλαγής που εύκολα εντοπίζεται με γυμνό μάτι ή μέσω φασματοφωτομετρίας, όπως για τον εντοπισμό DNA, πρωτεϊνών και μικρών βιομορίων (Baptista et al., 2005).

Στην επιφανειακή βελτιωμένη σκέδαση Raman τα εν λόγω νανοδομημάτια εκτρέπουν το σήμα των μορίων που απορροφώνται στην επιφάνειά τους -κάτι που επιτρέπει τον εντοπισμό με ευαισθησία ακόμη και βιομορίων σε αρκετά χαμηλές ποσότητες-, και η μέθοδος εφαρμόζει στον εντοπισμό πρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων και μικρών μορίων (Grubisha et al., 2003).

Επίσης, στην ενίσχυση μέσω φθορισμού, τα AuNPs ενισχύουν τον φθορισμό των φθοροφόρων –κάτι που εξαρτάται από την απόσταση του νανοσωματιδίου και του φθοροφόρου. Η ιδιότητα αυτή βρίσκει εφαρμογή σε βιοαισθητήρες βάσει φθορισμού και χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό του DNA κατά τον υβριδισμό (Li & Rothberg, 2004).

Από την άλλη, τα AuNPs είναι σε θέση να τερματίσουν τον φθορισμό γειτονικών φθοροφόρων, και σε μια δοκιμασία εντοπισμού γενετικού υλικού ένας εκκινητής DNA έρχεται πολύ κοντά με ακρίβεια σε αυτά και μόλις υβριδιστούν και η απόσταση μεταξύ τους μεταβληθεί προκαλείται αλλαγή στην ένταση του φθορισμού – φυσικά η επάρκεια της εν λόγω μεθόδου στηρίζεται από την απόσταση μεταξύ των φθοροφόρων και των AuNPs και ουσιαστικά αυτό οδηγεί στην ένταση του φθορισμού (Dubertret et al., 2001).

Ο ηλεκτροχημικός εντοπισμός μορίων, όπως της γλυκόζης, της χοληστερόλης και άλλων μεταβολιτών διευκολύνεται μέσω της χρήσης AuNPs, αφού ενισχύουν την ευαισθησία των ηλεκτροχημικών αισθητήρων και παρέχουν μια μεγάλη επιφάνεια για την ακινητοποίηση βιομορίων και διευκολύνουν την μεταφορά ηλεκτρονίων (Wang et al., 2004).

Τέλος, τα AuNPs χρησιμοποιούνται και σε τοπικούς αισθητήρες συντονισμού πλασμονίου επιφάνειας όπου έχουν ισχυρή λειτουργικότητα ευαίσθητη στις αλλαγές του τοπικού δείκτη διάθλασης, κάτι που χρησιμοποιείται για την παρακολούθηση συμβάντων σύνδεσης σε πραγματικό χρόνο δίχως να χρειάζονται ετικέτες, και βρίσκουν εφαρμογή στην περίπτωση ανίχνευσης συνδέσεων αντιγόνων και αντισωμάτων (Mayer & Hafner, 2011).

## 3. ΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ

### 3.1. Τί Είναι οι Μικροοργανισμοί

Οι «μικροοργανισμοί» ή «μικρόβια», είναι πολύ μικροί ζωντανοί οργανισμοί που δεν είναι ορατοί με γυμνό μάτι, και μπορεί να είναι τα βακτήρια, τα αρχαία, οι ιοί, οι μύκητες, τα πρωτόζωα και τα φύκια. Είναι ικανοί να κατοικούν σε ποικίλα περιβάλλοντα, από την γη και το νερό, έως και ακραίες συνθήκες -λόγου χάριν θερμές πηγές αλλά και βαθείς αεραγωγούς των ωκεανών-, ενώ είναι πολύτιμοι για τα οικολογικά συστήματα, την ανθρώπινη υγεία και ένα ευρύ φάσμα βιομηχανικών διεργασιών (Madigan et al., 2018). Οι κατηγορίες των μικροοργανισμών θα συνοψιστούν στην παρακάτω παράγραφο.

### 3.2. Οι Κατηγορίες των Μικροοργανισμών

Οι μικροοργανισμοί, όπως συζητούνται στο βιβλίο των Madigan et al. (2018), διακρίνονται στις εξής κύριες κατηγορίες:

- τα βακτήρια, που είναι μονοκύτταροι προκαρυώτες με ποικίλα μεγέθη -όπως κόκκοι και βάκιλοι-, εντοπιζόμενοι σε διάφορα περιβάλλοντα, ενώ μπορεί να είναι παθογόνα ή μη παθογόνα,
- οι ιοί, που χαρακτηρίζονται συχνά ως ακυτταρικές μορφές ζωής που χρειάζονται έναν ξενιστή για να αναπαραχθούν και είναι συχνά παθογόνοι, ενώ αποτελούνται από DNA ή RNA περιβαλλόμενο από ένα πρωτεϊνικής φύσεως επικάλυμμα,
- τα αρχαία, τα οποία είναι προκαρυώτες παρόμοιοι με τα βακτήρια ωστόσο έχουν διαφορετικά βιοχημικά και γενετικά χαρακτηριστικά και συχνά επιβιώνουν σε περιβάλλοντα αντίξωων συνθηκών όπως σε πολύ θερμά περιβάλλοντα, αλμυρές λίμνες ή στα βάθη των ωκεανών,
- οι μύκητες, που είναι ευκαρυώτες στους οποίους συμπεριλαμβάνονται οι ζύμες, η μούχλα και τα μανιτάρια, και είναι πολύτιμοι για την αποσύνθεση και τον κύκλο των θρεπτικών συστατικών, όμως μπορούν να προκαλέσουν μολύνσεις,



- τα πρωτόζωα, τα οποία είναι μονοκύτταροι προκαρυώτες -όπως οι αμοιβάδες και είδη πλασμοδίου- με συχνά σύνθετους κύκλους αναπαραγωγής, και μπορεί να ζούνε ελεύθερα ή να παρασιτούν σε ξενιστές, και
- τα φύκια, που είναι ευκαρυώτες μονοκύτταροι ή και μεγάλοι πολυκύτταροι οργανισμοί -λόγου χάριν τα θαλάσσια φύκη- που φωτοσυνθέτουν και υπάρχουν πρωτίστως σε θαλάσσια περιβάλλοντα.

### 3.3. Η Λοίμωξη

Η «*λοιμωξη*» είναι ουσιαστικά η είσοδος και η αναπαραγωγή των μικροοργανισμών - όπως αυτοί που συζητήθηκαν στην προηγούμενη παράγραφο- εντός του σώματος του ξενιστή, βλάπτοντας τους ιστούς τους και εγείροντας ανοσολογική απόκριση. Μια λοίμωξη μπορεί να εντοπίζεται συγκεκριμένα σε κάποιο σημείο ή ιστό του ξενιστή ή να είναι συστηματική και μπορεί να είναι ήπια αλλά και απειλητική για τη ζωή, αφού οι παθογόνοι μικροοργανισμοί συγκεκριμένα διαταράσσουν την φυσιολογική σωματική λειτουργία και προκαλούν πυρετό, φλεγμονή, πόνο και άλλα συμπτώματα λόγω των επιπλοκών που επιφέρουν στην υγεία του ξενιστή (Nester et al., 2018).

Ωστόσο, θα πρέπει να αναφερθεί, πως, στα αγγλικά, ο όρος είναι «*infection*», μια λέξη που στο λεξικό Merriam-Webster (n.d.) αρχικά ερμηνεύεται ως «*η κατάσταση όπου παράγεται από την εγκαθίδρυση ενός ή περισσοτέρων παθογονικών παραγόντων (όπως βακτήρια, πρωτόζωα ή ιοί) εντός ή πάνω στο σώμα ενός κατάλληλου ξενιστή*», αλλά ερμηνεύεται παρακάτω και ως «*η ασθένεια που προκαλείται λόγω της λοίμωξης*»· βέβαια, σε άλλες επιπρόσθετες ερμηνείες του όρου υπάρχει και η «*η επικοινωνία συναισθημάτων ή ιδιοτήτων μέσω παραδείγματος ή επαφής*» αλλά και «*η δράση ή το αποτέλεσμα της διαφθοράς των ηθών ή του χαρακτήρα κ.α. από κάποιον*». Δηλαδή, ο αγγλικός όρος, παρά την μεταφορική χρήση του, έχει δύο έννοιες, αυτές της εισβολής παθογόνων μικροοργανισμών αλλά και της ασθένειας λόγω αυτών. Φυσικά, κάτι τέτοιο δε συμβαίνει με τον ελληνικό όρο, αφού, κατά τον Μπαμπινιώτη (2002), η λέξη «*λοιμωξη*» προέρχεται από την αρχαιοελληνική λέξη «*λοιμός*» που σημαίνει επιδημία, και συνδέεται με την έννοια της εξάπλωσης μολυσματικών ασθενειών οι οποίες επηρεάζουν πλήθη ανθρώπων.

Το συγκεκριμένο ζήτημα ήταν σημείο το οποίο οδήγησε σε αρκετές ανακρίβειες και ασάφειες επί της πρόσφατης πανδημίας της ασθένειας του κορονοϊού, με αποτέλεσμα να υπάρχουν ψευδείς δηλώσεις για «ασθένεια» μέσα από ένα θετικό τεστ ανίχνευσης του ιού, ενώ ένας λοιμώδης νόσσημα είθισται να χρειάζεται -εκτός από ιστορικό έκθεσης ενός ανθρώπου στον ιού/ φορείς του- σχετική συμπτωματολογία, εργαστηριακά και ακτινολογικά ευρήματα που προσομοιάζουν την ασθένεια. Έτσι, εκτός από τα ψευδή τεστ που υπήρξαν, υπήρξε και ψευδής απόδοση ενός θετικού τεστ στην ασθένεια παρά στην μόλυνση –που σαφώς πολλοί παράγοντες επηρεάζουν το κατά πόσο και πότε και σε τί βαθμό μια απλή μόλυνση θα εξελιχθεί σε λοιμώδη ασθένεια (Mouliou & Gourgoulianis, 2021).

### **3.4. Οι Παθογόνοι Μικροοργανισμοί που Χρησιμοποιήθηκαν στην Παρούσα Εργασία**

Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία παρουσιάζονται παρακάτω, ωστόσο θα πρέπει να επισημανθεί πως μονάχα οι δύο πρώτοι (η *Salmonella Enteritidis* και ο *Bacillus Cereus*) διερευνήθηκαν για τον εντοπισμό του γενετικού τους υλικού βάσει των νανοσωματιδίων χρυσού ενώ οι υπόλοιποι χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες.

#### **3.4.1. Η *Salmonella Enteritidis***

Οι σαλμονέλλες είναι κινητοί Gram- βάκιλοι που μολύνουν ή εισβάλλουν στον άνθρωπο και προκαλούν κλινικές λοιμώξεις ποικίλων κλινικών χαρακτηριστικών όπως η γαστρεντερίτιδα, ο πυρετός, η βακτηραιμία και η χρόνια κατάσταση φορέα. Στις ανεπτυγμένες χώρες, όπως στις Ηνωμένες Πολιτείες, η πιο κοινότυπη μορφή μόλυνσης από σαλμονέλα εμφανίζεται ως γαστρεντερίτιδα ή/ και εντεροκολίτιδα. Μέσω της χρήσης εκκρινόμενων παραγόντων λοιμογόνου δράσης, η σαλμονέλα εισέρχεται στο επιθήλιο του εντέρου μέσω των Μ κυττάρων πριν φτάσει στα λεμφοκύτταρα των πλακών Peyer, και μετά εισέρχεται στα μακροφάγα και διαχέεται σε όλο το δικτυοενδοθηλιακό σύστημα πριν οδηγήσει σε συστηματική λοίμωξη. Η λοίμωξη από σαλμονέλα ενδεχομένως να εμπλέκεται σε βακτηραιμία, οστεομυελίτιδα, μηνιγγίτιδα,

γαστρεντερίτιδα και λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος. Για την εντερίτιδα, η έναρξη είναι σταδιακή και μπορεί να παρουσιαστεί με πυρετό, πονοκέφαλο, κακουχία και λήθαργο, αλλά και κοιλιακό άλγος, δακτυλίτιδα, ηπατοσπληνομεγαλία και λεύκανση ερυθριματώδους ωχράς κηλίδας ή κηλιδοβλατιδώδες εξάνθημα, ενώ ξεκινά με διάρροια ή δυσκοιλιότητα. Οι σοβαρές λοιμώξεις μπορούν να προκαλέσουν σήψη, σοκ και κακή ψυχολογία λόγω μηνιγγίτιδας, ενώ η αιματηρή διάρροια είναι ένα πιο σπάνιο σύμπτωμα. Από την άλλη, η αφυδάτωση είναι κοινότυπη στην εντερίτιδα από σαλμονέλλα, και πρέπει να αντιμετωπίζεται άμεσα (Ajmera & Shabbir, 2024).

### 3.4.2. O *Bacillus Cereus*

Ο χρυσίζων βάκιλος είναι ένα Gram+ βακτήριο που συχνά εντοπίζεται κατά λάθος ή συγχέεται με άλλα είδη όπως ο *Staphylococcus aureus* το οποίο είναι ένα πολύ γνωστό παθογόνο που προκαλεί αρκετές ασθένειες, ενώ ο *Bacillus cereus* είναι ίσως ο πιο αντικειμενικός εκπρόσωπος του γένους *Bacillus* και συνήθως του αποδίδουν τροφιμογενείς ασθένειες. Το εν λόγω βακτήριο είναι ευρέως διαδεδομένο και ευρισκόμενο σε ποικίλα περιβάλλοντα όπως το έδαφος, η βλάστηση και τα τρόφιμα, έχει συσχετιστεί με εστίες τροφικής δηλητηρίασης επειδή παράγει τοξίνες, και φυσικά μπορεί να μολύνει ένα ευρύ φάσμα τροφίμων, ενώ οι τροφιμογενείς επιδημίες του αναφέρονται με ποικίλα ποσοστά εμφάνισης σε παγκόσμιο επίπεδο. Χαρακτηρίζεται από ναυτία και έμετο, αυτή η μορφή προκαλείται από την κατάποση προσχηματισμένων τοξινών σε μολυσμένα τρόφιμα. Συχνά, τα σημάδια εμφανίζονται εντός 1-6 ωρών μετά την κατανάλωση και υποχωρούν εντός μιας ημέρας, και αυτή η μορφή προκύπτει από την κατάποση βακτηριακών σπορίων που μετά παράγουν εντεροτοξίνες στο έντερο, με αποτέλεσμα να προκύπτουν κοιλιακές κράμπες, διάρροια και συχνά ναυτία, που εμφανίζονται 6-15 ώρες μετά την κατάποση και διαρκούν πάλι για μια μέρα. Εξαιτίας της αφυδάτωσης που προκαλείται χορηγούνται από του στόματος διαλύματα ενυδάτωσης ή ενδοφλέβια υγρά για την πρόληψή της, τα αντιεμετικά είναι απαραίτητα για τον έλεγχο της σοβαρής ναυτίας και του εμέτου, ενώ τα αντιβιοτικά δεν είναι αναγκαία σε τροφιμογενείς λοιμώξεις αφού η ασθένεια είναι συχνά αυτοπεριοριζόμενη, ωστόσο σε σοβαρές ή/ και συστηματικές λοιμώξεις, μπορεί να κρίνονται αναγκαία (Bottone, 2010).

### **3.4.3. Η Klebsiella Pneumoniae**

Εδώ πρόκειται για ένα ραβδοειδές Gram- βακτήριο της οικογένειας των εντεροβακτηρίων που προκαλεί τις κοινότερες νοσοκομειακές λοιμώξεις και σοβαρές λοιμώξεις στο αναπνευστικό, το ουροποιητικό, το κυκλοφορικό και άλλα συστήματα του σώματος. Υπάρχει συχνά στην εντερική χλωρίδα υγιών ατόμων ενώ μπορεί να επιφέρει σοβαρές λοιμώξεις σε άλλες θέσεις ή σε ανοσοκατεσταλμένους, και είναι γνωστό για την ανθεκτικότητά του έναντι αντιβιοτικών –συνεπώς είναι κύρια απειλή για τη δημόσια υγεία. Στα συμπτώματα που προκαλεί περιλαμβάνονται η πνευμονία, οι ουρολοιμώξεις, η σηψαιμία και οι λοιμώξεις μαλακών μορίων, ενώ και σε αυτή την περίπτωση χορηγούνται αντιβιοτικά, ενδοφλέβια υγρά, οξυγόνο και άλλα μέτρα πρόληψης κατά της διασποράς και υπέρ της πρόληψής της (Podschun & Ullmann, 1998).

### **3.4.4. Η Escherichia Coli**

Και σε αυτήν την περίπτωση πρόκειται για ένα ραβδοειδές Gram- βακτήριο και μέρος της μικροχλωρίδας του εντέρου του ανθρώπου και αρκετών άλλων θηλαστικών όπου συνήθως είναι ακίνδυνο και βοηθά στην πέψη του ξενιστή, όμως μερικές φορές δύναται να οδηγήσει σε κρίσιμες λοιμώξεις. Υπάρχει σε αρκετά περιβάλλοντα συμπεριλαμβανομένων του εδάφους και του νερού και μερικά παθογόνα στελέχη του οδηγούν σε λοιμώξεις μέσω μολυσμένου νερού ή τροφίμων, προκαλώντας ουρολοιμώξεις, γαστρεντερίτιδα, σηψαιμία και άλλες ποικίλες λοιμώξεις. Το εντεροτοξινογόνο στέλεχος προκαλεί μέτριας μορφής διάρροια, το εντεροαιμορραγικό στέλεχος προκαλεί σοβαρή διάρροια συχνά αιμορραγικής φύσεως με κοιλιακό άλγος και εμετό και αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο που οδηγεί σε νεφρική ανεπάρκεια, και το ουροπαθογόνο στέλεχος είναι το κύριο αίτιο ουρολοιμώξεων προκαλώντας επώδυνη συχνουρία και πυρετό, ενώ τέτοιες λοιμώξεις αντιμετωπίζονται μέσω χορήγησης υγρών και ηλεκτρολυτών, αντιβιοτικών και υποστηρικτικής φροντίδας (Nataro & Kaper, 1998).

### 3.4.5. Η Candida Albicans

Αυτή τη φορά πρόκειται για έναν μύκητα που είναι δυνητικά παθογόνος επειδή ανήκει ήδη στην χλωρίδα του ανθρώπινου εντέρου -κυρίως στον γαστρεντερικό σωλήνα και το δέρμα- χωρίς να προκαλεί προβλήματα σε φυσιολογικές συνθήκες, όμως σε περίπτωση μικροβιολογικής ανισορροπίας ή ανοσολογικής εξασθένησης επιφέρει λοιμώξεις, και μάλιστα είναι το πιο κοινό αίτιο των μυκητιακών λοιμώξεων. Οι εν λόγω λοιμώξεις είναι γνωστές ως καντιντιάσεις, με την στοματική καντιντίαση να χαρακτηρίζεται από λευκές κηλίδες και πόνο, την κολπική καντιντίαση να χαρακτηρίζεται από κνησμό και λευκές εκκρίσεις, την δερματική καντιντίαση που προκαλεί ερυθρότητα, κνησμό και εξανθήματα στις δερματικές περιοχές, και την συστηματική καντιντίαση να είναι η πιο σοβαρή μορφή επηρεάζοντας όργανα και είναι απειλητική για τη ζωή μέσω πολύ υψηλού πυρετού. Οι καντιντιάσεις αντιμετωπίζονται με αντιμυκητιασικά φάρμακα, με αλλαγές της διατροφής και του τρόπου ζωής, αλλά και με έγκαιρη αντιμετώπιση των παραγόντων που προδιαθέτουν στην εκδήλωσή τους (Calderone & Fonzi, 2001).

## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

### **ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ**

#### **Ο Σκοπός της Παρούσας Εργασίας**

Σκοπός αυτής της πειραματικής πτυχιακής είναι, μέσα από μια σειρά πειραμάτων, η ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών, πιο συγκεκριμένα της *Salmonella Enteritidis* και του *Bacillus Cereus* με τη βοήθεια νανοσωματιδίων χρυσού.

#### **Ο Βασικός Πειραματικός Άξονας που Ακολουθήθηκε στην Παρούσα Εργασία**

Σε πρώτη φάση, δημιουργήθηκε το διάλυμα νανοσωματιδίων χρυσού και εκκινήτων για τους μικροοργανισμούς - στόχους *Salmonella Enteritidis* και *Bacillus Cereus*. Στη συνέχεια απομονώθηκε το DNA των στόχων και μετρήθηκε, και τέλος ακολούθησε η δοκιμασία με HCl για την παρατήρηση των τελικών αποτελεσμάτων.

#### **Το πρώτο μέρος του πειράματος:**

Για την παρασκευή των νανοσωματιδίων χρυσού παρασκευάστηκαν τέσσερα ρυθμιστικά διαλύματα:

- ρυθμιστικό διάλυμα αλάτων (0.0562g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.0125g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  και 5.844g  $\text{NaCl}$  σε απιονισμένο νερό 50 mL)
- ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (0,562g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  και 0,125g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  σε απιονισμένο νερό 50 mL)

- δωδεκυλοθειικό νάτριο (1g σκόνης SDS σε 50ml απιονισμένο νερό)
- ρυθμιστικό διάλυμα δοκιμής (0,0562g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,0125g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,4383g NaCl και 500μL SDS (10%))

Στη συνέχεια, 1mL ετοιμών νανοσωματιδίων χρυσού 20nm αναδεύτηκαν με 40μL από τον εκκινητή SA01/ και 40μL από τον εκκινητή SA02/ και αφέθηκαν για 24h σε θερμοκρασία δωματίου μέσα σε γυάλινο μπουκαλάκι τυλιγμένο με αλουμινοχαρτό. Έπειτα, προστέθηκαν 108μL του δεύτερου ρυθμιστικού και 12μL του τρίτου ρυθμιστικού διαλύματος, και μετά από επώαση για 30' σε κίνηση προστίθενται 180μL NaCl σε 6 δόσεις ανά 8h και αφέθηκε σε ηρεμία για 24h. Τέλος, έγινε ο καθαρισμός των νανοσωματιδίων χρυσού, όπου το διάλυμα μεταφέρεται από το γυάλινο μπουκαλάκι σε erpendolf και φυγοκεντρήθηκε στις 20000rpm για 20' και προστίθενται 500μL του τελευταίου ρυθμιστικού διαλύματος, και η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε για 5 φορές.

Για πειραματικούς σκοπούς ακολουθήθηκε και η ίδια διαδικασία με την σημαντική διαφορά ότι προστέθηκε μόνο ο ένας εκκινητής SA01 για την δημιουργία ενός διαλύματος με έναν εκκινητή, εξαιτίας του οποίου αλλάζουν και οι όγκοι των διαλυμάτων που έπρεπε να προστεθούν, ωστόσο η διαφορά ήταν αμελητέα και δεν λήφθηκε υπόψιν.

### **Το δεύτερο μέρος του πειράματος:**

Για την απομόνωση του DNA των μικροοργανισμών – στόχων, εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο Απομόνωσης DNA με Χρήση του MagCore Plus II (RBC Bioscience, n.d.). Αρχικά, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν και επαναδιαλύθηκαν στο ρυθμιστικό διάλυμα λύσης και στη συνέχεια ακολούθησε η πέψη με την πρωτεΐνάση K, όπου πρώτα το δείγμα μεταφέρθηκε στον σωλήνα και μετά προστέθηκε διάλυμα λύσης, ενώ μετά προστέθηκαν 20μl από διάλυμα 20mg/ml πρωτεΐνάσης K και ακολούθησε ανάδευση. Κατόπιν, έγινε επώαση για 30' ώστε να διασπαστούν οι πρωτεΐνες και να απελευθερωθεί το DNA. Μετά, το δείγμα μεταφέρθηκε στην κασέτα του MagCore και ακολούθησε η απομόνωση του DNA. Το DNA συλλέχθηκε, μετρήθηκε η συγκέντρωσή του και αποθηκεύτηκε στους -20°C.

## **Το τρίτο μέρος του πειράματος:**

Το πείραμα ολοκληρώθηκε με τον εξής τρόπο: ποσότητα DNA των μικροοργανισμών στόχων, το οποίο προηγουμένως έχει φωτομετρηθεί για να είναι γνωστή η συγκέντρωση του DNA τοποθετήθηκαν στη Real-Time PCR για αποδιάταξη στους 95°C για 10min (οι τιμές ήταν μεταβαλλόμενες για να επιτευχθεί το ιδανικό αποτέλεσμα). Στη συνέχεια, προστέθηκε στο ίδιο eppendorf ποσότητα από το διάλυμα των νανοσωματιδίων χρυσού και τοποθετήθηκαν πάλι στη Real-Time PCR για υβριδισμό στους 56°C για 20min. Μετά τον υβριδισμό τα δείγματα αφέθηκαν για λίγο να πάρουν θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, προστέθηκε πρώτα στα αρνητικά δείγματα HCl 0.1N μέχρι να αρνητικοποιηθούν και η ποσότητα που χρειάστηκε για να αρνητικοποιηθούν τα αρνητικά δείγματα προστέθηκε και σε αυτά που θεωρούνται θετικά. Αν μείνει το αρχικό τους χρώμα (ροζ) τότε τα δείγματα θα ήταν θετικά, ενώ αν παρατηρηθεί αλλαγή του ροζ χρώματος σε μοβ τότε τα δείγματα θα είναι αρνητικά ή, στην περίπτωση πολύ μεγάλων αραιώσεων, δεν θα ανιχνευόταν DNA.

## **Τα Υλικά που Χρησιμοποιήθηκαν στην Παρούσα Εργασία**

Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα, δηλαδή η *Salmonella Enteritidis*, ο *Bacillus cereus*, η *Klebsiella Pneumoniae*, η *E. Coli* και η *Candida* είναι κλινικής προέλευσης.

Για το πρώτο πειραματικό μέρος, για την παρασκευή των χρυσών νανοσωματιδίων χρησιμοποιήθηκαν  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , φυγόκεντρος Thermo Scientific SL 16R Centrifuge, απιονισμένο νερό, μικρός αναδευτήρας, εκκινητές και φασματοφωτόμετρο Epoch. Τα νανοσωματίδια χρυσού που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από την εταιρεία Nanopartz. Η εταιρεία αυτή διαθέτει νανοσωματίδια με διαμέτρους μεταξύ 1,8-150nm με ακρίβεια μεγέθους έως 0,1nm και με μέγεθος διακύμανσης λιγότερο από 0,2% σε μεγέθη μεγαλύτερα από 40nm. Οι κορυφές επιφανειακού συντονισμού πλασμονίου κυμαίνονται μεταξύ 505-612nm. Κάθε παρτίδα χαρακτηρίζεται από το μέγεθος, τη μονοδιασπορά, τη συνάθροιση, τα υπολείμματα χημικών ουσιών και τη συγκέντρωση. Η μέθοδος παρασκευής που προτείνεται από την συγκεκριμένη εταιρεία επιτρέπει τη χρήση ενός αναγωγικού παράγοντα που μπορεί να



χρησιμοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου. Τα νανοσωματίδια χρυσού που χρησιμοποιήθηκαν στην πραγματοποίηση των πειραμάτων είχαν συγκεκριμένα δεδομένα τα οποία παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα, βάση του πρωτοκόλλου της Nanopartz (Nanopartz Inc):

**Πίνακας 1** Τα νανοσωματίδια χρυσού που χρησιμοποιήθηκαν.

Οικογένεια προϊόντος	σφαιρικά νανοσωματίδια χρυσού
LOT	SPC445
Διάμετρος	20nm
Εμφάνιση	κολλοειδής χρυσός
καλυπτικό μέσο	Nanopartz καρβοξυλικό οξύ
υπερκείμενο	18MEG DI νερό
pH	7
γραμμομοριακότητα	1.02E+3
οπτική πυκνότητα	1
κορυφή επιφανειακού συντονισμού πλασμονίου	514-520nm
χρόνος ζωής	6 μήνες στους 4 <sup>0</sup> C ή σε θερμοκρασία δωματίου

**Πίνακας 2** οι ακολουθίες βάσεων, η θερμοκρασία τήξης και το μέγεθος των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για τους εκκινητές

Εκκινητές	Αλληλουχία 5'3'	T <sub>m</sub> [°C]	Μέγεθος (bp)
SA01	[thiolC6]AAAAAAAAAATATCGTACTGGCGATATTGGTGTTTA	62.6	36
SA02	[thiolC6]AAAAAAAAAAGGACAAATCCATACCATGGCGAGTC A	66.1	
BACILLUS CEREUSr	[thiolC6]AAAAAAAAAACGACGTGTCAATTCACGCGC	64.0	30
BACILLUS CEREUSf	[thiolC6]AAAAAAAAAATCATGAAGAGCCTGTGTACG	61.3	30

Στη συνέχεια, για την απομόνωση του DNA των μικροοργανισμών χρησιμοποιήθηκαν αρχικά ο αναλυτικός ζυγός (440-35N, KERN), θερμομπλόκ (M501-HB, MPM Instruments s.r.l.), φυγόκεντρος Thermo Scientific SL 16R Centrifuge, γερμανικά φιαλίδια Eppendolfs, πιπέτες των 200μL και των 1000μL και τα αντίστοιχα πώματα για τις πιπέτες και φθορισμόμετρο Quantus.

Για το δεύτερο μέρος του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν η πρωτεΐνάση K σε διάλυμα όπως υπήρχε στο κιτ, το όργανο MagCore Plus II, δείγματα αίματος, ένα ρυθμιστικό διάλυμα λύσης των κυττάρων, κασέτες MagCore και αντιδραστήρια.

Θα πρέπει να σημειωθεί πως όλα τα πειράματα έγιναν σε διαγνωστικό κέντρο, κάτω από την επίβλεψη του επιβλέποντα καθηγητή σε άριστες πειραματικές συνθήκες. Οι πάγκοι και όλα τα όργανα του πειράματος ήταν αποστειρωμένα. Με τις υποδείξεις του επιβλέποντα καθηγητή, η πειραματική πορεία ακολούθηθηκε κατά γράμμα, ενώ δόθηκε ιδιαίτερη προσοχή σε κάθε βήμα, για την αποφυγή επιπόλαιων λαθών.

## **Τα Πειράματα που έγιναν Αναλυτικά ανά Ημερομηνία**

### **1. 22/10/2023**

Το πείραμα έγινε με διαδοχικές εκατοστιαίες αραιώσεις διαλύματος Salmonella συγκέντρωσης 5,62ng/μl, όπου αρχικά παρασκευάστηκε ένα τυφλό δείγμα ως αρνητικός μάρτυρας με 20μl απιονισμένου νερού και 20μl Au-Np2. Από την αραιώση λήφθηκαν  $10^8$  20μl DNA και 20μl διαλύματος νανοσωματιδίων χρυσού 2 εκκινητών (Au-Np2), και λήφθηκαν από το  $10^6$  10μl DNA και 20μl Au-Np2, 15μl DNA και 20μl Au-Np2 και 20μl DNA και 20μl Au-Np2. Προτού την ανάμιξη είχε προηγηθεί θέρμανση για 5min στους 95°C (αποδιάταξη PCR) και ύστερα τα μίγματα θερμάνθηκαν για 15min στους 58°C (υβριδισμός)

### **2. 23/10/2023**

Έγινε απομόνωση DNA από Salmonella Enteritidis, Klebsiella Pneumoniae, Escherichia Coli και μετρήθηκαν οι συγκεντρώσεις τους: Salmonella Enteritidis 1=60ng/μl, Salmonella Enteritidis 2=46ng/μl, Escherichia Coli =1,40ng/μl (δεν χρησιμοποιήθηκε σε αυτό το πείραμα και αποθηκεύτηκε για επόμενα πειράματα),

*Klebsiella Pneumoniae* =56ng/μl. Δεν ενδιαφέρει η συγκέντρωση των αρνητικών μαρτύρων (*Escherichia coli*, *Klebsiella Pneumoniae*), μόνο το γεγονός ότι υπάρχει μια μετρήσιμη ποσότητα DNA στο διάλυμα. Ο σκοπός είναι να αποδειχτεί ότι με τη μέθοδο αυτή μπορεί να γίνει εντοπισμός της *Salmonella Enteritidis* και όχι κάποιου άλλου μικροοργανισμού (ειδικότητα της μεθόδου). Λόγω παραπλήσιων συγκεντρώσεων έγινε μίξη της *Salmonella Enteritidis* 1 και 2, με το τελικό διάλυμα να έχει συγκέντρωση 50ng/μl. Στη συνέχεια έγινε και μια διαδοχική αραιώση για την *Salmonella Enteritidis* και την *Klebsiella Pneumoniae* 1:10 και μετά χρησιμοποιήθηκαν αυτές οι δύο αραιώσεις για την δοκιμή με HCl με την *Klebsiella Pneumoniae* να έχει τον ρόλο του αρνητικού μάρτυρα. Προτού γίνει η ανάμιξη έχει προηγηθεί θέρμανση για 5min στους 95°C (αποδιάταξη PCR) και ύστερα θερμαίνονται τα μίγματα για 15min στους 58°C (υβριδισμός)

### 3. 23/10/2023

Έγινε 2<sup>ο</sup> πείραμα την ίδια μέρα, χρησιμοποιώντας τα αρχικά δείγματα *Salmonella Enteritidis* και *Klebsiella Pneumoniae* (όχι αραιώσεις), με συγκέντρωση *Salmonella Enteritidis*= 50ng/μl. Η διαφορά σε αυτό το πείραμα ήταν, ότι αυξήθηκε ο χρόνος υβριδισμού στα 20min και προτού γίνει η ανάμιξη είχε προηγηθεί θέρμανση για 5min στους 95°C (αποδιάταξη) και ύστερα θερμάνθηκαν τα μίγματα για 20min στους 58°C (υβριδισμός)

### 4. 24/10/2023

Σε αυτό το πείραμα χρησιμοποιήθηκε *Salmonella Enteritidis* 10<sup>-1</sup> και *Escherichia Coli* (αρνητικός μάρτυρας), και η συγκέντρωση *Salmonella Enteritidis*= 50ng/μl, ενώ προτού γίνει η ανάμιξη προηγήθηκε θέρμανση για 5min στους 95°C (αποδιάταξη) και ύστερα θερμάνθηκαν τα μίγματα για 20min στους 58°C (υβριδισμός)

### 5. 27/10/2023

Το πείραμα αυτό έγινε με σκοπό να δειχθεί η ευαισθησία της μεθόδου, και έγιναν αραιώσεις μέχρι και 10<sup>-3</sup> (1:1000) και χρησιμοποιήθηκαν Au-Np2 (2 εκκινητές) σε

συγκέντρωση *Salmonella Enteritidis* =50ng/μl, και προτού γίνει η ανάμιξη είχε προηγηθεί θέρμανση για 5min στους 95°C (αποδιάταξη), ενώ ύστερα θερμάνθηκαν τα μίγματα για 20min στους 58°C (υβριδισμός)

6. 30/10/2023

Για αυτό το πείραμα κάναμε περαιτέρω αραιώσεις, μέχρι και  $10^{-5}$ , ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήσαμε *Klebsiella Pneumoniae*, *Candida Albicans* και *Escherichia Coli*, ενώ οι πειραματικές συνθήκες για την αποδιάταξη και τον υβριδισμό είναι οι ίδιες με το προηγούμενο πείραμα

7. 31/10/2023

Επαναλήφθηκε το ίδιο πείραμα χωρίς την ύπαρξη της *Klebsiella Pneumoniae*, στις ίδιες πειραματικές συνθήκες, όμως την ίδια μέρα έγινε άλλο ένα ίδιο πείραμα με αρνητικό μάρτυρα την *Escherichia Coli* με 25μl DNA και με θερμοκρασία υβριδισμού στους 56°C

8. 27/11/2023

Έγινε το ίδιο πείραμα της προηγούμενης φορές

9. 6/12/2023

Παρασκευάστηκαν νέα διαλύματα Au-Np με 2 εκκινητές από κάθε μικροοργανισμό που θα χρησιμοποιηθούν στα επόμενα πειράματα (Au-Np S για την *Salmonella Enteritidis* και Au-Np B.c για τον *Bacillus Cereus*)

10. 15/1/2024

Για το πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκαν 2 διαδοχικές αραιώσεις του *Bacillus Cereus* 1:10 και 1:100, η *Klebsiella Pneumoniae* αποτέλεσε τον αρνητικό μάρτυρα, έγινε αποδιάταξη (95°C) και υβριδισμός στους 56°C για 20'

11. 17/1/2024

Έγινε επανάληψη του προηγούμενου πειράματος, με διαφορετικούς όγκους και αυξημένη θερμοκρασία υβριδισμού από του 56°C στους 57°C

12. 21/1/2024

Επανάληψη του προηγούμενου πειράματος με διαφορετικούς όγκους, χρόνο και μειωμένη θερμοκρασία υβριδισμού στους 55° C

13. 22/1/2024

Απομόνωση μικροοργανισμών *Klebsiella Pneumoniae*, *Salmonella Enteritidis* και *Escherichia Coli*. Δημιουργείται μείγμα από κάθε μικροοργανισμό με 800μl ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών, προστίθενται σε κάθε μικροοργανισμό από 20μl πρωτεΐνης για τη διάσπαση κυτταρικής μεμβράνης και ύστερα ακολουθεί θέρμανση των μιγμάτων και ανάδευση τους ανά 2' για συνολικά 6'. Λόγω των μεγάλων συγκεντρώσεων έγινε και μια αραιώση στην *Salmonella Enteritidis* και την *Klebsiella Pneumoniae* 1:10. Συγκεντρώσεις DNA: *Salmonella Pneumoniae* C=72ng/μl όπου έγινε αραιώση 1:10, *Escherichia Coli* C=77ng/μl έμεινε όπως είναι λόγω μικρής ποσότητας, και *Klebsiella Pneumoniae* C=63 ng/μl όπου έγινε αραιώση 1:10, ενώ παρακάτω έγινε χρήση όλων των δειγμάτων, πυκνών και αραιωμένων

14. 3/2/2024

Σε αυτό το πείραμα χρησιμοποιήθηκαν και Au-Np S και Au-Np B.c με αρνητικό μάρτυρα την *Escherichia Coli*, έγινε αποδιάταξη 95°C 10min και υβριδισμός στους 56°C για 20min. Συγκεντρώσεις DNA: *Salmonella Enteritidis* = 72ng/μl σε αραιώση 1:10 και *Bacillus Cereus* = 56ng/μl

Ακολούθησε προσθήκη HCl όπως δείχνει ο παρακάτω πίνακας

**Πίνακας 3.** Προσθήκη HCl

Μικροοργανισμοί	Ποσότητα HCL (προσθήκη κάθε φορά)					
Salmonella Enteritidis	2μl	1μl	1μl	0.5μl	0.5μl	-
Salmonella Enteritidis 1:10	2μl	1μl	1μl	0.5μl	0.5μl	-
Escherichia Coli ( Au-Np S)	2μl	1μl	1μl	0.5μl	0.5μl	-
Bacillus Cereus	2μl	1μl	1μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl
Bacillus Cereus 1:10	2μl	1μl	1μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl
Escherichia Coli ( Au-Np B.c )	2μl	1μl	1μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl

15. 7/3/2024

Έγινε μια καινούρια αραίωση για το Bacillus Cereus 1:10 εφόσον ήταν ελαττωματικό το προηγούμενο δείγμα και χρησιμοποιήθηκε η Klebsiella Pneumoniae ως αρνητικός μάρτυρας. Συγκέντρωση DNA για Salmonella Enteritidis = 72ng/μl σε αραίωση 1:10 (η πυκνή έχει συγκέντρωση 720 ng/μl) και Bacillus Cereus = 56ng/μl, και έγινε αποδιάταξη (95°C) για 10min και υβριδισμός στους 56°C για 20min

Προστέθηκε ξανά με την ίδια διαδικασία HCl

**Πίνακας 4** Προσθήκη HCl

Μικροοργανισμοί	Ποσότητα HCL (προσθήκη κάθε φορά)								
Salmonella Enteritidis	1μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl
Salmonella Enteritidis 1:10	1μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl
Klebsiella Pneumoniae	1μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl
Klebsiella Pneumoniae 1:10	1μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl
Bacillus Cereus 1:10	1μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl
Bacillus Cereus 1:100	1μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl

Klebsiella Pneumoniae	1μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	-
Klebsiella Pneumoniae 1:10	1μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	-

Το πείραμα επαναλήφθηκε λόγω μη αλλαγής χρώματος των δειγμάτων που είχαν Au-Np S (μl), με την ίδια πειραματική διαδικασία, και προστέθηκε ξανά ποσότητα HCl όπως φαίνεται παρακάτω

**Πίνακας 5** Προσθήκη HCl

Μικροοργανισμοί	Ποσότητα HCL (προσθήκη κάθε φορά)											
Salmonella Enteritidis	1μl	1μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	1μl	1μl	1μl
Salmonella Enteritidis 1:10	1μl	1μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	1μl	1μl	1μl
Klebsiella Pneumoniae	1μl	1μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	1μl	1μl	1μl
Klebsiella Pneumoniae 1:10	1μl	1μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	1μl	1μl	1μl

16. 9/3/2024

Έγινε πείραμα με Au-Np S, αποδιάταξη (95°C) για 10min και υβριδισμός στους 58°C για 20min, ενώ ομοίως έγινε προσθήκη HCl

**Πίνακας 6** Προσθήκη HCl

Μικροοργανισμοί	Ποσότητα HCL (προσθήκη κάθε φορά)												
Salmonella Enteritidis 1:10	1μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	1μl
Klebsiella Pneumoniae	1μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	1μl
Klebsiella Pneumoniae 1:10	1μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	1μl
Escherichia Coli	1μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	1μl

Λόγω αποτυχημένης προσπάθειας το πείραμα επαναλήφθηκε με αποδιάταξη στους 95°C για 10min και υβριδισμό στους 56°C για 20min και επίσης χρησιμοποιήθηκε ένας

αρνητικός μάρτυρας Au-Np B.c για να ελεγχθεί η ορθότητα των Au-Np S, εάν δηλαδή θα αλλάξουν χρώμα και οι δύο αρνητικοί μάρτυρες κατά την προσθήκη HCl και στην περίπτωση που δεν αλλάξουν ίσως το διάλυμα Au-Np S είναι ελαττωματικό είτε υπήρξε κάποιο πειραματικό σφάλμα κατά την απομόνωση της Salmonella Pneumoniae, ενώ παρακάτω φαίνεται η προσθήκη HCl

**Πίνακας 7 Ποσότητα HCL**

Μικροοργανισμοί	Ποσότητα HCL (προσθήκη κάθε φορά)			
Salmonella Enteritidis	2μl	1μl	1μl	1μl
Salmonella Enteritidis 1:10	2μl	1μl	1μl	1μl
Klebsiella Pneumoniae 1:10	2μl	1μl	1μl	1μl
Escherichia Coli	2μl	1μl	1μl	1μl
Escherichia Coli	2μl	1μl	1μl	1μl

17. 11/3/2024

Έγινε απομόνωση μικροοργανισμών Salmonella Enteritidis και Bacillus Cereus

18. 12/3/2024

Στο παρακάτω πείραμα δοκιμάστηκε νέο DNA των μικροοργανισμών που απομονώθηκαν και εφόσον χρησιμοποιήθηκαν τα διαλύματα Au-Np S, για να βγει ένα συμπέρασμα για τα προηγούμενα αποτυχημένα πειράματα για την Salmonella Enteritidis, έγινε αποδιάταξη στους 95°C για 10min και υβριδισμός στους 56°C για 20min, με Salmonella Enteritidis=22ng/ml

Η χρήση του Bacillus Cereus δεν ενδιαφέρει σε αυτό το πείραμα, έγινε από σφάλμα θα μπορούσε να παραλειφθεί (απλά θα φαίνονται 3 tips στην εικόνα εκ των οποίων ενδιαφέρουν τα δύο). Παρακάτω φαίνονται οι προσθήκες HCl

**Πίνακας 8 Ποσότητα HCL**



Μικροοργανισμοί	Ποσότητα HCL (προσθήκη κάθε φορά)							
Salmonella πυκνή	1μl	1μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl
Bacillus Cereus πυκνό	1μl	1μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl
Klebsiella Pneumoniae	1μl	1μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl	0.5μl

19. 15/3/2024

Έγινε επιμόλυνση με Salmonella, σκόνης γάλακτος 2<sup>ης</sup> βρεφικής ηλικίας (6-12 μηνών), σε 2 tips σκόνης, προστέθηκαν το διάλυμα Salmonella και αφέθηκε για 24 ώρες να αναπτυχθεί, έπειτα τα 2 tips αναμείχθηκαν ένα και τοποθετήθηκαν για καλλιέργεια με σκοπό να γίνει ένα πείραμα πάνω σε αυτό

**Εικόνα 5.** Η σκόνη γάλακτος 15/3/2024



20. 28/3/2024

Το πείραμα αυτό, καθώς και τα επόμενα από εδώ και πέρα, έγιναν με Salmonella Enteritidis που απομονώθηκε από σκόνη γάλακτος και η συγκέντρωση της δεν μετρήθηκε καθώς το πείραμα ήταν καθαρά οπτομετρικό, ενώ οι πειραματικές συνθήκες ήταν αποδιάταξη στους 95°C για 10min και υβριδισμός στους 56°C για 20min

21. 12/4/2024

Πραγματοποιήθηκε δημιουργία διαλυμάτων χρυσών νανοσωματιδίων- εκκινητών *Salmonella Enteritidis* με 1 εκκινητή και με 2 εκκινητές Au-Np1, Au-Np2 και αυτό ήταν και το τελευταίο πειραματικό υλικό που υπήρχαν εκκινητές

22. 17/4/2024

Έγιναν 3 διαδοχικά πειράματα την ίδια μέρα στις ίδιες πειραματικές συνθήκες με το προηγούμενο και η μόνη διαφορά μεταξύ των πειραμάτων ήταν οι όγκοι

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Παρακάτω παρουσιάζονται βάσει ημερομηνίας τα αποτελέσματα των πειραμάτων που έγιναν για την παρούσα εργασία:

1. 22/10/2023

**Πίνακας 9** Αποτελέσματα 22/10/2023

ΤΥΦΛΟ		
4 μl	HCl + H <sub>2</sub> O	Δεν άλλαξε χρώμα
5 μl	HCl + H <sub>2</sub> O	Δεν άλλαξε χρώμα
6 μl	HCl + H <sub>2</sub> O	Άλλαξε χρώμα

Εδώ φαίνονται κατά σειρά οι μικροοργανισμοί, οι ποσότητες, οι ποσότητες HCl και το οπτικό αποτέλεσμα:

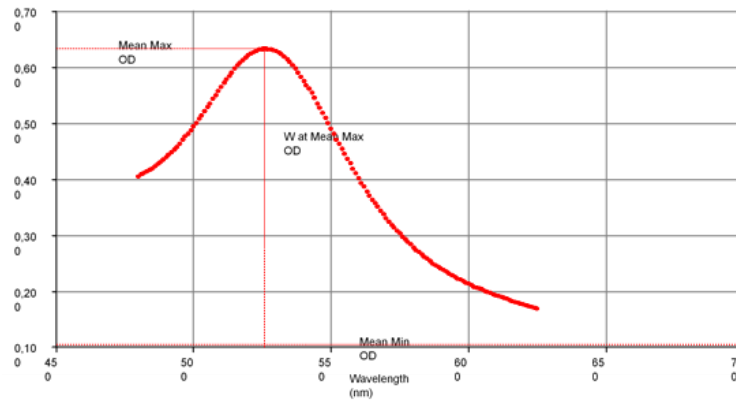
**Πίνακας 10** Αποτελέσματα 22/10/2023

Μικροοργανισμός	Ποσότητα AuNPs	Ποσότητα HCl	Χρωματική αλλαγή
$10^8$ Salmonella Enteritidis	20μl DNA + 20 μl Au-Np2	+4 μl HCl	Δεν άλλαξε χρώμα
$10^6$ Salmonella Enteritidis	10μl DNA + 20 μl Au-Np2	+4 μl HCl	Δεν άλλαξε χρώμα
	15μl DNA + 20 μl Au-Np2	+4 μl HCl	Δεν άλλαξε χρώμα
	20μl DNA + 20 μl Au-Np2	+4 μl HCl	Δεν άλλαξε χρώμα
$10^8$ Salmonella	20μl DNA + 20 μl Au-Np2	+5 μl HCl	Δεν άλλαξε χρώμα

$10^6$ Salmonella Enteritidis	10μl DNA + 20 μl Au- Nr2	+5 μl HCl	Δεν άλλαξε χρώμα
	15μl DNA + 20 μl Au- Nr2	+5 μl HCl	Δεν άλλαξε χρώμα
	20μl DNA + 20 μl Au- Nr2	+5 μl HCl	Δεν άλλαξε χρώμα
$10^8$ Salmonella Enteritidis	20μl DNA + 20 μl Au-Nr2	+6 μl HCl	Άλλαξε χρώμα
$10^6$ Salmonella Enteritidis	10μl DNA + 20 μl Au- Nr2	+6 μl HCl	Δεν άλλαξε χρώμα
	15μl DNA + 20 μl Au- Nr2	+6 μl HCl	Δεν άλλαξε χρώμα
	20μl DNA + 20 μl Au- Nr2	+6 μl HCl	Δεν άλλαξε χρώμα
$10^8$ Salmonella Enteritidis	20μl DNA + 20 μl Au- Nr2	+7 μl HCl	Άλλαξε χρώμα
$10^6$ Salmonella Enteritidis	10μl DNA + 20 μl Au- Nr2	+7 μl HCl	Άλλαξε χρώμα
	15μl DNA + 20 μl Au- Nr2	+7 μl HCl	Άλλαξε χρώμα
	20μl DNA + 20 μl Au- Nr2	+7 μl HCl	Άλλαξε χρώμα

Φαίνεται πως το τυφλό αλλάζει χρώμα στα 6μl, άρα συγκρίναμε τα αποτελέσματα για προσθήκη HCl στα 6μl, και η αραιώση  $10^6$  έδωσε θετικά αποτελέσματα. Η παρακάτω καμπύλη απορρόφησης για θετικό δείγμα χρησιμοποιήθηκε η ίδια σε όλα τα θετικά πειράματα:

**Εικόνα 6** Καμπύλη απορρόφησης 22/10/2023



Παρακάτω από αριστερά προς τα δεξιά: τα 4 ροζ αριστερά είναι τα μίγματα από  $10^8$  και  $10^6$ , ενώ το τελευταίο δεξιά είναι το τυφλό (μωβ) στα 6μl HCL. Το πρώτο δείγμα φαίνεται ότι τείνει να αλλάξει χρώμα, και όντως άρχισε να αλλάζει χρώμα, αμέσως μετά (δυστυχώς δεν λήφθηκε άλλη φωτογραφία). Χρειάζεται να περάσει λίγος χρόνος μετά την προσθήκη HCl (2-3 λεπτά) για να φανεί πιο έντονα η αλλαγή χρώματος.

**Εικόνα 7** Δείγματα 22/10/2023



Ποσότητα DNA Salmonella Enteritidis που ανιχνεύθηκε :

Το αρχικό διάλυμα είχε συγκέντρωση  $5,62\text{ng}/\mu\text{l}$  και οι αραιώσεις που ανιχνεύθηκαν είχαν συγκεντρώσεις  $5,62 \cdot 10^{-2}\text{ng}/\mu\text{l}$  και  $5,62 \cdot 10^{-4}\text{ng}/\mu\text{l}$

Άρα με βάση τον όγκο που χρησιμοποιήθηκε ανιχνεύθηκαν:

$$10^6 \rightarrow 10\mu\text{l} * 5,62 * 10^{-4} \text{ ng}/\mu\text{l} = 56,2 * 10^{-4} \text{ ng}$$

$$10^6 \rightarrow 15\mu\text{l} * 5,62 * 10^{-4} \text{ ng}/\mu\text{l} = 84,3 * 10^{-4} \text{ ng}$$

$$10^6 \rightarrow 20\mu\text{l} * 5,62 * 10^{-4} \text{ ng}/\mu\text{l} = 112,4 * 10^{-4} \text{ ng}$$

Ανιχνεύτηκε ποσότητα  $56,2 * 10^{-4} \text{ ng DNA Salmonella}$

## 2. 23/10/2023

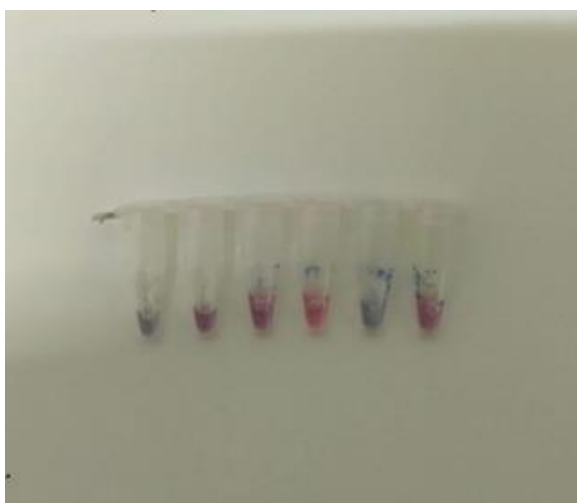
Στα 4μl παρατηρήθηκαν τα εξής:

**Πίνακας 11** Αποτελέσματα 23/10/2023

Μικροοργανισμός	ΠΟΣΟΤΗΤΑ χρυσών	ΠΟΣΟΤΗΤΑ HCl	Χρωματική αλλαγή
10μl Salmonella Enteritidis $10^{-1}$	10μl Au-Np1	4 μl	Άλλαξε
10μl Salmonella Enteritidis $10^{-1}$	10μl Au-Np2	4 μl	Δεν άλλαξε
15μl Salmonella Enteritidis $10^{-1}$	15μl Au-Np1	4 μl	Δεν άλλαξε
15μl Salmonella Enteritidis $10^{-1}$	15μl Au-Np2	4 μl	Δεν άλλαξε
10μl Klebsiella Enteritidis $10^{-1}$	10μl Au-Np1	4 μl	Άλλαξε
15μl Klebsiella Enteritidis $10^{-1}$	10μl Au-Np1	4 μl	Άλλαξε

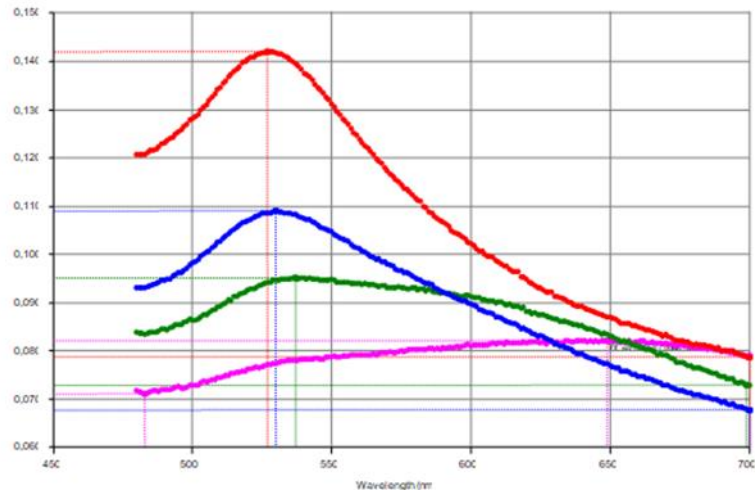
Παρακάτω φαίνονται τα tips και είναι διατεταγμένα σε σειρά με βάση τον πίνακα από δεξιά προς τα αριστερά, το τελευταίο δείγμα έχει αρχίσει να αλλάζει χρώμα, δεν φαίνεται πολύ καθαρά

**Εικόνα 8** Δείγματα 23/10/2023



Παρακάτω φαίνεται η καμπύλη απορρόφησης θετικού αποτελέσματος σε σύγκριση με κάποια αρνητικά (χρησιμοποιείται μια φορά, διότι δεν έγιναν άλλες φασματοφωτομετρήσεις για αρνητικά αποτελέσματα είτε σε αυτό το πείραμα είτε κάπου που ίσως να ταίριαζε καλύτερα)

**Εικόνα 9** Αποτελέσματα 23/10/2023



Ο υπολογισμός DNA έγινε μόνο στα θετικά αποτελέσματα από τους μικροοργανισμούς – στόχους. Υπολογισμός DNA Salmonella Enteritidis που ανιχνεύθηκε:

για Salmonella  $10^{-1}$  η συγκέντρωση είναι 5,0ng/μl

Άρα με βάση τον όγκο που χρησιμοποιήθηκε ανιχνεύθηκαν:

Salmonella Enteritidis  $10^{-1} \rightarrow 10\mu\text{l} * 5,0\text{ng}/\mu\text{l} = 50\text{ng}$

Salmonella Enteritidis  $10^{-1} \rightarrow 15\mu\text{l} * 5,0\text{ng}/\mu\text{l} = 75\text{ng}$

### 3. 23/10/2023

Αντίστοιχα:

**Πίνακας 12** Αποτελέσματα 23/10/2023

Μικροοργανισμοί	Ποσότητα AuNPs	Ποσότητα HCl (προσθήκη κάθε φορά)			Χρωματική αλλαγή (7μl)
		4 μl	+1 μl	+1 μl	
15μl Salmonella Enteritidis	20μl Au-Np1	4 μl	+1 μl	+1 μl	Αλλάξε

20μl Salmonella Enteritidis	20μl Au-Np2	4 μl	+1 μl	+1 μl	+1 μl	Δεν Άλλαξε
15μl Klebsiella Pneumoniae	20μl Au-Np2	4 μl	+1 μl	+1 μl	+1 μl	Άλλαξε

Φαίνεται πως η πρώτη αλλαγή παρατηρήθηκε στα 7μl. Παρακάτω φαίνονται τα tips διατεταγμένα σε σειρά με βάση τον πίνακα από αριστερά προς τα δεξιά, όπου παρατηρείται πως το δεύτερο δείγμα ήταν θετικό ενώ το πρώτο ήταν αρνητικό.

**Εικόνα 10** Δείγματα 23/10/2023



Υπολογισμός DNA Salmonella Enteritidis που ανιχνεύθηκε :

$$\text{Salmonella} \rightarrow 20\mu\text{l} * 50\text{ng}/\mu\text{l} = 1000\text{ng}$$

4. 24/10/2023

**Πίνακας 13** Αποτελέσματα 24/10/2023

Μικροοργανισμοί	Ποσότητα διαλύματος	Ποσότητα HCL (προσθήκη κάθε φορά)		Χρωματική αλλαγή (4μl)	Χρωματική αλλαγή (5μl)
Escherichia Coli 15μl	25 μl Au-Np1	4 μl	+1 μl	Δεν άλλαξε	Άλλαξε



EEscherichia Coli 20μl	30 μl Au-Np1	4 μl	+1 μl	Δεν άλλαξε	Άλλαξε
Salmonella Enteritidis 10 <sup>-1</sup> 15μl	25 μl Au-Np1	4 μl	+1 μl	Δεν άλλαξε	Άλλαξε
Salmonella Enteritidis 10 <sup>-1</sup> 20μl	30 μl Au-Np1	4 μl	-	άλλαξε	-

Ο αρνητικός μάρτυρας άλλαξε χρώμα στα 5μl. Άλλαξαν χρώμα όμως και τα υπόλοιπα δείγματα στα 5μl. Το πείραμα αυτό μας επαληθεύει πως τα Au-Np1 δεν είναι κατάλληλα για την πραγματοποίηση του πειράματος. Αντίστοιχα, παρακάτω φαίνονται από αριστερά προς τα δεξιά με βάση τη σειρά του πίνακα τα tips.

**Εικόνα 11** Αποτελέσματα 24/10/2023



5. 27/10/2023

**Πίνακας 14** Αποτελέσματα 27/10/2023

Μικροοργανισμοί	DNA (μl)	Au-Np2 (μl)	Ποσότητα HCL (μl)	Χρωματική αλλαγή
Salmonella Enteritidis	15	15	5	Δεν άλλαξε
Salmonella Enteritidis 1:10	15	15	5	Δεν άλλαξε
Salmonella Enteritidis 1:100	15	15	5	Άλλαξε

Salmonella Enteritidis 1:1000	15	15	5	Δεν άλλαξε
Salmonella Enteritidis 1:100	20	20	5	Δεν άλλαξε
Salmonella Enteritidis 1:10	20	20	5	Άλλαξε (αμφιλεγόμενο)
Salmonella Enteritidis 1:100	20	20	5	Άλλαξε
Salmonella Enteritidis 1:1000	20	20	5	Άλλαξε
τυφλό	-	20	5	Άλλαξε

Παρακάτω στην αριστερή φωτογραφία φαίνονται όλα τα δείγματα σε σύγκριση με το τυφλό (στα 5μl) και στην δεξιά παρατηρούνται οι αλλαγές χρώματος μετά από μερικά λεπτά, ενώ όλα τα δείγματα είναι τοποθετημένα από δεξιά προς τα αριστερά με βάση τον πίνακα.

**Εικόνα 12** Αποτελέσματα 27/10/2023



Υπολογισμός DNA Salmonella Enteritidis:

Μας ενδιαφέρει η μικρότερη αραιώση (δεν υπάρχει λόγος να υπολογίσουμε τις μεγαλύτερες αραιώσεις)

$$\text{Salmonella} \rightarrow 15\mu\text{l} * 50\text{ng}/\mu\text{l} * 10^{-3} (\text{αραιώση}) = 0,75\text{ng}$$

6. 30/10/2023

**Πίνακας 15** Αποτελέσματα 30/10/2023

Μικροοργανισμοί	DNA (μl)	Au-Np2 (μl)	Ποσότητα HCL (προσθήκη κάθε φορά)			Χρωματική αλλαγή (5,7μl)
			4 μl	0,7 μl	1 μl	
Salmonella Enteritidis 10 <sup>-1</sup>	20μl	20 μl	4 μl	0,7 μl	1 μl	Δεν άλλαξε
Salmonella Enteritidis 10 <sup>-2</sup>	20μl	20 μl	4 μl	0,7 μl	1 μl	Δεν άλλαξε
Salmonella Enteritidis 10 <sup>-3</sup>	20μl	20 μl	4 μl	0,7 μl	1 μl	Δεν άλλαξε
Salmonella Enteritidis 10 <sup>-4</sup>	20μl	20 μl	4 μl	0,7 μl	1 μl	Δεν άλλαξε
Salmonella Enteritidis 10 <sup>-5</sup>	20μl	20 μl	4 μl	0,7 μl	1 μl	Δεν άλλαξε
Klebsiella Pneumoniae	20μl	20 μl	4 μl	0,7 μl	1 μl	Άλλαξε
Candida Albicans	20μl	20 μl	4 μl	0,7 μl	1 μl	Άλλαξε
Escherichia Coli	20μl	20 μl	4 μl	0,7 μl	1 μl	Άλλαξε

Παρακάτω, τα δείγματα είναι διατεταγμένα από αριστερά προς τα δεξιά με βάση τον πίνακα, όπου κανένα δείγμα Salmonella Enteritidis δεν άλλαξε χρώμα στα 5,7μl και βγήκαν όλα θετικά.

**Εικόνα 13** Αποτελέσματα 30/10/2023



Υπολογισμός DNA Salmonella Enteritidis:

Μας ενδιαφέρει η μικρότερη αραιώση

Salmonella →  $20\mu\text{l} * 50\text{ng}/\mu\text{l} * 10^{-5}$  (αραιώση) = 0,01ng

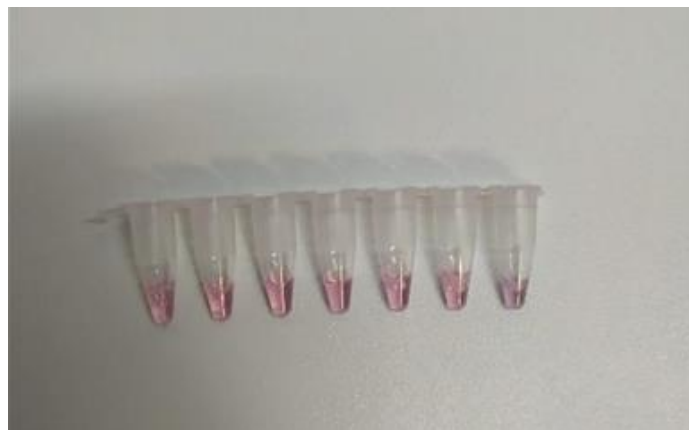
7. 31/10/2023

**Πίνακας 16** Αποτελέσματα 31/10/2023

Μικροοργανισμοί	DNA ( $\mu\text{l}$ )	Au-Np2 ( $\mu\text{l}$ )	Ποσότητα HCL (προσθήκη κάθε φορά)			Χρωματική αλλαγή (6 $\mu\text{l}$ )
			4 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$	
Salmonella Enteritidis $10^{-1}$	20 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$	4 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$	Δεν άλλαξε
Salmonella Enteritidis $10^{-2}$	20 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$	4 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$	Δεν άλλαξε
Salmonella Enteritidis $10^{-3}$	20 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$	4 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$	Δεν άλλαξε
Salmonella Enteritidis $10^{-4}$	20 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$	4 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$	Δεν άλλαξε
Salmonella Enteritidis $10^{-5}$	20 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$	4 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$	Δεν άλλαξε
Candida Albicans	20 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$	4 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$	Δεν άλλαξε
Escherichia Coli	20 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$	4 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$	Άλλαξε

Ξανά στην εικόνα φαίνονται τα δείγματα διατεταγμένα από αριστερά προς τα δεξιά.

**Εικόνα 14** Αποτελέσματα 31/10/2023



Η *Candida Albicans* δεν άλλαξε, εφόσον όμως άλλαξε η *Escherichia Coli* ίσως και αυτό το πείραμα-επαλήθευση ήταν επιτυχές. Υπολογισμός για την συγκέντρωση δεν χρειάζεται είναι ο ίδιος με το προηγούμενο πείραμα.

Το δεύτερο πείραμα της ίδιας ημέρας δεν πέτυχε λόγω αλλαγής θερμοκρασίας και ενώ στο πιο πυκνό δείγμα δεν υπήρξε αλλαγή χρώματος, στις μεγαλύτερες αραιώσεις υπήρχε αλλαγή χρώματος στα 5μl HCl, όπως φαίνεται παρακάτω.

**Εικόνα 15** Αποτελέσματα 31/10/2023



8. 27/11/2023

Απομονώθηκαν DNA *Salmonella Enteritidis* και *Bacillus Cereus*.

Συγκεντρώσεις DNA:

0,557ng/μl *Salmonella Enteritidis*

56ng/μl *Bacillus Cereus*

9. 6/12/2023

Δεν έγινε κάποιο πείραμα για να προκύψει συγκεκριμένο αποτέλεσμα

10. 15/1/2024

Στα 3μl άλλαξε χρώμα ο Bacillus Cereus 1:10, και στα 4μl άλλαξαν χρώμα και τα άλλα 2, άρα το συγκεκριμένο πείραμα απέτυχε. Παρακάτω τα tips είναι διατεταγμένα σε σειρά με βάση τον πίνακα από αριστερά προς τα δεξιά.

**Εικόνα 16** Αποτελέσματα 1/15/2024



11. 17/1/2024

**Πίνακας 17** Αποτελέσματα 17/1/2024

Μικροοργανισμοί	DNA (μl)	Au-Np B.c (μl)	Ποσότητα HCL (προσθήκη κάθε φορά)		Χρωματική αλλαγή (5μl)
Bacillus Cereus	15μl	20 μl	4 μl	1 μl	Δεν άλλαξε
Bacillus Cereus 1:10	15μl	20 μl	4 μl	1 μl	Άλλαξε
Klebsiella Pneumoniae	15μl	20 μl	4 μl	1 μl	Άλλαξε

Ο πυκνός Bacillus Cereus δεν άλλαξε χρώμα, και τα άλλα 2 στα 5μl άλλαξαν χρώμα. Παρακάτω τα tips είναι διατεταγμένα σε σειρά με βάση τον πίνακα από αριστερά προς τα δεξιά.

**Εικόνα 17** Αποτελέσματα 17/1/2024



Υπολογισμός DNA Bacillus Cereus:

$$\text{Bacillus Cereus} \rightarrow 15\mu\text{l} * 56\text{ng}/\mu\text{l} = 840\text{ng}$$

12. 21/1/2024

**Πίνακας 18** Αποτελέσματα 21/1/2024

Μικροοργανισμοί	DNA (μl)	Au-Np B.c (μl)
Bacillus Cereus πυκνό	20μl	25 μl
Bacillus Cereus 1:10	20μl	25 μl
Bacillus 1:100	20μl	25 μl
Salmonella Enteritidis	20μl	25 μl

**Πίνακας 19** Αποτελέσματα 21/1/2024

Μικροοργανισμοί	Ποσότητα HCL (προσθήκη κάθε φορά)			
Bacillus Cereus πυκνό	2μl	1μl	1μl	1μl
Bacillus Cereus 1:10	2μl	1μl	1μl	1μl

Bacillus Cereus 1:100	2μl	1μl	1μl	1μl
Salmonella Enteritidis	2μl	1μl	1μl	1μl

Μικροοργανισμοί	Χρωματική αλλαγή (4μl)	Χρωματική αλλαγή (5μl)
Bacillus Cereus πυκνό	Δεν άλλαξε	Δεν άλλαξε
Bacillus Cereus 1:10	Άλλαξε	Άλλαξε
Bacillus Cereus 1:100	Δεν άλλαξε	Δεν άλλαξε
Salmonella Enteritidis	Άλλαξε ελαφρώς	Άλλαξε

Παρακάτω τα tips είναι διατεταγμένα σε σειρά με βάση τον πίνακα από αριστερά προς τα δεξιά.

**Εικόνα 18** Αποτελέσματα 21/1/2024



Υπολογισμός DNA Bacillus Cereus για την μικρότερη αραίωση:

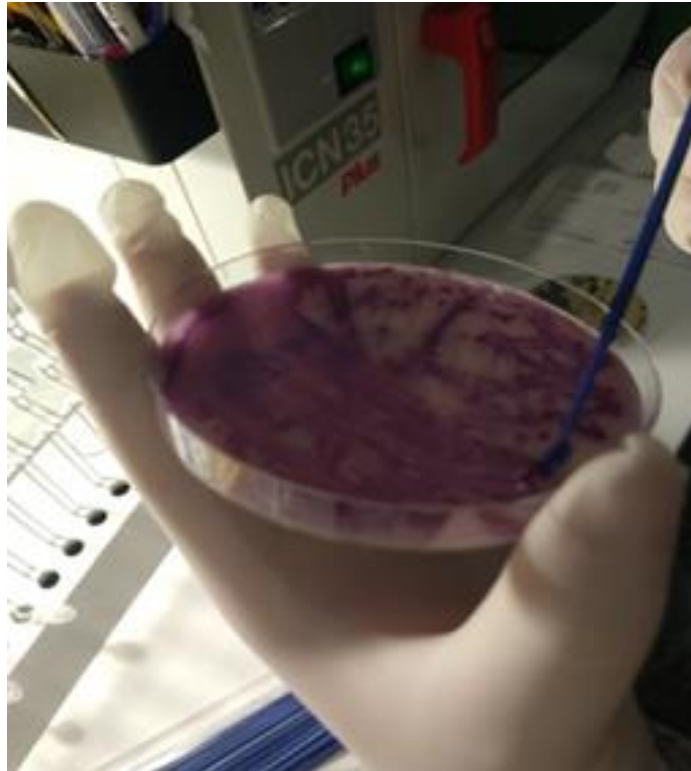
$$\text{Bacillus Cereus} \rightarrow 20\mu\text{l} * 56\text{ng}/\mu\text{l} * 10^{-2} = 11,2\text{ng}$$

13. 22/1/2024

Παρακάτω ακολουθούν φωτογραφίες από την απομόνωση των μικροοργανισμών Klebsiella Pneumoniae, Salmonella Enteritidis και Escherichia Coli.



**Εικόνα 19** Αποτελέσματα 22/1/2024



**Εικόνα 20** Αποτελέσματα 22/1/2024



**Εικόνα 21** Αποτελέσματα 22/1/2024



**Εικόνα 22** Αποτελέσματα 22/1/2024



**Εικόνα 23** Αποτελέσματα 22/1/2024



14. 3/2/2024

**Πίνακας 20** Αποτελέσματα 3/2/2024

Μικροοργανισμοί	DNA (μl)	Au-Np S (μl)
Salmonella Enteritidis	20μl	25 μl
Salmonella Enteritidis 1:10	20μl	25 μl
Escherichia Coli	20μl	25 μl

Παρακάτω αντίστοιχα

**Πίνακας 21** Αποτελέσματα 3/3/2024

Μικροοργανισμοί	DNA (μl)	Au-Np B.c (μl)
-----------------	----------	----------------

Bacillus Cereus	20μl	25 μl
Bacillus Cereus 1:10	20μl	25 μl
Escherichia Coli	20μl	25 μl

Μετά την προσθήκη HCl λήφθηκαν τα παρακάτω αποτελέσματα

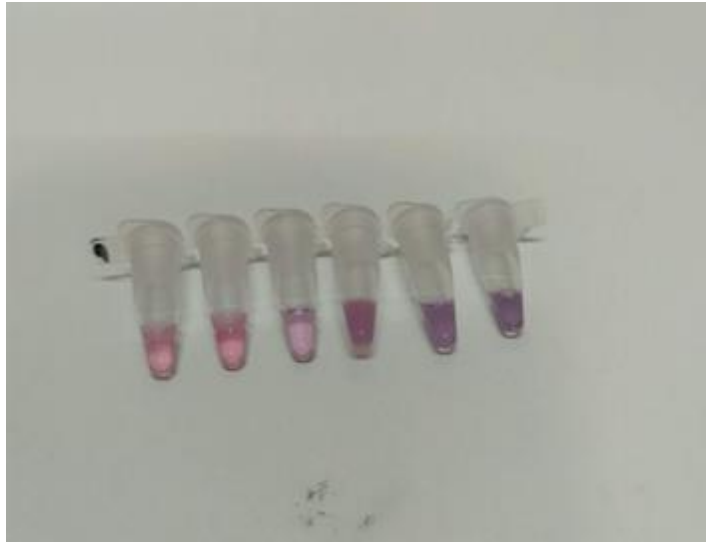
**Πίνακας 22** Αποτελέσματα 3/3/2024

Μικροοργανισμοί	Χρωματική αλλαγή (4,5μl)	Χρωματική αλλαγή (5μl)	Χρωματική αλλαγή (5μl)
Salmonella Enteritidis	Δεν άλλαξε	Δεν άλλαξε	-
Salmonella Enteritidis 1:10	Δεν άλλαξε	Δεν άλλαξε	-
Escherichia Coli (Au-Np S)	Άλλαξε ελαφρώς	Άλλαξε	-
Bacillus Cereus	Δεν άλλαξε	Δεν άλλαξε	Δεν άλλαξε
Bacillus Cereus 1:10	Άλλαξε	Άλλαξε	Άλλαξε
Escherichia Coli (Au-Np B.c)	Δεν άλλαξε	Δεν άλλαξε	Άλλαξε

Στα 4,5μl άλλαξε χρώμα ελαφρώς η Escherichia Coli με τα νανοσωματίδια χρυσού της Salmonella. Στα 5μl άλλαξε τελείως χρώμα η Escherichia Coli με τα νανοσωματίδια χρυσού της Salmonella Enteritidis. Στα 5μl δεν άλλαξε χρώμα καθόλου ο Bacillus Cereus ο πυκνός, ενώ ο Bacillus Cereus 1:10 άλλαξε χρώμα τελείως και ακόμη, η Escherichia Coli των νανοσωματιδίων χρυσού του Bacillus Cereus δεν άλλαξε χρώμα καθόλου στα 5μl

Για τα 5,5μl έγιναν μόνο τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν νανοσωματίδια χρυσού Bacillus Cereus όπου τότε παρατηρήθηκε απότομη αλλαγή της Escherichia Coli ενώ ο Bacillus Cereus ο πυκνός παρέμεινε σταθερός χωρίς να αλλάξει χρώμα. Παρακάτω φαίνονται από αριστερά προς τα δεξιά με βάση τον πίνακα (η Escherichia Coli Au-Np S έχει αλλάξει χρώμα, αλλά δεν φαίνεται καθαρά λόγω κακού φωτισμού).

**Εικόνα 24** Αποτελέσματα 3/3/2024



Δεν χρειάζεται υπολογισμός για τη συγκέντρωση του DNA, είναι αρκετά μεγάλη και στο προηγούμενο πείραμα υπήρξε πολύ καλύτερη μέτρηση.

15. 7/3/2024

**Πίνακας 23** Αποτελέσματα 7/3/2024

Μικροοργανισμοί	DNA (μl)	Au-Np S (μl)
Salmonella Enteritidis	20μl	20 μl
Salmonella Enteritidis 1:10	20μl	20 μl
Klebsiella Pneumoniae	20 μl	20 μl
Klebsiella Pneumoniae 1:10	20μl	20 μl

**Πίνακας 24** Αποτελέσματα 7/3/2024

Μικροοργανισμοί	DNA (μl)	Au-Np B.C (μl)
Bacillus Cereus 1:10	20μl	20 μl
Bacillus Cereus 1:100	20μl	20 μl
Klebsiella Pneumoniae	20 μl	20 μl
Klebsiella Pneumoniae 1:10	20μl	20 μl

Μετά την προσθήκη HCl, βρέθηκε πως στα 3,5μl άλλαξε χρώμα μερικώς η *Klebsiella Pneumoniae* 1:10 με Au-Np B.c, στα 4μl άλλαξε χρώμα τελείως η *Klebsiella Pneumoniae* 1:10 με Au-Np B.c, στα 4μl παρατηρήθηκε απότομη αλλαγή της *Klebsiella Pneumoniae* πυκνής με Au-Np B.c, και στα 5μl άλλαξαν χρώμα οι 2 Βάκιλοι. Παρακάτω φαίνονται από αριστερά προς τα δεξιά βάσει του πίνακα των προσθηκών HCl τα αποτελέσματα στα tips

**Πίνακας 25** Αποτελέσματα 7/3/2024



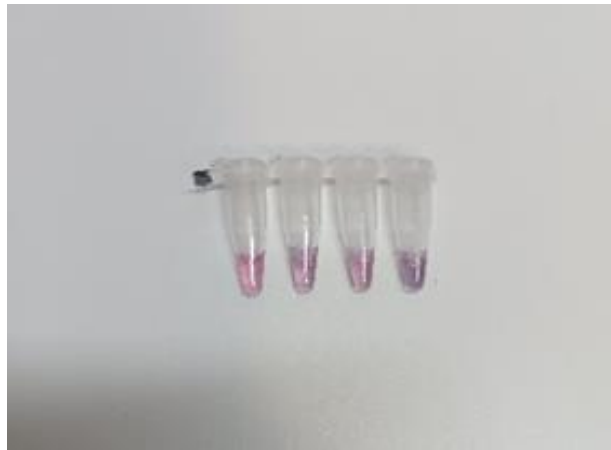
*Bacillus Cereus*  $\rightarrow 20\mu\text{l} * 56\text{ng}/\mu\text{l} * 10^{-2} = 11,2\text{ng}$  όπως και στο προηγούμενο πείραμα που είχαμε επιτυχία στην ίδια αραιώση.

**Πίνακας 26** Αποτελέσματα 7/3/2024

Μικροοργανισμοί	DNA (μl)	Au-Np S (μl)
<i>Salmonella Enteritidis</i>	20μl	20 μl
<i>Salmonella Enteritidis</i> 1:10	20μl	20 μl
<i>Klebsiella Pneumoniae</i>	20 μl	20 μl
<i>Klebsiella Pneumoniae</i> 1:10	20μl	20 μl

Στα 8μl άλλαξε μερικώς χρώμα η *Klebsiella Pneumoniae* 1:10, η *Klebsiella Pneumoniae* καθώς και η *Salmonella Enteritidis* 1:10, ενώ η *Salmonella* (πυκνή) δεν άλλαξε ποτέ χρώμα, επομένως υπήρξε επιτυχία, ωστόσο η συγκέντρωση στην πυκνή είναι τόσο μεγάλη που δεν χρειάζεται να υπολογιστεί το DNA. Βάσει του πίνακα φαίνονται από αριστερά προς τα δεξιά τα αποτελέσματα.

**Εικόνα 25** Αποτελέσματα 7/3/2024



16. 9/3/2024

**Πίνακας 27** Αποτελέσματα 3/2/2024

Μικροοργανισμοί	DNA (μl)	Au-Np S (μl)
Salmonella Enteritidis 1:10	20μl	25 μl
Klebsiella Pneumoniae	20μl	25 μl
Klebsiella Pneumoniae 1:10	20 μl	25 μl
Escherichia Coli	20μl	25 μl

Στα 7μl άλλαξαν όλα, η Klebsiella Pneumoniae πυκνή ελαφρώς είχε αποτυχία. Παρακάτω τα tips είναι διατεταγμένα σε σειρά με βάση τον πίνακα από αριστερά προς

**Εικόνα 26** Αποτελέσματα 9/3/2024



**Πίνακας 28** Αποτελέσματα 9/3/2024

Μικροοργανισμοί	DNA (μl)	Au-Np S (μl)	Au-Np B.c (μl)
Salmonella Enteritidis	10μl	15 μl	-
Salmonella Enteritidis 1:10	10μl	15 μl	-
Klebsiella Pneumoniae 1:10	10μl	15 μl	-
Escherichia Coli	10 μl	15 μl	-
Escherichia Coli	10μl	-	15 μl

Στα 3μl δεν άλλαξε χρώμα κανένα εκτός, από την Escherichia Coli (Au-Np B.c) ευδιάκριτα, στα 4 μl άλλαξε τελείως το Escherichia Coli (Au-Np B.c) και η Escherichia Coli με Au-Np S δεν άλλαξε χρώμα. Παρακάτω τα tips είναι διατεταγμένα σε σειρά με βάση τον πίνακα από αριστερά προς τα δεξιά (πάνω στα 3 μl και κάτω στα 5μl).

**Εικόνα 27** Αποτελέσματα 9/3/2024



**Εικόνα 28** Αποτελέσματα 9/3/2024



17. 11/3/2024



Οι συγκεντρώσεις των μικροοργανισμών που απομονώθηκαν μετρήθηκαν και βρέθηκαν να είναι για την *Salmonella Enteritidis* = 22ng/μl και για τον *Bacillus Cereus* = 65ng/μl

18. 12/3/2024

**Πίνακας 29** Αποτελέσματα 12/3/2024

Μικροοργανισμοί	DNA (μl)	Au-Np S (μl)	Au-Np B.c (μl)
<i>Salmonella</i> πυκνή	10μl	15 μl	-
<i>Bacillus Cereus</i> πυκνός	10μl	-	15 μl
<i>Klebsiella Pneumoniae</i>	10μl	15 μl	-

Στα 5μl άλλαξε μερικώς η *Klebsiella* και τα άλλα 2 παρέμειναν ως έχουν. Υπολογισμός DNA για *Salmonella*:

*Salmonella* →  $10\mu\text{l} * 22\text{ng}/\mu\text{l} = 220\text{ng}$

Παρακάτω τα tips είναι διατεταγμένα σε σειρά με βάση τον πίνακα από αριστερά προς τα δεξιά πριν και μετά την αλλαγή χρώματος στα 5μl.

**Εικόνα 29** Αποτελέσματα 9/3/2024



19. 15/3/2024

Δεν υπήρξαν συγκεκριμένα αποτελέσματα διότι δεν έγινε κάποιο πείραμα

20. 28/3/2024

**Πίνακας 30** Αποτελέσματα 28/3/2024

Μικροοργανισμοί	DNA (μl)	Au-Np2 (μl)	Προσθήκη HCL (5μl)	Προσθήκη HCL (6μl)
Salmonella Enteritidis 1	15μl	25μl	Αλλαγή χρώματος	Αλλαγή χρώματος
Bacillus Cereus 1:10	15μl	25μl	Αλλαγή χρώματος	Αλλαγή χρώματος

Στην παρακάτω εικόνα φαίνονται τα tips από αριστερά προς τα δεξιά τα αποτελέσματα του πίνακα και είναι αρνητικά και τα δύο

**Εικόνα 30** Αποτελέσματα 28/3/2024



21. 12/4/2024

Δεν υπήρξε κάποιο αποτέλεσμα

22. 17/4/2024

Πρώτο πείραμα (αποτυχημένο):

**Πίνακας 31** Αποτελέσματα 17/4/2024

Μικροοργανισμοί	DNA (μl)	Au-Np2 (μl)	Προσθήκη HCL (5μl)
Salmonella Enteritidis	15μl	20 μl	Δυσδιάκριτο αποτέλεσμα λόγω αραιού χρώματος
Bacillus Cereus 1:100	15μl	20 μl	Δυσδιάκριτο αποτέλεσμα λόγω αραιού χρώματος

**Εικόνα 31** Αποτελέσματα 17/4/2024



Δεύτερο πείραμα (αποτυχημένο):

**Πίνακας 32** Αποτελέσματα 17/4/2024

Μικροοργανισμοί	DNA (μl)	Au-Np2 (μl)	Προσθήκη HCL (6μl)
Salmonella Enteritidis	20μl	30 μl	Αλλαγή χρώματος

Bacillus Cereus 1:100	20 μl	30 μl	Ελαφριά αλλαγή χρώματος
-----------------------	-------	-------	-------------------------

**Εικόνα 32** Αποτελέσματα 17/4/2024



Τρίτο πείραμα (αποτυχημένο):

**Πίνακας 33** Αποτελέσματα 17/4/2024

Μικροοργανισμοί	DNA (μl)	Au-Np2 (μl)	Προσθήκη HCL (4μl)	Προσθήκη HCL (5μl)
Salmonella Enteritidis	20μl	30 μl	Ελαφριά αλλαγή χρώματος	Αλλαγή χρώματος
Salmonella Enteritidis	15μl	30 μl	Ελαφριά αλλαγή χρώματος	Αλλαγή χρώματος
Bacillus Cereus 1:10	20	30	Δε άλλαξε	Αλλαγή χρώματος

**Εικόνα 33** Αποτελέσματα 17/4/2024



Τέλος, έγινε μια φασματοφωτομέτρηση των διαλυμάτων Au-Nr που παρασκευάστηκαν στις 12/4/2024 και παρατηρήθηκε πως απορροφούσαν στα 530nm.

Συμπερασματικά, η μικρότερη ανιχνεύσιμη ποσότητα DNA για την *Salmonella* Enteritidis ήταν 0,01ng, σε πείραμα που έγινε με αρκετές αραιώσεις. Η αποδιαταξη του DNA έγινε στους 95 για 5 λεπτά και ο υβριδισμός στους 58 για 20 λεπτά. Κατά την προσθήκη HCl παρατηρήθηκαν αποτελέσματα στα 5,7μl. Για τον *Bacillus Cereus* η μικρότερη ποσότητα DNA που ανιχνεύθηκε ήταν 11,2ng. Η αποδιαταξη και ο υβριδισμός έγιναν στις ίδιες θερμοκρασίες και χρόνους με την *Salmonella* Enteritidis, ενώ προστέθηκαν 5μl HCl.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στις μέρες μας, όπου η μοριακή διαγνωστική έχει γνωρίσει τεράστια εξέλιξη, τα νανοσωματίδια χρυσού έχουν αρχίσει και αυτά και χρησιμοποιούνται ευρέως ως μοντέρνος τρόπος διάγνωσης λόγω των ιδιοτήτων τους που τα καθιστούν ιδιαίτερα χρήσιμα για τη βελτίωση της ευαισθησίας και της ακρίβειας των διαγνωστικών τεχνικών, ιδίως για τον εντοπισμό του γενετικού υλικού παθογόνων συχνά σε δείγματα τροφίμων. Σε μια μελέτη έγινε τυχαιοποιημένος εντοπισμός 19 διαφορετικών σειρών της *Salmonella Enteritidis* μέσω αυτής της χρωματογραφικής μεθόδου με την βοήθεια των νανοσωματιδίων χρυσού μέσω ενός ζεύγους καινούριων μονών σειρών ολιγονουκλεοτιδίων μήκους 30 ζευγών βάσεων που βρίσκονταν στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων. Ο επιτυχής υβριδισμός ολιγονουκλεοτιδίου/AuNPs-DNA επιβεβαιώθηκε με ηλεκτροφόρηση πηκτής ενώ η συσσωμάτωση των νανοσωματιδίων σε μίγματα αντίδρασης μη-στόχου και ελέγχου επαληθεύτηκε τόσο με φασματοφωτομετρική ανάλυση όσο και με εικόνες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η οπτική πλατφόρμα βιοαισθητήρα AuNP μπορεί ταυτόχρονα να ελέγξει 19 βιώσιμα στελέχη που δοκιμάστηκαν με 100% ειδικότητα και το εξαιρετικά ευαίσθητο χρωματομετρικό σύστημα ανίχνευσης μπορεί να βελτιώσει σημαντικά τον έλεγχο και την ανίχνευση βιώσιμων στελεχών που υπάρχουν σε πολύπλοκα τρόφιμα και περιβαλλοντικές μήτρες, μειώνοντας επομένως τους κινδύνους μόλυνσης και τη συχνότητα εμφάνισης τροφιμογενών ασθενειών (Quintela et al., 2019).

Σε μια παρόμοια μελέτη, η συσσωμάτωση των νανοσωματιδίων χρυσού προκάλεσε αλλαγή χρώματος στο διάλυμα και μετατόπιση στην επιφανειακή απορρόφηση, ενώ η ευαισθησία αυτής της μεθόδου συγκρίθηκε με τη μέθοδο PCR και όταν το γενετικό υλικό - στόχος ενισχύθηκε αυτή η μέθοδος έδειξε μεγαλύτερη ευαισθησία σε σύγκριση με την ηλεκτροφόρηση γέλης αгарόζης, αλλά η ευαισθησία του ήταν χαμηλότερη όταν το γενετικό υλικό - στόχος δεν είχε ενισχυθεί (Majdinasab et al., 2021).

Αν και όχι τόσο ευρέως χρησιμοποιούμενα, τα νανοσωματίδια χρυσού έχουν χρησιμοποιηθεί και για τον εντοπισμό *Bacillus Cereus* και *Bacillus Anthracis* με αντίστοιχα αποτελέσματα (Hao et al., 2011; Izadi et al., 2016). Φυσικά, σε δείγματα τροφίμων έχουν εντοπιστεί και άλλα παθογόνα μέσω των νανοσωματιδίων χρυσού με την βοήθεια ολιγονουκλεοτιδίων.

Στο παρόν πείραμα στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας, οι μικρότερες ποσότητες DNA που ανιχνεύθηκαν για την *Salmonella Enteritidis* ήταν 0,01ng, όπου κανένα δείγμα δεν βγήκε αρνητικό μετά την προσθήκη 5,7 μl HCl. Προτού γίνει η ανάμιξη του διαλύματος χρυσών-εκκινητών (20μl), με το DNA της *Salmonella Enteritidis* (20μl) προηγήθηκε αποδιάταξη στους 95 για 5 και έπειτα υβριδισμός του μίγματος στους 58 για 20. Για τον *Bacillus Cereus* η ποσότητα που ανιχνεύθηκε ήταν 11,2ng με την χρήση 5μl . Η αποδιάταξη του DNA έγινε στους 95 για 10 λεπτά και ο υβριδισμός του μίγματος στους 56 για 20 λεπτά. Οι όγκοι ήταν ίδιοι με το αντίστοιχο πείραμα που έγινε στη *Salmonella Enteritidis*. Αυτές είναι οι βέλτιστες πειραματικές συνθήκες που προτείνουμε για τη μέθοδο ανίχνευσης. Έτσι, βάσει αυτών των πειραμάτων συνιστούμε να ακολουθούνται αυτές οι παράμετροι σε νέα πειράματα.

Για την *Salmonella Enteritidis* υπήρξε μεγάλη ευαισθησία αλλά και επαναληψιμότητα, ενώ για τον *Bacillus Cereus* δεν υπήρξε η ίδια μεγάλη ευαισθησία ωστόσο ήταν ικανοποιητική και είχε επαναληψιμότητα. Φυσικά θα πρέπει να σημειωθεί πως έγιναν δοκιμές με διαφορετικές πειραματικές συνθήκες -όπως η αλλαγή χρόνου και θερμοκρασίας για την αποδιάταξη, τον υβριδισμό και τις ποσότητες όγκων- για να καταλήξουμε σε αυτό το συμπέρασμα. Ακόμη, αναφορικά με το αποτυχημένο πείραμα με την σκόνη γάλακτος, υπήρξε ελαττωματικό διάλυμα νανοσωματιδίων χρυσού με εκκινητές, και φαίνεται πόσο σημαντικό είναι να ακολουθείται επακριβώς το πρωτόκολλο για την σωστή πρόσδεση των εκκινητών και των νανοσωματιδίων χρυσού.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η μέθοδος ανίχνευσης γενετικού υλικού με νανοσωματίδια χρυσού είναι γρήγορη, αποτελεσματική και έχει μεγάλη ακρίβεια και ευαισθησία, επειδή μπορεί να ανιχνεύσει τα ίχνη έστω και πολύ μικρής ποσότητας DNA. Επίσης, είναι μια οικονομική μέθοδος αφενός γιατί τα υλικά που χρησιμοποιούνται δεν είναι ακριβά και αφετέρου γιατί το αποτέλεσμα μπορεί να ληφθεί χωρίς απαραίτητα την ύπαρξη φωτομέτρου αφού υπάρχει χρωματική αλλαγή η οποία είναι εμφανής με το μάτι και έτσι η φωτομέτρηση δεν είναι αναγκαία.



## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ajmera, A., & Shabbir, N. (2024). Salmonella. Στο *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555892/>
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2014). *Molecular biology of the cell* (6th ed.). Garland Science.
- Babiniotis, G. (2002). *Λεξικό της Νέας Ελληνικής Γλώσσας* [Dictionary of Modern Greek Language] (2nd ed.). Kentro Lexikologias.
- Baptista, P., Pereira, E., Eaton, P., Doria, G., Miranda, A., Gomes, I., ... & Quaresma, P. (2008). Gold nanoparticles for the development of clinical diagnosis methods. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391(3), 943-950. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-1911-x>
- Baptista, P. V., Doria, G., Henriques, D., Pereira, E., & Franco, R. (2005). Colorimetric detection of eukaryotic gene expression with DNA-derivatized gold nanoparticles. *Journal of Biotechnology*, 119(2), 111-117. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.03.010>
- Bottone, E. J. (2010). Bacillus cereus, a volatile human pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(2), 382-398. <https://doi.org/10.1128/CMR.00073-09>
- Brill, R. H. (1999). *Chemical analyses of early glasses*. Corning Museum of Glass.
- Burda, C., Chen, X., Narayanan, R., & El-Sayed, M. A. (2005). Chemistry and properties of nanocrystals of different shapes. *Chemical Reviews*, 105(4), 1025-1102. <https://doi.org/10.1021/cr030063a>
- Calderone, R. A., & Fonzi, W. A. (2001). Virulence factors of Candida albicans. *Trends in Microbiology*, 9(7), 327-335. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(01\)02094-7](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(01)02094-7)
- Cano Londoño, N. A., Velasco, J. O., García, F. C., & Franco, I. B. (2020). Sdg 6 clean water and sanitation: Sustainable use of energy and water resources in the mining sector: a comparative case study of open-pit and alluvial mining technology. Στο I. B. Franco, T. Chatterji, E. Derbyshire, & J. Tracey (Επιμ.), *Actioning the Global Goals for Local Impact* (σσ. 85–104). Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-32-9927-6\\_7](https://doi.org/10.1007/978-981-32-9927-6_7)

- Corma, A., Garcia, H., & Xamena, F. X. L. (2007). Engineering metal organic frameworks for heterogeneous catalysis. *Chemical Reviews*, 107(6), 2411-2502. <https://doi.org/10.1021/cr050199h>
- Daniel, M. C., & Astruc, D. (2004). Gold nanoparticles: Assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chemical Reviews*, 104(1), 293-346. <https://doi.org/10.1021/cr030698+>
- Dreaden, E. C., Austin, L. A., Mackey, M. A., & El-Sayed, M. A. (2012a). Size matters: Gold nanoparticles in targeted cancer drug delivery. *Therapeutic Delivery*, 3(4), 457-478. <https://doi.org/10.4155/tde.12.21>
- Dreaden, E. C., Alkilany, A. M., Huang, X., Murphy, C. J., & El-Sayed, M. A. (2012b). The golden age: Gold nanoparticles for biomedicine. *Chemical Society Reviews*, 41(7), 2740-2779. <https://doi.org/10.1039/C1CS15237H>
- Dubertret, B., Calame, M., & Libchaber, A. J. (2001). Single-mismatch detection using gold-quenched fluorescent oligonucleotides. *Nature Biotechnology*, 19(4), 365-370. <https://doi.org/10.1038/86761>
- Faraday, M. (1857). The Bakerian Lecture: Experimental relations of gold (and other metals) to light. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 147, 145-181. <https://doi.org/10.1098/rstl.1857.0011>
- Fleischmann, R. D., Adams, M. D., White, O., Clayton, R. A., Kirkness, E. F., Kerlavage, A. R., Bult, C. J., Tomb, J.-F., Dougherty, B. A., Merrick, J. M., McKenney, K., Sutton, G., FitzHugh, W., Fields, C., Gocayne, J. D., Scott, J., Shirley, R., Liu, L., Glodek, A., ... Venter, J. C. (1995). Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* rd. *Science*, 269(5223), 496-512. <https://doi.org/10.1126/science.7542800>
- Freestone, I. C., Meeks, N. D., Sax, M., & Higgitt, C. (2007). The Lycurgus Cup — A Roman nanotechnology. *Gold Bulletin*, 40(4), 270-277. <https://doi.org/10.1007/BF03215599>
- Gartner, L. P., Hiatt, J. L., & Strum, J. M. (1998). *Cell biology and histology* (3rd ed). Williams & Wilkins.

- Gayon, J. (2016). From Mendel to epigenetics: History of genetics. *Comptes Rendus Biologies*, 339(7–8), 225–230. <https://doi.org/10.1016/j.crvi.2016.05.009>
- Garcia, J. R., & Gerardo, N. M. (2014). The symbiont side of symbiosis: Do microbes really benefit? *Frontiers in Microbiology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00510>
- Grubisha, D. S., Lipert, R. J., Park, H. Y., Driskell, J., & Porter, M. D. (2003). Femtomolar detection of prostate-specific antigen: An immunoassay based on surface-enhanced Raman scattering and immunogold labels. *Analytical Chemistry*, 75(21), 5936-5943. <https://doi.org/10.1021/ac0346829>
- Grzelczak, M., Pérez-Juste, J., Mulvaney, P., & Liz-Marzán, L. M. (2008). Shape control in gold nanoparticle synthesis. *Chemical Society Reviews*, 37(9), 1783-1791. <https://doi.org/10.1039/B711490G>
- Hossain, Md. M., Polash, S. A., Saha, T., & Sarker, S. R. (2022). Gold nanoparticles: A lethal nanoweapon against multidrug-resistant bacteria. Στο V. Kumar, V. Shriram, R. Shukla, & S. Gosavi (Επιμ.), *Nano-Strategies for Addressing Antimicrobial Resistance* (σσ. 311–351). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-031-10220-2\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-031-10220-2_9)
- Huang, X., Jain, P. K., El-Sayed, I. H., & El-Sayed, M. A. (2008). Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles. *Lasers in Medical Science*, 23(3), 217-228. <https://doi.org/10.1007/s10103-007-0470-x>
- Kelly, K. L., Coronado, E., Zhao, L. L., & Schatz, G. C. (2003). The optical properties of metal nanoparticles: The influence of size, shape, and dielectric environment. *Journal of Physical Chemistry B*, 107(3), 668-677. <https://doi.org/10.1021/jp026731y>
- Kornberg, A., & Baker, T. A. (2005). *DNA replication* (2. ed., paperback ed). University Science Books.
- Li, H., & Rothberg, L. (2004). Colorimetric detection of DNA sequences based on electrostatic interactions with unmodified gold nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(39), 14036-14039. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406115101>
- Lin, M., Pei, H., Yang, F., Fan, C., & Zuo, X. (2013). Applications of gold nanoparticles in the detection and identification of infectious diseases and

biothreats. *Advanced Materials (Deerfield Beach, Fla.)*, 25(25), 3490–3496.  
<https://doi.org/10.1002/adma.201301333>

Looi, M-K. (2020). *The human microbiome: Everything you need to know about the 39 trillion microbes that call our bodies home*. Ανακτήθηκε 15 Ιουλίου 2024 από <https://www.sciencefocus.com/the-human-body/human-microbiome>

Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M., & Stahl, D. A. (2018). *Brock Biology of Microorganisms* (15th ed.). Pearson.

Mancuso, G., Midiri, A., Gerace, E., & Biondo, C. (2021). Bacterial antibiotic resistance: The most critical pathogens. *Pathogens*, 10(10), 1310.  
<https://doi.org/10.3390/pathogens10101310>

Mayer, K. M., & Hafner, J. H. (2011). Localized surface plasmon resonance sensors. *Chemical Reviews*, 111(6), 3828-3857. <https://doi.org/10.1021/cr100313v>

Merriam-Webster. (n.d.). Infection. In *Merriam-Webster.com dictionary*. Retrieved July 21, 2024, from <https://www.merriam-webster.com/dictionary/infection>

Miescher, F. (1871). Ueber die chemische Zusammensetzung der Eiterzellen [On the chemical composition of pus cells]. *Medizinisch-Chemische Untersuchungen*, 4, 441-460.

Mora, C., Tittensor, D. P., Adl, S., Simpson, A. G. B., & Worm, B. (2011). How many species are there on earth and in the ocean? *PLoS Biology*, 9(8), e1001127.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001127>

Μουλιού, Δ. (2022). Μελέτη επίδρασης πολυμορφισμού rs12842 του γονιδίου SLC2A3 στον κίνδυνο εμφάνισης της Νόσου του Πάρκινσον. Ανακτήθηκε στις 15 Ιουλίου 2024 από <https://ir.lib.uth.gr/xmlui/handle/11615/60598>

Mouliou, D. S., & Gourgoulianis, K. I. (2021). False-positive and false-negative COVID-19 cases: Respiratory prevention and management strategies, vaccination, and further perspectives. *Expert Review of Respiratory Medicine*, 15(8), 993–1002.  
<https://doi.org/10.1080/17476348.2021.1917389>

Murphy, C. J., Sau, T. K., Gole, A. M., Orendorff, C. J., Gao, J., Gou, L., ... & Hunyadi, S. E. (2005). Anisotropic metal nanoparticles: Synthesis, assembly, and optical

applications. *The Journal of Physical Chemistry B*, 109(29), 13857-13870. <https://doi.org/10.1021/jp0516846>

Nanopartz Inc. (n.d.). *Gold nanoparticles (AuNPs) synthesis and characterization protocol*. Protocol. Nanopartz Inc. <https://www.nanopartz.com/protocols/AuNPs>

Nataro, J. P., & Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(1), 142-201. <https://doi.org/10.1128/CMR.11.1.142>

Nester, E. W., Anderson, D. G., Roberts, C. E., Pearsall, N. N., & Nester, M. T. (2018). *Microbiology: A Human Perspective* (9th ed.). McGraw-Hill Education.

Podschun, R., & Ullmann, U. (1998). *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(4), 589-603. <https://doi.org/10.1128/CMR.11.4.589>

Rai, M., Yadav, A., & Gade, A. (2009). Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances*, 27(1), 76-83. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.09.002>

Raju, T. N. (1999). The nobel chronicles. *The Lancet*, 354(9179), 690. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)77679-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)77679-0)

RBC Bioscience. (n.d.). *MagCore Plus II instrument protocol* (Instruction manual). RBC Bioscience. <https://www.rbc-bioscience.com/products/magcore/plus-ii-protocol>

Sinden, R. R. (1994). *DNA structure and function*. Academic Press.

Smith, J. (2023). Properties and Applications of Gold Nanoparticles (AuNPs). *Σε NanoTech Journal*. <https://www.nanotechjournal.org/articles/au-nps>

Sreekumar, A., Sreejith, K., & Mukherjee, A. (2012). Applications of gold nanoparticles in medicine and biology: Current and future perspectives. *Current Nanoscience*, 8(1), 141-150. <https://doi.org/10.2174/157341312799279249>

Taylor, D. J., Eizenga, J. M., Li, Q., Das, A., Jenike, K. M., Kenny, E. E., Miga, K. H., Monlong, J., McCoy, R. C., Paten, B., & Schatz, M. C. (2024). Beyond the human genome project: The age of complete human genome sequences and pangenome references. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-021623-081639>

- Towbin, J. A. (1995). Polymerase chain reaction and its uses as a diagnostic tool for cardiovascular disease. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 5(5), 175–185. [https://doi.org/10.1016/1050-1738\(95\)00059-1](https://doi.org/10.1016/1050-1738(95)00059-1)
- Turkevich, J., Stevenson, P. C., & Hillier, J. (1951). A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society*, 11, 55-75. <https://doi.org/10.1039/DF9511100055>
- Vicentini, F. A., Keenan, C. M., Wallace, L. E., Woods, C., Cavin, J.-B., Flockton, A. R., Macklin, W. B., Belkind-Gerson, J., Hirota, S. A., & Sharkey, K. A. (2021). Intestinal microbiota shapes gut physiology and regulates enteric neurons and glia. *Microbiome*, 9(1), 210. <https://doi.org/10.1186/s40168-021-01165-z>
- Wang, J., Liu, G., & Jan, M. R. (2004). Ultrasensitive electrical biosensing of proteins and DNA: Carbon-nanotube derived amplification of the recognition and transduction events. *Journal of the American Chemical Society*, 126(10), 3010-3011. <https://doi.org/10.1021/ja039138m>
- Watson, J. D., & Crick, F. H. C. (1974). Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 248(5451), 765–765. <https://doi.org/10.1038/248765a0>
- Xavier Ruiz, F., & Arnold, E. (2020). Evolving understanding of HIV-1 reverse transcriptase structure, function, inhibition, and resistance. *Current Opinion in Structural Biology*, 61, 113–123. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2019.11.011>
- Zhang, X., & Schwartz, D. K. (2021). Surface plasmon resonance and its application in nanotechnology: The case of gold nanoparticles. *Σε Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. <https://doi.org/10.1166/jnn.2021.19005>
- Zhang, X. D., Wu, D., Shen, X., Chen, J., Sun, Y. M., Liu, P. X., ... & Fan, S. (2011). Size-dependent in vivo toxicity of PEG-coated gold nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 6, 2071-2081. <https://doi.org/10.2147/IJN.S21657>