



Politechnika Wroclawska

Wydział Chemiczny

PROJEKT INŻYNIERSKI

**Wykorzystanie mikroukładów
'lab-on-a-chip' w aparatach diagnostyki
medycznej μ -Tas.**

Autor

Olga Kuteń

słowa kluczowe
Lab-on-a-chip, μ -Tas, Mikroukłady, Detekcja, Analiza

krótkie streszczenie

Mikroukłady lab-on-a-chip są to miniaturowe urządzenia, których zadaniem jest przeprowadzanie standardowych procedur i reakcji laboratoryjnych. Mikroukłady lab-on-a-chip stanowią „serce” aparatów medycznych Micro Total Analysis Systems, które dzięki mikrochipom tworzą zintegrowany i funkcjonalny system do wykonywania analiz medycznych, chemicznych, biotechnologicznych i in. Technologia lab-on-a-chip, rozwija się w bardzo szybkim tempie i powstają coraz to nowe publikacje opisujące nowatorskie rozwiązania z wykorzystaniem mikrochipów.

1. Spis treści

1. SPIS TREŚCI	2
2. WSTĘP	3
3. CEL PRACY	4
4. WPROWADZENIE	5
4.1. KRÓTKA HISTORIA UKŁADÓW LAB-ON-A-CHIP.	5
4.2. UKŁADY LAB-ON-A-CHIP OGÓLNA BUDOWA I FUNKCJE.	5
4.3. APARATURA U-TAS.	6
4.4. MATERIAŁY WYKORZYSTYWANE DO PRODUKCJI MIKROUKŁADÓW LAB-ON-A-CHIP	7
5. ZASTOSOWANIE UKŁADÓW LOC W APARATACH U-TAS.	7
5.1. PROCESY BIOTECHNOLOGICZNE PROWADZONE W UKŁADACH LAB-ON-A-CHIP, STOSOWANYCH W APARATURZE MEDYCZNEJ U-TAS.	8
5.1.1. <i>Zastosowanie elektroforezy w układach LOC.</i>	9
5.1.2. <i>Detekcja produktów otrzymanych po analizie przeprowadzonej przez układy LOC.</i>	13
5.2. PRZYKŁADY ANALIZ WYKORZYSTUJĄCYCH MIKROSYSTEMY LOC	14
5.2.1. <i>Technologia separacji komórek krwi</i>	14
5.2.2. <i>Mikrochipy przeprowadzające reakcję PCR</i>	16
5.2.3. <i>Wykorzystanie Lab-on-a-chip do oznaczania pierwiastków w ustroju</i>	19
5.2.4. <i>Lab-on-a-chip wykorzystywane w detekcji wirusów</i>	22
6. LAB-ON-A-CHIP – PROGNOZY NA PRZYSZŁOŚĆ.	25
7. BIBLIOGRAFIA	26

2. Wstęp

Mikrotechnologie w medycynie umożliwiają przeprowadzenie wyjątkowo specyficznych interakcji na poziomie komórkowym, co pozwala na niezwykle precyzyjną analizę np. procesów biochemicznych zachodzących w ludzkim organizmie. Dlatego mikrotechnologie zapoczątkowały nowy trend technologiczny – powstanie miniaturowych laboratoriów, przeprowadzających standardowe procesy na miniaturowych chipach, zwanych mikroukładami *lab-on-a-chip* (LOC). [1]

Mikroukłady wykorzystywane w analizie medycznej są znaczącą alternatywą dla tradycyjnych urządzeń laboratoryjnych. Gdy na początku lat 90-tych zaczęto wdrażać urządzenia medyczne μ -Tas [2], szybko odkryto zalety układów *lab-on-a-chip* i zaczęto wykorzystywać je na szeroką skalę w szybkich i specyficznych procesach biologicznych i chemicznych [3].

Za powstaniem takich mikroukładów stała potrzeba dostosowywania osiągnięć świata nauki do życia codziennego. W momencie gdy zachodzi potrzeba przeprowadzenia badania w warunkach poza szpitalem czy specjalistycznym laboratorium, to właśnie dzięki najnowszym osiągnięciom mikrotechnologii możliwe jest zaprojektowanie przenośnych, niezawodnych i szybkich urządzeń przeprowadzających podstawowe badania np. analizę parametrów krwi. Takie urządzenia znajdują i wraz z powstawaniem nowych technologii będą znajdowały zastosowania w bardzo wielu miejscach i sytuacjach – począwszy na przykład od wojska przez oddziały intensywnej terapii, a na pacjentach w ich własnych domach kończąc.[4]

3. Cel pracy

Celem pracy było przeprowadzenie analizy obszarów zastosowania mikroukładów *Lab-on-a-Chip* (LOC) w urządzeniach diagnostyki medycznej *Micro Total Analysis Systems* (μ -TAS).

W szczególności przeprowadzono:

- analizę budowy teoretycznego (idealnego) układu *lab-on-a-chip*,
- zaprezentowano podstawowe informacje na temat aparatury μ -Tas,
- omówiono typowe procesy biotechnologiczne w których wykorzystywane są układy LOC,
- zaprezentowano i szczegółowo omówiono wybrane przykłady analiz wykonywanych z zastosowaniem mikroukładów LOC,
- omówiono perspektywy przyszłego wykorzystania LOC w aparatach μ -Tas,

Opisane przykłady analiz przeprowadzanych przez LOC, ukazują budowę danego mikroukładu, sposób przeprowadzanej analizy, zalety poszczególnych rozwiązań LOC oraz możliwości, które niesie za sobą wykorzystanie takiego urządzenia w aparatach μ -Tas. Na zakończenie pokrótce zostały przeanalizowane liczne zastosowania układów LOC, które mogą w szczególny sposób wpłynąć na poprawę jakości życia ludzkiego lub wdrożenie nowych, funkcjonalnych technologii w niedalekiej przyszłości.

4. Wprowadzenie

4.1. Krótka historia układów *lab-on-a-chip*.

Opisując mikroukłady *lab-on-a-chip* używa się sformułowania chip, jednak w tym wypadku nie mamy do czynienia z tradycyjnymi krzemowymi układami scalonymi, tak powszechnie wykorzystywanymi w elektronice. Układy LOC mogą być produkowane z wielu typów materiałów np. z polimerów (akryl, poliester), szkła, krzemu lub też z kombinacji tych materiałów i są wielozadaniowymi mikrosystemami, niekoniecznie opierającymi się jedynie na technologiach elektronicznych. [5]

Prace nad krzemowymi sensorami, prekursorami dzisiejszych układów LOC, rozpoczęto na początku lat 60-tych. Pierwszym układem LOC był chip przeprowadzający chromatografię gazową – został zaprojektowany i opisany w 1979 roku. [6] Od tego czasu zaczęto wiązać duże nadzieje z technologią *lab-on-a-chip* i spodziewano się dużego udziału LOC w monitoringu środowiska, eksperymentach biologicznych nastawionych na implantacje oraz w konstruowaniu sond kosmicznych. Na przełomie lat 80-tych i 90-tych projektowano coraz więcej chipów, które znajdowały zastosowanie w coraz to nowych dziedzinach. Trend ten wciąż się utrzymuje i z roku na rok, obserwuje się wzrost ilości publikacji na temat nowych konstrukcji i zastosowań LOC. Dzisiejsze *lab-on-a-chip* są układami zintegrowanymi, umożliwiającymi przeprowadzanie szeregu różnych reakcji i procesów. [5]

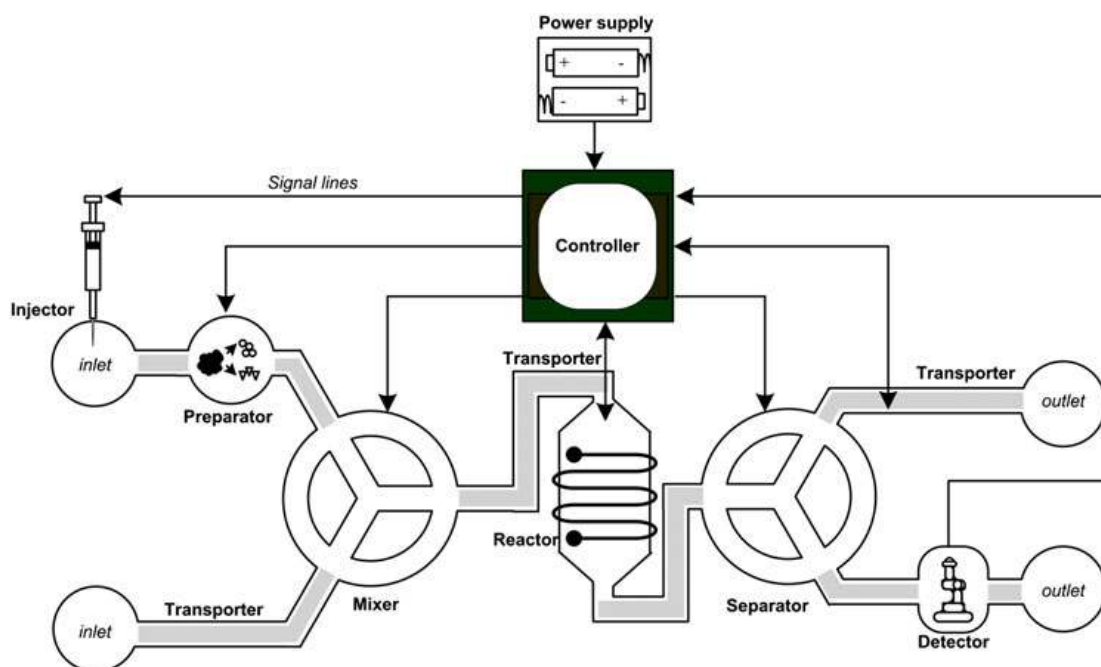
Systemy LOC stają się coraz bardziej skomplikowane dzięki wykorzystaniu najnowszych technik mikrofabrykacji, co powoduje, że będą miały coraz to więcej użytecznych zastosowań w biomedycynie, procesach chemicznych czy nawet w codziennym życiu zwykłych ludzi.

4.2. Układy *lab-on-a-chip* ogólna budowa i funkcje.

Systemy *lab-on-a-chip* (LOC) mogą być zdefiniowane jako zintegrowane, miniaturowe elektromechaniczne systemy, przeprowadzające standardowe reakcje chemiczne i biologiczne, których serce stanowią mikrochipy. Dzięki miniaturyzacji i integracji złożonych funkcji, systemy te umożliwiły automatyzację powtarzalnych procedur laboratoryjnych, co spowodowało, że są coraz częściej wykorzystywane szczególnie w analizie medycznej i inżynierii chemicznej. [7]

Obecnie trudno mówić o standaryzacji układów LOC, ponieważ ich specyficzna budowa i sposób działania zależą od przeprowadzanej analizy. [7]

Stworzono jednak modelowy układ *lab-on-a-chip*, który powinien przeprowadzać standardowe procesy, które są niezbędne przy analizach wykonywanych za pomocą tych systemów. Takie podstawowe funkcje, które powinien spełnić LOC to przyjęcie próbki, umożliwienie zajścia reakcji oraz wykrycie wyniku reakcji oraz możliwość zachowania go w pamięci. [7]



Rys. 1 Zintegrowany modelowy układ *lab-on-a-chip*. Źródło [7]

Dozownik (*injector*) umożliwia precyzyjne wprowadzenie próbki na chip. W rzeczywistości rolę dozownika wstrzykawkowego pełnią np. w pełni zautomatyzowane elektroniczne pipety, pompy strzykawkowe i wiele innych skomplikowanych aparatów do dozowania małych objętości. W preparatorze następuje izolacja analitu od surowej próbki, może to nastąpić poprzez filtrację, prekoncentrację, lizę komórek lub derywatyzację. Następnie reagenty trafiają do miksera gdzie następuje przygotowanie mieszaniny, która trafi do reaktora. Zastosowanie znajdują m.in. miksery magnetyczne, ultradźwiękowe czy też elektryczne. Transporter odpowiada za kontrolę parametrów przepływu płynów, czyli za czas, kierunek i natężenie przepływu. Kontrola ta jest możliwa dzięki zastosowaniu odpowiednich mikropomp. Transporter ma doprowadzić substrat do reaktora, w którym będzie biegła kluczowa dla analizy reakcja. Reaktor jest zwykle wyposażony w grzejniki, czujniki lub siłowniki do kontroli i monitorowania procesu reakcji. Gdy reakcja dobiega końca, niezbędne jest rozdzielenie produktów, co następuje w separatorze. Separacja może opierać się na wielu procesach takich jak elektroforeza, chromatografia lub nawet na zastosowaniu szczypiec optycznych. Bardzo ważnym elementem układu jest sterownik, który generuje sygnały sterujące komponentami systemu, gromadzi dane uzyskane podczas analizy oraz kontroluje przekaz wyników do urządzeń zewnętrznych. [7]

Należy pamiętać, że opisany układ to model funkcjonalnego systemu, mający na celu ukazanie do czego tak naprawdę służą systemy *lab-on-a-chip*. W dalszej części zostaną opisane systemy wykorzystywane w konkretnych analizach, co umożliwi ukazanie jak te systemy są rzeczywiście zbudowane i w jaki sposób pracują.

4.3. Aparatura μ -TAS.

Micro-Total-analysis-Systems są to urządzenia medyczne, których głównymi elementami są mikrochipy uzupełnione o elektroniczne układy detekcji i ścieżki sygnałowe – czyli mikroukłady LOC.

Aparatura μ -TAS oferuje możliwość przeprowadzania wysoce wydajnych oraz jednoczesnych analiz związanych z genetyką, metabolizmem i innymi istotnymi procesami biochemicznymi. [8]

Najważniejszą zaletą urządzeń μ -TAS jest możliwość tworzenia kompletnych mikrosystemów analitycznych poprzez integrację różnych funkcjonalnych podjednostek

w jednym urządzeniu. Funkcje tych podjednostek powinny obejmować przykładowo zdolność do przygotowania próbki, wykorzystanie optycznych możliwości dla wzbudzenia i wykrywania fluorescencyjnie oznaczonych komórek, hodowlę wyselekcjonowanych komórek, amplifikacji DNA w reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR), lub analizy enzymatycznej pojedynczej komórki. Integracja tych wszystkich procesów jest możliwa właśnie dzięki zastosowaniu mikroukładów *lab-on-a-chip*. [8]

4.4. Materiały wykorzystywane do produkcji mikroukładów *lab-on-a-chip*

Główną technologią wykorzystywaną do produkcji układów *lab-on-a-chip* jest mikrofabrykacja bazująca na procesach, w których wykorzystuje się krzem. Choć ta technologia ma wiele zalet w masowej produkcji (bardzo dobra integracja elementów układu i łatwość miniaturyzacji), to ze względu na wysokie koszty i długi czas trwania procesu, zaczęto szukać alternatywnych materiałów do produkcji LOC. W przeciągu ostatnich lat zaczęto stosować niewykorzystywane wcześniej materiały, które okazały się równie biokompatybilne i podatne na obróbkę, dzięki czemu ograniczono użycie krzemu w procesie mikrofabrykacji. Dzięki tym nowym technologiom i materiałom, fabrykacja LOC stała się dużo łatwiejsza pod względem technicznym i bardziej wydajna pod względem ekonomicznym. [9]

Dotychczas bardzo popularną techniką produkcji LOC była fotolitografia, a w produkcji, do skonstruowania zintegrowanego mikroukładu, wykorzystywano głównie wafle krzemowe, szkło, fotorezystory i metale. [10] Wysoki koszt, niska biokompatybilność i konieczność stosowania skomplikowanej aparatury przy produkcji, spowodowały, że zaczęto wykorzystywać materiały polimerowe np. poli(dimetylosiloksan) (PDMS), polimetylmetakrylat (PMMA), kopolimer-cykloolefinowy (COC). [9] Szczególną uwagę należy zwrócić na PDMS, gdyż materiał ten charakteryzują szczególnie niskie koszty uzyskania, duża biokompatybilność i odporność chemiczna, przepuszczalność światła oraz niska autofluorescencja. [11] W porównaniu do kruchych wafli krzemowych i tafli szkła ma zdecydowanie korzystniejsze właściwości mechaniczne. Dodatkowo materiały biologiczne jak np. białka, komórki, antygeny, mogą zostać użyte jako znaczniki, by zaprojektować biologicznie zgodne powierzchnie substratów, co stwarza ogromne możliwości w projektowaniu nowych biosensorów oraz w inżynierii tkankowej. [12]

Obecnie trwa wiele badań nad dostosowywaniem tanich i biokompatybilnych materiałów, w taki sposób, by mikroukłady LOC, mogły jak najlepiej spełniać swoje funkcje. Dąży się do tego by koszt produkcji mikrochipów obniżyć na tyle, by możliwa była produkcja jednorazowych i sterylnych układów, które są bardzo pożądane w zastosowaniach medycznych.

5. Zastosowanie układów LOC w aparatach μ -TAS.

Systemy *lab-on-a-chip* są jak już wcześniej wspomniano, układami bardzo specyficznymi, a ich budowa i funkcje uzależnione są od przeznaczenia danych chipów, czyli od rodzaju analizy, którą mają przeprowadzać.

Opisując zastosowania układów LOC skoncentrowano się na analizie ważniejszych procesów, które są wykorzystywane w mikrosystemach LOC oraz przykładów popularnych analiz z wykorzystaniem LOC.

5.1. Procesy biotechnologiczne prowadzone w układach lab-on-a-chip, stosowanych w aparaturze medycznej μ -Tas.

Istotną zaletą układów LOC jest możliwość wprowadzenia niewielkiej ilości próbki potrzebnej do przeprowadzenia analizy oraz szybkie uzyskanie wyniku badania, dzięki czemu zmniejszają się koszty procesu oraz straty reagentów. [5] Jest to możliwe dzięki odpowiednio dobranym i zintegrowanym technikom obróbki próbek oraz przetwarzania wyników. Szczególnie istotny jest proces separacji, który pozwala na wyodrębnienie analizowanego składnika mieszaniny i jest czynnikiem, który często decyduje o specyficzności danego układu.

Istnieje wiele różnych technik rozdziału badanych mieszanin. Nie wszystkie jednak znajdują zastosowanie w systemach *lab-on-a-chip*. W tabeli nr 1 wymienione są techniki preparacji próbek w przykładowych urządzeniach μ -Tas. Przygotowanie surowej próbki jest niezbędnym krokiem w molekularnej analizie, a już szczególnie w przypadku analiz opartych na amplifikacji DNA lub RNA (PCR). Jest to spowodowane faktem, iż kwasy nukleinowe muszą zostać wyekstrahowane z komórki, a pozostałości w próbce, ze względu na swoje właściwości biochemiczne mogą hamować dany proces, zmniejszając tym samym wydajność amplifikacji PCR. To samo odnosi się do analiz wykonywanych w ochronie środowiska lub w badaniu próbek żywności na obecność zanieczyszczeń i patogenów. Standaryzacja procesów oczyszczania próbek w układach *lab-on-a-chip* jest trudna, ponieważ należy uwzględnić fakt, iż surowe próbki występują w różnej postaci, a ponadto cały proces badania i przygotowywania próbki zależy głównie od tego jaką analizę przeprowadzamy. Możemy jedynie rozważyć, które z tych procesów są bardziej istotne, ze względu na to, że są częściej wykorzystywane w LOC. [7]

Procesy separacji są stosowane nie tylko podczas przygotowania próbki, ale również po zajściu reakcji w układzie, gdy niezbędne jest rozdzielenie mieszaniny produktów, w celu wyodrębnienia tego, który jest istotny w przeprowadzanej analizie. [7]

Produkty po reakcji można rozdzielić stosując popularne techniki np. elektroforezę lub chromatografię. Elektroforeza jest chętniej wykorzystywanym procesem w układach LOC ze względu na łatwiejszą realizację procesu w miniaturowym formacie. [8]

Próbka	Analit	Metody preparacji
Komórki bakteryjne <i>Escherichia Coli</i>	rRNA	Ultrafiltracja, prekoncentracja, liza komórki, ekstrakcja
Mieszanina fluoresceiny i dekstranu	Dekstran	Filtracja
Patogeny występujące w żywności	DNA	Filtracja i przemywanie
Kwasy halogenooctowe (HAA) w wodzie	HAA	Prekoncentracja
Komórki tkanek pochodzących od myszy	DNA	Rozcieńczanie, liza komórki, prekoncentracja
Komórki NIH/3T3	mRNA	Prekoncentracja
Krew	Erytrocyty	Prekoncentracja
Krew	Leukocyty	Filtracja
Krew	DNA z jądra komórkowego leukocytów	Filtracja, liza komórki, prekoncentracja
Białka	BSA, Transferyna, IgG	Derywatyzacja
Erytrocyty	Glutation (GSH), metaloproteina 8 (MMP- 8)	Liza komórki, filtracja i prekoncentracja
Leukocyty	Wirusowe RNA	Filtracja, liza komórki, przemywanie, ekstrakcja
Zakażone komórki drożdży	baktriofag MS2	Filtracja

Tab.1 Metody preparacji analitu z próbki. Przykłady. Źródło [7]

5.1.1. Zastosowanie elektroforezy w układach LOC.

Elektroforeza jest zjawiskiem elektrokinetycznym, w którym pod wpływem przyłożonego pola elektrycznego przemieszczają się makrocząsteczki obdarzone niezerównoważonym ładunkiem elektrycznym. Prędkość przemieszczania się naładowanej elektrycznie makrocząsteczki zależy od jej ładunku, rozmiaru, kształtu oraz oporów ruchu środowiska. Wykorzystując te zależności można dokonać szybkiej separacji różnych makrocząsteczek przy zastosowaniu stosunkowo prostych urządzeń i przy relatywnie niskim nakładzie kosztów. Te względy zdecydowały o powszechności zastosowań technik elektroforetycznych. [13]

Metody elektroforetyczne stosowane w praktyce są pochodnymi lub kombinacją trzech podstawowych rodzajów separacji. Są to: elektroforeza strefowa (*ang. zone electrophoresis*), izotachoforeza (*ang. isotachphoresis*) oraz ogniskowanie izoelektryczne (*ang. isoelectric focusing*). [13]

Obecnie wykorzystywane są układy LOC, które przeprowadzają różne rodzaje elektroforezy, zaczynając od elektroforezy strefowej - podstawowej i najszerzej

stosowanej. [5] Odbywa się ona w nośniku, w którym elektrolit ma w całej objętości stałą wartość pH. Różnica dystansów migracji poszczególnych makrojonów, w ciągu określonego czasu, w bezpośredni sposób wynika z różnicy w ruchliwości elektroforetycznej tych jonów w nośniku w obecności pola elektrycznego.[13] Kończąc natomiast na bardziej skomplikowanej elektroforezie dwukierunkowej (2D) - jest ona połączeniem dwóch, a czasami wszystkich trzech podstawowych rodzajów elektroforezy. Można w ten sposób rozdzielić, na jednym żelu, kilka tysięcy białek znajdujących się w danym rodzaju komórek. Metoda ta pozwala na stosunkowo łatwą analizę zmian ekspresji genu kodującego analizowane białko (białka) i jest wiodącą techniką zaadoptowaną na potrzeby programu proteomiki. [13]

W urządzeniach μ -Tas szczególnie często wykorzystywana jest elektroforeza kapilarna, która może być łatwo zaadaptowana na mikrochipach, ponieważ przepływ próbki może być kontrolowany jedynie za pomocą pola elektrycznego, bez użycia dodatkowych pomp i zaworów. [5]

Działanie mikroukładu lab-on-a-chip przeprowadzającego elektroforetyczny rozdział DNA.

Standardową procedurą stosowaną w laboratoriach inżynierii genetycznych jest rozdział fragmentów DNA, otrzymywanych w ogromnych ilościach na przykład podczas reakcji PCR. Często stosowaną metodą separacji cząsteczek DNA jest elektroforetyczny rozdział fragmentów w żelu, który nie jest skomplikowanym procesem, wymaga jednak czasu i manualnego zaangażowania laboranta. Możliwość automatyzacji separacji fragmentów DNA daje np. urządzenie Caliper AMS 90, opracowane przez naukowców z *Caliper Technologies Corp.* [14]

W urządzeniu Caliper AMS 90, próbki z płytek z 96-ma studzienkami są automatycznie przekazywane na chip przeprowadzający elektroforezę kapilarną w kapilarze ze stopionej krzemionki, za pomocą przepływu napędzanego ciśnieniem.

W elektroforezie kapilarnej, określanej często skrótem HPCE (*ang. high performance capillary electrophoresis*) elektrolit wypełnia kapilarę o wewnętrznej średnicy 50 - 100 μm i długości 20-30 cm. Oba końce kapilary zanurzone są w zasobnikach z odpowiednimi elektrolitami. Sama kapilara wypełniona jest swobodnym elektrolitem.

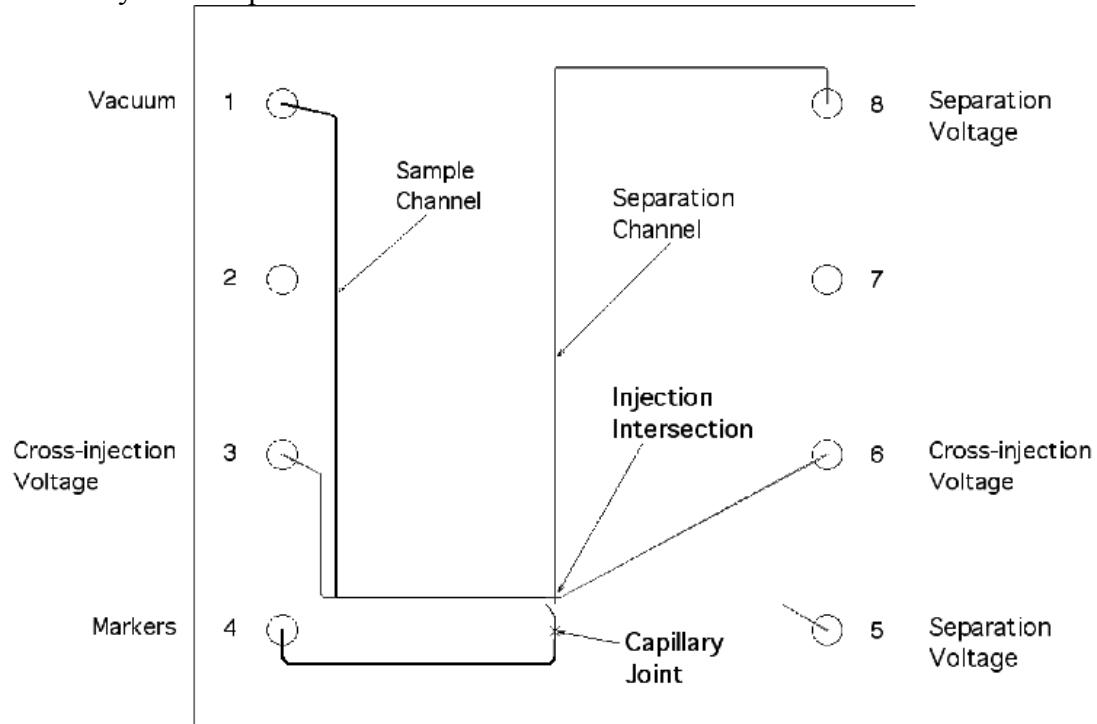
Do obu końców kapilary przykładana się wysokie napięcie co skutkuje pojawieniem się we wnętrzu kapilary pola elektrycznego.[14] Przeznaczeniem elektroforezy kapilarnej są rozdziały analityczne i mikropreparatywne. Objętość aplikowanej próbki waha się zwykle w przedziale 2-4 μl . [13] Czas rozdziału jednej próbki wynosi około 10-20 minut. Detekcja rozdzielonych grup makrocząsteczek realizowana jest u ujścia kapilary przy pomocy detektora. Nie jest wymagane oczyszczanie próbek przed analizą surowych produktów PCR lub fragmentów po trawieniu enzymami restrykcyjnymi. System zużywa tylko około 100 nl każdej próbki, i niezawodnie rozdziela 400-500 DNA próbek w trakcie 8-godzinnej pracy. Rozmiar (par zasad) i stężenia (ng / ml) obliczane są automatycznie dla fragmentów DNA o rozmiarze 100-5000 par zasad. [14]

Uwzględnione zostały dwa rodzaje ruchu próbki w projektowanym układzie analizy DNA, tj. przepływ napędzany ciśnieniem dla wprowadzenia próbki oraz ruch pod wpływem pola elektrycznego w przypadku elektroforetycznego rozdziału próbki. Aby zminimalizować oddziaływanie pomiędzy tymi dwoma trybami, kanały wykorzystywane do elektroforezy zostały zaprojektowane tak by ich głębokości były jak najmniejsze, aby zapewnić wysoką oporność, a poza tym zostały wypełnione rozdzielającym medium o wysokiej lepkości, również zapewniającym duży opór przepływu. W przeciwieństwie do kanału elektroforetycznego, kanał do wprowadzania próbki jest znacznie głębszy. Przez użycie dwóch różnych głębokości, podciśnienie, które wykorzystuje się do wprowadzenia próbki, nie wpływa na rozdział

zachodzący podczas elektroforezy. Dzięki temu możliwa jest równoczesna separacja i wprowadzanie próbek, co skraca czas jednego cyklu pracy urządzenia. [14]

Schemat mikroukładu do przeprowadzania elektroforezy DNA.

Rys. 2 przedstawia układ kanałów wykorzystywanych w analizie DNA rozmieszczonych na chipie.

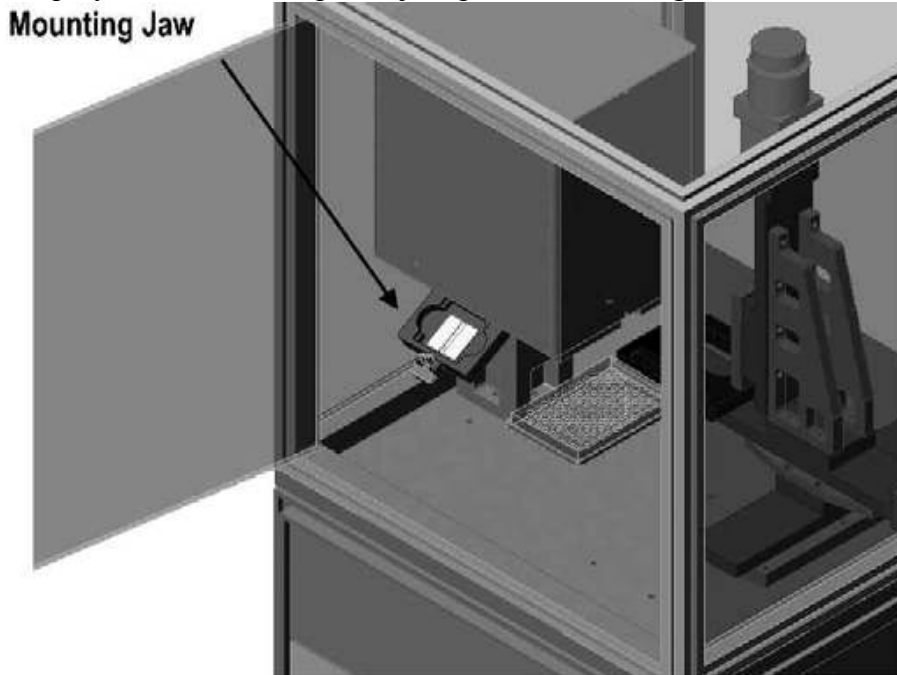


Rys. 2 Schemat mikroukładu *lab-on-a-chip* do elektroforetycznego rozdziału DNA. Źródło [14]

Kanały są wryte w płytce ze stopionej krzemionki i uszczelnione metodą termiczną. Kapilara również wykonana ze stopionej krzemionki o średnicy 50 μm , jest umocowana prostopadłe do płaszczyzny układu. Aby przygotować układ do analizy, studnie 3, 5, 6 i 8 wypełnia się odpowiednim polimerem / roztworem barwnika, który działa jako medium separujące. Kanały połączone do tych studzienek są wypełniane rozdzielającym medium poprzez zastosowanie nadciśnienia. Studzienka nr 4 wypełniona jest roztworem, zawierającym dwa markery fragmentów DNA - niewielki fragment (15 par zasad), oraz duży fragment (7000 par zasad). Kiedy chip znajduje się w urządzeniu, elektrody generują pole elektrostatyczne, które oddziałuje na studzienki 3, 4, 5, 6, 8. Studzienka nr 1 łączy się z próżnią szczeliną. Gdy podciśnienie jest doprowadzane do studzienki 1, próbka pod jego wpływem jest przekazywana przez kapilarę na chip i roztwór z DNA rozpoczyna przepływ przez kanał dla próbki. Podciśnienie warunkuje również przepływ roztworu markera ze studzienki 4, który łączy się z przepływającą próbką, w sekcji wstrzykiwania. Gdy kanał dla próbki jest już całkowicie wypełniony, zwalnia się podciśnienie działające na studzienkę nr 1 i podłącza napięcie, co warunkuje oddziaływanie pola elektrycznego na studzienki 3-6. Pole elektryczne powoduje ruch cząsteczek DNA w roztworze z części kanału dla próbki w kierunku studzienki 6. Gdy roztwór DNA znajduje się w module wstrzykiwania, pole elektryczne jest generowane w obrębie studzienek 5-8, aby zapewnić dalszy postęp elektroforezy. Roztwór przepływa do kanału separującego, gdzie rozdziela się na nieciągłe pasma, wykrywane przez LIF (*Laser-Induced Fluorescence*). Kolejne próbki DNA są wprowadzane na chip podczas separacji. Rozmiar i koncentracja

fragmentów DNA w próbkach są obliczane przez odniesienie czasów migracji i intensywności zabarwienia prążków do znanych fragmentów markerów DNA. [14]

Aby zautomatyzować dostęp próbki, płytką z próbką jest montowana w specjalnym układzie. Chip do analizy DNA jest umieszczony w nieruchomym zespole montażowym, który zawiera system optycznych elementów, automatyczne wyrównywanie, automatyczną regulację silnika krokowego dla źródła wzbudzenia (laser diodowy), czujnik fotodiodowy oraz elektryczne i ciśnieniowe połączenia niezbędne do pracy układu. Kapilara do wprowadzania DNA na chip jest umieszczana przez mały otwór w szczękach montażowych układu i rozciąga się w przybliżeniu 2,5 cm poniżej zespołu montażowego.



Rys. 3 Aparatura μ -Tas wykorzystująca układ *lab-on-a-chip* przeprowadzający elektroforetyczny rozdział DNA. Źródło [14]

Silnik krokowy pozycjonuje i skupia wiązki światła, pochodzące od źródła wzbudzenia, na kanale separującym. Wprowadzanie próbek jest kontrolowane przez układ pozycjonujący x-y-z, który ustawia je tak by stykały się z końcówką kapilary, przez którą nastąpi jej pobranie na chip. Podciśnienie do tłoczenia próbek jest generowane przez szybko reagującą pompę strzykawkową. [14]

Pracę aparatury wykorzystywaną do elektroforetycznego rozdziału usprawnia zastosowanie aplikacji *LabChip HT*, uruchomianej na komputerze, która automatyzuje proces analizy DNA. Aplikacja *LabChip HT* kontroluje działanie systemu poprzez trzy różne podsystemy. Podsystem nr 1 wykorzystuje 8-bitowy sterownik komunikujący się przez port szeregowy do sterownika systemu ciśnieniowego, który służy do wprowadzania próbek na chip. Podsystem nr 2 korzysta z innego 8-bitowego sterownika, który kontroluje pracę zasilacza HV i detekcję optyczną. Ten podsystem jest odpowiedzialny również za kontrolę w czasie rzeczywistym napięć i prądów doprowadzanych do mikroukładu *lab-on-a-chip* do analizy DNA. Ponadto Subsystem 2 kontroluje pracę wzbudzenia lasera i przetwornika A/D, który służy do transmisji sygnału LIF z powrotem do komputera. Układ pozycjonujący x-y-z jest kontrolowany przez podsystem 3. *LabChip HT* ma także możliwość taktowania wartości ciśnienia i napięcia, stosowanych do regulacji pracy chipa oraz zbierania i analizy danych uzyskanych po wykonaniu elektroforezy. [14]

5.1.2. Detekcja produktów otrzymanych po analizie przeprowadzonej przez układy LOC.

Detekcja oparta na fluorescencji, która zapewnia bardzo wysoką czułość i selektywność, jest nadal najczęściej stosowaną metodą wykrywania analizowanych substancji dla mikroukładów LOC. Pomimo tego, iż dostępne są różne źródła wzbudzenia, laserowo indukowana fluorescencja (LIF) jest najlepiej dostosowaną techniką do miniaturowych wymiarów mikroprocesorów. Spójność i niska rozbieżność wiązki laserowej sprawiają, że łatwo skupić ją na bardzo małych objętościach analitu i uzyskać bardzo wysoki poziom naświetlenia, w wyniku czego jest to metoda detekcji, którą można stosować praktycznie bez żadnych ograniczeń w tego typu analizach. [15]

Systemy wzbudzenia oparte na różnego rodzaju lampach, stanowią mniej kosztowną alternatywę w porównaniu do LIF i są bardziej elastyczne w zakresie wyboru długości fali dla źródła wzbudzenia. Mikroskopy, w których układy detekcji wykorzystują lampy ksenonowe lub rtęciowe są stosowane w różnych analizach z imponującymi rezultatami. Obserwuje się również wzrost ilości publikacji, w których w opisywanych eksperymentach, jako źródła wzbudzenia używano diod LED. Ich niewielkie rozmiary i niskie koszty produkcji prawdopodobnie będą miały niemałe znaczenie w włączeniu tej techniki do metod detekcji aplikowanych na mikroukładach LOC. [15]

Odkąd detekcję opartą na chemiluminescencji można osiągnąć za pomocą bardzo prostych urządzeń, które nie wymagają już źródła światła i optycznych komponentów do regulacji ostrości i kolimacji, wzrosło również zainteresowanie rozwiązaniami opartymi na tej technice. Ponieważ dodatkowe źródło światła nie jest stosowane w tej metodzie, nie powstają typowe zakłócenia i efektem tego jest doskonała selektywność w rozpoznawaniu analizowanych substancji. [15]

Chociaż spektroskopia UV-VIS jest metodą wykrywania cząstek, która jest powszechnie stosowana w analizie wyników standardowych procesów np. elektroforezy i ciekłej chromatografii, nie osiągnęła jeszcze tego samego poziomu popularności aplikacji na mikrochipach, co dwie pierwsze wymienione metody. Szersze stosowanie UV-VIS do detekcji analitu na mikrochipach jest na ogół niemożliwe, ze względu na niską czułość detekcji. Jednak w ostatnich latach nastąpił wzrost zainteresowania tą techniką i trwają prace mające na celu poprawę czułości tej metody. [15]

Detekcja analitu w próbce jest ściśle związana z rodzajem substancji analizowanych oraz z budową chipu. Najbardziej typowe metody identyfikowania produktów wykonanej analizy medycznej, można przedstawić dla białek i materiału genetycznego. Należy jednak pamiętać, że wybierając metodę detekcji, po określeniu jaka substancja będzie identyfikowana, trzeba uwzględnić co tak naprawdę jest przedmiotem analizy – czy np. określenie obecności chorobotwórczego białka, czy elektroforetyczny rozdział DNA, który ma na celu uwidocznienie fragmentów po specyficznym trawieniu enzymami restrykcyjnymi, czy może jak w przypadku reakcji PCR, określenie ilości powielonego materiału genetycznego, w celu oszacowania wydajności procesu.

W przypadku gdy produktem reakcji zachodzącej na chipie są cząsteczki specyficznych białek i niezbędna jest ich identyfikacja, to zazwyczaj stosuje się detekcję opartą na fluorescencji lub zastosowaniu sond radioaktywnych [16] w celu określenia czy znaczniki np. fluorescencyjnie znakowane przeciwciała, związały się do cząsteczek białka. [17] Markery fluorescencyjne pomagają nie tylko śledzić położenie białka, ale również badać jego funkcję. Detekcja takiej znakowanej specyficznie cząsteczki następuje przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego. Ze względu na długość fal światła widzialnego, największa rozdzielczość mikroskopu fluorescencyjnego wynosi około 0,2 μm (200 nm). Większą rozdzielczość można uzyskać w mikroskopie elektronowym, stosując przeciwciała związane z markerami gęstości elektronowej. Przeciwciała można również skoniugować z drobkami złota w celu

uwidocznienia ich w mikroskopie elektronowym. Natomiast mikroskopia immunoelektronowa pozwala określić położenie antygeny z rozdzielczością poniżej 10 nm. [17]

W przypadku analizy materiału genetycznego analiza może mieć różny charakter – najczęściej jej celem jest oszacowanie ilości powielanego DNA, zidentyfikowanie określonych sekwencji w materiale genetycznym lub uwidocznienie prążków elektroforetycznych.

Reakcja łańcuchowej polimeryzacji PCR pozwala na powielenie fragmentu DNA nawet w miliardach kopii. Jedna cząsteczka DNA może zostać amplifikowana do ilości, które umożliwiają scharakteryzowanie i manipulowanie nią. Technika ta jest wykorzystywana do wykrywania patogenów i chorób genetycznych, odkrywania źródła pochodzenia włosa pozostawionego na miejscu zbrodni i „wskrzeszania” genów ze skamieniałości. [17] Po powieleniu materiału genetycznego, ważne jest określenie ilości DNA w otrzymanej próbce i wykorzystuje się w tym celu metody fluorescencyjne.

Do pomiarów fluorescencyjnych DNA używa się przede wszystkim barwniki, które interkalują między pary zasad. Powszechnie używanym barwnikiem w ocenie ilościowej produktu reakcji PCR, jest Hoechst 33258, który jest pochodną bisimidazolu, stosowaną do ilościowego oznaczania dwuniciowego DNA w roztworze i charakteryzuje się maksimum absorpcji przy 356 nm oraz maksimum emisji przy 492 nm. Barwnik ten wiąże się specyficznie do dużego rowka w dwuniciowym DNA, co objawia się wzrostem intensywności fluorescencji takiej cząsteczki. Pozwala to na pomiar dwuniciowego DNA nawet w obecności małych ilości pojedynczych nici DNA, RNA lub białek. [18]

W przypadku elektroforezy, prążki lub plamy DNA związane ze specyficznymi promieniotwórczymi sondami DNA, można uwidoczniać w żelu za pomocą autoradiografii. DNA w żelu może być również wybarwiony bromkiem etydyny, który po związaniu z dwuniciowym DNA i wzbudzeniu światłem nadfioletowym, intensywnie fluoryzuje, emitując światło o pomarańczowym zabarwieniu. Stosując tę metodę można łatwo wykryć prążek zawierający jedynie 50 ng DNA. [17]

5.2. Przykłady analiz wykorzystujących mikrosystemy LOC

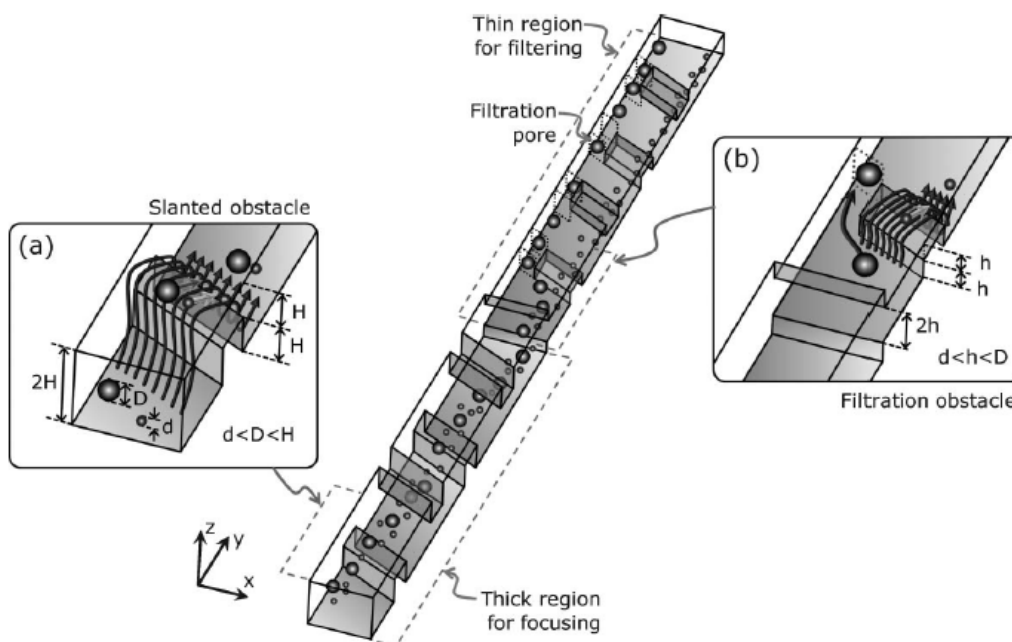
5.2.1. Technologia separacji komórek krwi

Krew jest złożoną mieszaniną składającą się z czerwonych krwinek, białych krwinek, płytek krwi oraz osocza i zawartych w nim białek. By przeprowadzić badanie analityczne krwi, najpierw niezbędna jest separacja krwinek. Ze względu na fakt, iż krwinki mają różne wymiary, kształty i występują w różnym stężeniu w osoczu, w użyciu jest wiele urządzeń analitycznych, które stosują tradycyjne metody rozdziału, bez użycia mikrochipów. [19] Dlatego ze względu na łatwe i praktyczne standardowe rozwiązania, technologia z wykorzystaniem układów *lab-on-a-chip* dopiero zaczyna zyskiwać popularność w tego rodzaju analizach.

W układach LOC podczas separacji komórek krwi, generuje się pole elektryczne lub magnetyczne, w których heterogeniczne komórki mają różne ruchliwości i można zastosować różne techniki w celu ich rozdzielenia. W procesie DEP-FFF (*ang. Dielectrophoretic-field-flow fractionation*) izoluje się leukocyty przez uzyskanie równowagi pomiędzy procesem DEP i siłami sedymentacji.[20] Magnetoforeza (MP) natomiast, wykorzystuje inne magnetyczne właściwości komórek krwi do separacji. [21] Można wymienić jeszcze metodę immunomagnetycznej separacji, w tym przypadku leukocyty zostały odseparowane poprzez selektywne mocowania kulek magnetycznych do powierzchni komórek. [22] Różnica w wielkości i podatności komórek na odkształcenia jest jednym z kryteriów separacji białych i

czerwonych krwinek (erytrocyty są mniejsze i bardziej odkształcalne niż leukocyty). [20] Przydatność filtrów mechanicznych do izolacji leukocytów od erytrocytów zbadano za pomocą układu wykorzystującego filtr wykonany z krzemu i poli (dimetylosiloksanu) (PDMS). Separacja na tym filtrze wykazała usunięcie 99,9% erytrocytów i została zastosowana w układzie LOC, przeprowadzającym reakcję PCR materiału genetycznego z komórek leukocytów. Jednak filtracja za pomocą tego układu nie była prowadzona w sposób ciągły, a objętość próbek poddawanych procesowi filtracji była ograniczona przez przepustowość filtru.

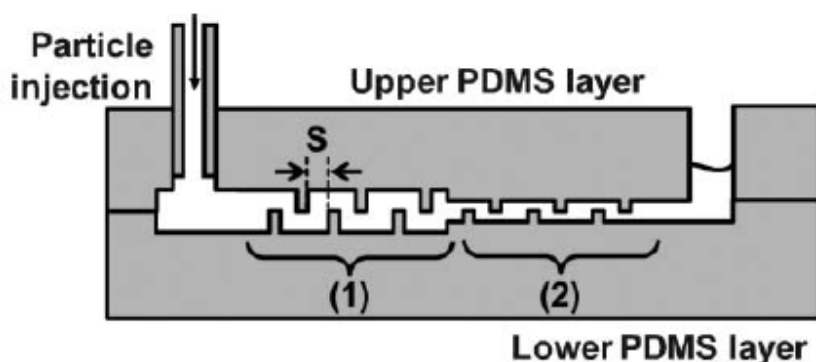
Badacze z KAIST (*Korea Advanced Institute of Science and Technology*) zaprojektowali mikroukład LOC, przeprowadzający ciągłą separację komórek krwi, wykorzystując proces nazywany „*hydrophoretic filtration*”. [19] W procesie tym wykorzystuje się nachylone (ukośne) lub anizotropowe struktury rozdzielające (przeszkody) umieszczone w kanale, w którym zachodzi przepływ próbki, wywołujące hydrodynamiczne interakcje pomiędzy przeszkodami i cząstkami, które pod wpływem tych interakcji poruszają się ruchem rotacyjnym. Dzięki wykorzystaniu ukośnych przeszkód w mikroukładzie, można wyeliminować takie elementy układu jak płaszcz przepływowy i złożona sieć kanałów. Ponadto możliwe jest wygenerowanie bocznego gradientu ciśnień w taki sposób, że cząstki poddane separacji, zaczną się sieciować, co skutkuje ich odchyleniem i ułożeniem wzdłuż bocznego strumienia przepływu. [23] Układ ten pozwala na przygotowanie próbki i sortowanie komórek krwi bez użycia zasilania, pod wpływem specyficznego przemieszczania się cząstek na skutek obecności przeszkód nachylonych (ukośnych) i przeszkód filtracyjnych. W części układu, nazwanej „koncentrującą”, ukośne przeszkody mają większą wysokość i rozmiar szczelin, niż rozmiar średnic cząstek zawartych w próbce, w celu ukierunkowania ich przepływu. W części filtrującej układu, wysokości przeszkód filtracyjnych z porami filtracyjnymi i rozmiary szczelin są zawarte pomiędzy średnicami małych i dużych cząstek. W ten sposób określana jest krytyczna średnica cząstki poddawanej separacji. W związku z tym cząstki o średnicy mniejszej niż wartość krytyczna swobodnie przechodzą przez szczelinę i utrzymują ustalony kierunek przepływu. Natomiast cząstki większe niż wartość krytyczna nie są w stanie przejść przez szczeliny, zderzają się za sobą przed przeszkodą filtracyjną i przemieszczają się do porów filtracyjnych. Ten skomplikowany ruch cząstek obrazuje rys. 3



Rys. 4 Filtr przeprowadzający proces „hydrophoretic filtration.” Źródło [19]

Mikroukład LOC przeprowadzający proces „*hydrophoretic filtration*”, w celu separacji komórek krwi, jest spiętrzoną strukturą, w której dwie warstwy z poli(dimetylosiloksanu) (PDMS) z przeszkodami na górnej i dolnej powierzchni, zachodzą na siebie (rys. 5).

Wysokości przeszkód i szczelin zostały określone jako połowa wartości wysokości kanału. W kanale przepływu można wyróżnić dwa regiony o różnej wysokości. W pierwszym regionie następuje koncentracja komórek krwi i składa się on z 20 ukośnych przeszkód rozmieszczonych na przemian na dolnej i górnej warstwie układu. W drugim obszarze wysokość kanału się zmniejsza, zachodzi tam filtrowanie komórek krwi i znajduje się w nim 20 przeszkód filtracyjnych z porami filtracyjnymi utworzonymi na dnie i w górnej części kanału. [19]



Rys.5 Przekrój przez mikroukład LOC przeprowadzający proces separacji komórek krwi.
Źródło [19]

Procedura przygotowania próbki poddawanej analizie, polega na pobraniu krwi (układ badano wykorzystując krew pobraną od szczura) i sporządzeniu specyficznej mieszaniny krwi z roztworem EDTA i cytrynianem (czynnik przeciwzakrzepowy). Próbkę krwi musi być poddana analizie przed upłynięciem 12 godzin od momentu jej przygotowania. Aby określić skuteczność separacji, leukocyty uwiadczenia się poprzez barwienie barwnikiem Hoechst, (barwnik fluorescencyjny wiążący się specyficznie z DNA). Erytrocyty nie posiadają jądra komórkowego, nie są więc barwione, dzięki czemu leukocyty można zidentyfikować poprzez wykazywanie fluorescencji.[19]

Wyniki przeprowadzonych analiz wykazały, że cząstki o średnicach różniących się jedynie o około 7.3%, zostały całkowicie rozdzielone w układzie LOC wykorzystującym proces „*hydrophoretic filtration*”. Układ można dostosowywać do rozmiarów badanych cząsteczek poprzez zmianę wysokości kanału i odstępów pomiędzy przeszkodami filtracyjnymi.

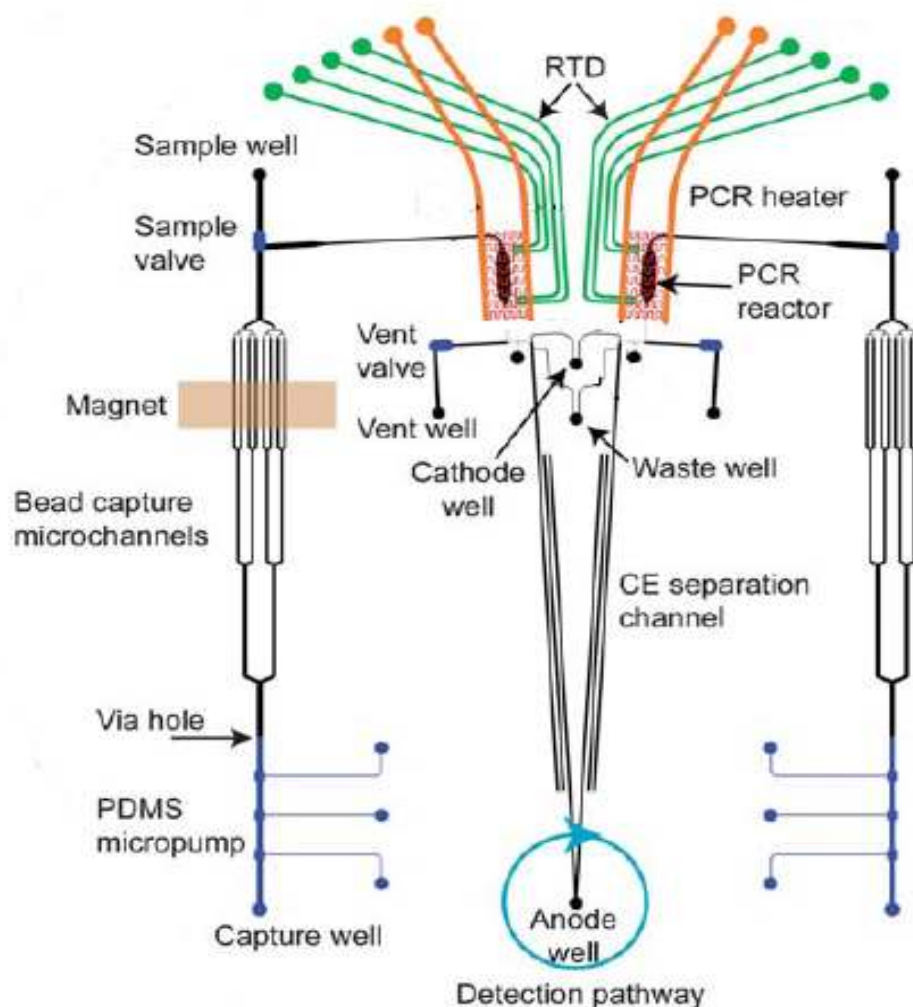
Dzięki zastosowaniu procesu „*hydrophoretic filtration*”, uzyskuje się bardzo dobrą rozdzielczość badanej mieszaniny [19], co sprawia, że metoda ta może wkrótce zostać wykorzystywana na szeroką skalę w urządzeniach medycznych przeprowadzających badania krwi.

5.2.2. Mikrochipy przeprowadzające reakcję PCR

Typową procedurą w procesie identyfikacji genetycznej jest wykorzystanie precyzyjnej metody badania zmienności genomowego DNA w układach STR (*Short Tandem Repeats*). Od szeregu lat wiele loci (określone obszary chromosomu zajmowane przez geny) typu STR, znalazło szerokie zastosowanie w genetyce sądowej, zarówno do badania spornego ojcostwa jak i identyfikacji śladów biologicznych. Szczególnie przydatne są te loci, które charakteryzują się wysoką siłą dyskryminacji, obecnością alleli o bardzo krótkich fragmentach oraz możliwością

ich amplifikacji w reakcji kompleksowego PCR. Ta ostatnia cecha jest niezaprzeczalną zaletą, szczególnie w przypadku pracy ze zdegradowanym materiałem biologicznym bądź znikomymi ilościami DNA. Od lat na rynku dostępne są komercyjne zestawy do kompleksowej amplifikacji wielu loci człowieka. [24,25,26]. Zastosowanie wysoce rozdzielczych technik badania długości i sekwencji fragmentów DNA stworzyło możliwość precyzyjnej identyfikacji nie tylko powszechnie występujących alleli ale również rzadkich wariantów wykazujących polimorfizm długości lub sekwencji. Znajomość częstości alleli i genotypów jest nieodzowna przy statystycznym opiniowaniu przypadków z zakresu genetyki sądowej. Wysoce polimorficzne loci, takie jak mikrosatelity (STR) zawierają liczne allele a szereg z nich należy do rzadkich [27] Metoda badania STR polega na ustalaniu liczby powtórzeń identycznych fragmentów DNA takich jak np. ...-CAG-CAG-CAG-CAG-CAG-CAG-.... Kombinacja tych powtórzeń w każdym z badanych układów jest unikalna dla każdego człowieka i stanowi niejako „genetyczny odcisk palca” (profil genetyczny). Międzynarodowe wytyczne identyfikacji genetycznej podkreślają, że badania te powinny być prowadzone na przynajmniej 11 niezależnych układach STR, co praktycznie umożliwia uzyskanie niepodważalnych i ostatecznych wyników. [26, 27]

Właśnie na potrzeby medycyny sądowej zaprojektowano w pełni zintegrowany mikroukład LOC do przeprowadzania analizy sekwencji STR. Chip umożliwia oczyszczenie specyficznych sekwencji DNA, przeprowadzenie reakcji PCR, oczyszczenie próbki po reakcji PCR oraz kapilarną elektroforezę fragmentów otrzymanych po PCR. Mikroukład ten jest 4-segmentowym stosem płytek, zawierającym liczne szklane mikrokanaly, membrany z PDMS, szklany segment przepływowy oraz szklany segment opornościowego czujnika temperatury (RTD) [28]

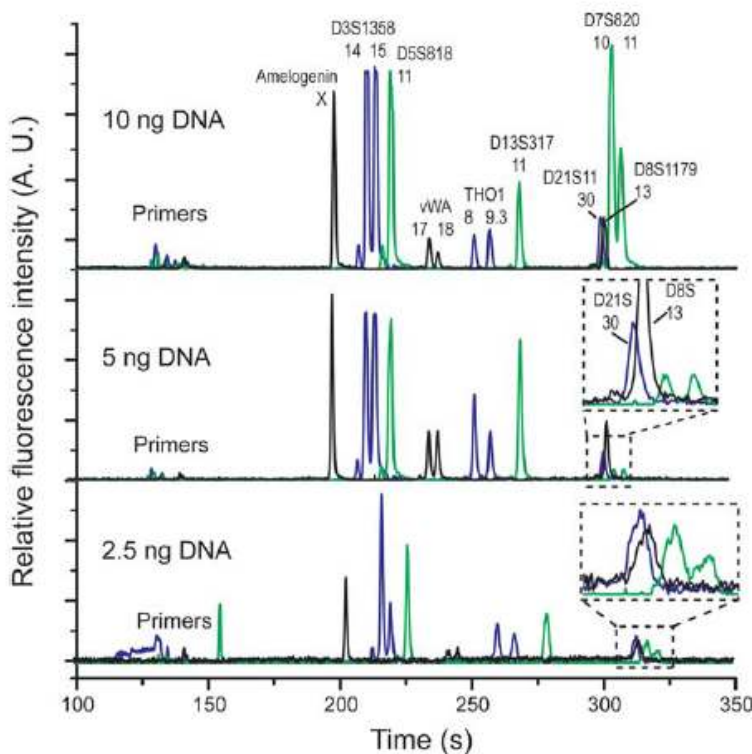


Rys. 6 Schemat zintegrowanego układu LOC przeprowadzającego reakcję PCR. Źródło [28]

W celu przygotowania próbki DNA pochodzącej z wymazu z jamy ustnej, do analizy przeprowadzanej w układzie LOC, niezbędne jest wstępne ogrzanie próbki 20 μl DNA w temperaturze 95°C przez 15 minut w termocyklerze. [28] W tak wysokiej temperaturze następuje denaturacja DNA, czyli separacja podwójnej nici na dwa pojedyncze fragmenty. Po wymieszaniu rozdzielonego DNA z 25 μl buforu cytrynianowego (SSC) i z 5 μl roztworu zawierającego specyficzne sondy znakowane biotyną, ponownie ogrzewa się próbkę w 95 ° C przez 5 min, a następnie prowadzi inkubację w 50° C przez 20 min, aby umożliwić zajście hybrydyzacji DNA ze specyficznymi sondami. Tak przygotowane 20 μl standardu DNA wprowadza się ręcznie przy pomocy pipety do studzienki (*ang. sample well*), po czym próbka jest pompowana do mikrokanalów, wypełnionych fluidalnym złożem, w którym znajdują się immobilizowane magnetyczne kulki, powlekane streptawidyną. [28] Streptawidyna jest białkiem mającym duże powinowactwo do biotyny więc fragmenty DNA zostają związane do kulek rozmieszczonych w złożu. Koniugaty DNA-kulki są następnie przekazywane do 250-nanolitrowego reaktora PCR, w którym zachodzi reakcja autosomalnej amplifikacji sekwencji STR, przy użyciu specyficznych starterów dla sekwencji STR, znakowanych biotyną i związkami fluorescencyjnymi. Łączny czas reakcji PCR wynosi około 40 min. Powstałe produkty po reakcji PCR, są wyznakowane biotyną i są poddawane elektroforezie w żelu zawierającym streptawidynę, w celu zateżenia i oczyszczenia próbki. Następnie próbka jest

poddawana elektroforezie kapilarnej w specjalnej kolumnie o długości 14 cm. Po elektroforetycznym rozdzieleniu, fragmenty DNA są identyfikowane przez system detekcji, obejmujący laser diodowy rozpoznający specyficzne fluorescencyjne sygnały pochodzące od znakowanych sekwencji STR. Całkowity czas analizy wynosi około 3 godzin, jest więc szybsza i wydajniejsza metoda w porównaniu do standardowych testów kryminalistycznych trwających 7-8 godzin. [28]

Wynik analizy przedstawia rysunek nr 7. Amelogenin, D3S1358, TH01, D21S11, D5S818, D13S317, D7S820, vWA, D8S1179 są to nazwy 9 specyficznych miejsc loci, które były identyfikowane w przebadanym materiale genetycznym. [28] Analizując przedstawione wykresy, można łatwo zauważyć, że im większa ilość DNA w próbce, tym dokładniejsza jest identyfikacja specyficznych sekwencji. Możliwość dokonania analizy 2,5-nanogramowej próbki, świadczy o tym, że układ ten jest niezwykle czuły i może być o wiele skuteczniejszy niż tradycyjne rozwiązania laboratoryjne.



Rys. 7 Wyniki identyfikacji sekwencji STR w badanej próbce DNA. Źródło [28]

Możliwość przeprowadzenia analizy wykonanej na opisanym mikroukładzie *lab-on-a-chip* jest znaczącym krokiem w kierunku wdrożenia zintegrowanych i przenośnych urządzeń do wykonywania szybkich i niezawodnych testów kryminalistycznych. Dostępność takich urządzeń w policji, niewątpliwie usprawniłaby proces poszukiwania i identyfikacji podejrzanych, a także wiele innych procedur z zakresu medycyny sądowej.

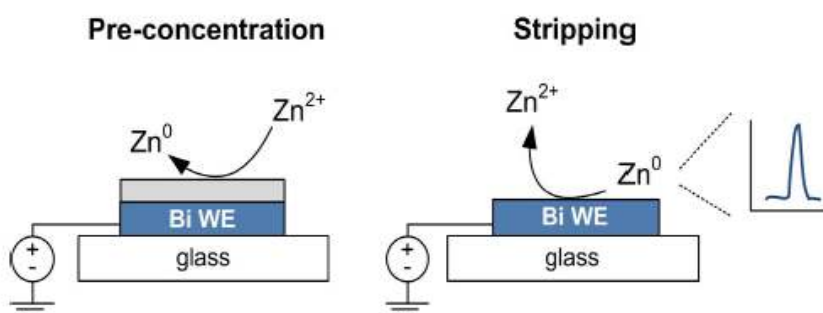
5.2.3. Wykorzystanie *Lab-on-a-chip* do oznaczania pierwiastków w ustroju

W płynach ustrojowych obecnych jest wiele pierwiastków nieorganicznych, odgrywających istotną rolę w procesach życiowych. Najważniejsze z nich to jony żelaza, cynku, miedzi, kobaltu, molibdenu, selenu, jodu i fluoru. Obecne mogą być także pierwiastki toksyczne, takie jak kadm, ołów, rtęć i inne. Stężenia jonów muszą być utrzymywane w odpowiednich granicach, ponieważ zbyt małe stężenie danego niezbędnego jonu wywiera ujemny wpływ na procesy przebiegające z jego udziałem i organizm cierpi na jego niedobór. Natomiast wzrost stężenia danego jonu powyżej normy może uwidoczniać toksyczne działanie jonu. [29]

Biorąc pod uwagę tak istotną rolę pierwiastków w organizmie, niezbędne są skuteczne metody określania ich stężeń w płynach ustrojowych. Przykładowym urządzeniem określającym stężenie pierwiastków w ustroju, jest sensoryczny układ *lab-on-a-chip* mierzący stężenie cynku w osoczu krwi.

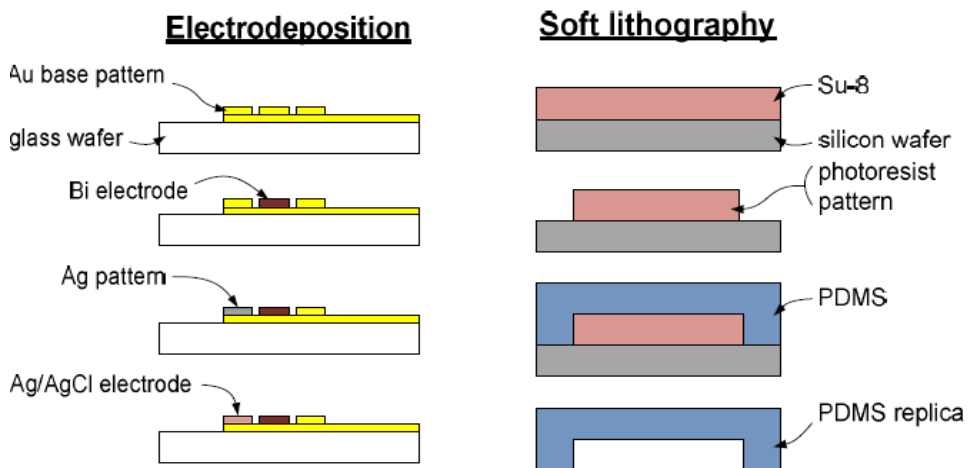
Zawartość cynku w organizmie dorosłego człowieka wynosi od 1,5 do 2,0 g, z czego do 80% przypada na mięśnie i kości. Występuje głównie wewnątrzkomórkowo, natomiast w surowicy jego stężenie mieści się w granicach 80–90 $\mu\text{g/l}$, gdzie jest niemal całkowicie związany z białkami (albuminami, α_2 -makroglobuliną, transferyną, insuliną). Korzystny wpływ cynku na organizm uwidacznia się w ogólnej poprawie metabolizmu, przyspieszaniu gojenia ran i poprawie sprawności umysłowej. Niedobór cynku, wynikający zazwyczaj z ograniczonego przyswajania z pożywienia, powoduje zaburzenia rozwoju układu kostnego, funkcji rozrodczych, stany zapalne skóry, łysienie oraz sprzyja procesom miażdżycowym.[29] Ostatnio zaczęto zwracać uwagę na zależność pomiędzy niedoborem cynku, a złą kondycją zdrowotną i niezadowalającymi wynikami osób przewlekle lub krytycznie chorych, szczególnie w pediatrii [30] Jako, że odpowiednia zawartość cynku w organizmie jest niezbędna do normalnego funkcjonowania układu odpornościowego, to w przypadku poważnych schorzeń i złej kondycji pacjentów, niedobór cynku powinien być ciągle uzupełniany i monitorowany. [31]

Wspomniany sensoryczny układ LOC zbudowany z PDMS oraz krzemu, przeprowadza szybką (10 min.) niezawodną analizę stężenia cynku w próbce osocza. Anodowa voltamperometria strippingowa (AVS= *Anodic Stripping Voltammetry*) została użyta jako elektrochemiczna technika analityczna z wykorzystaniem specjalnych elektrod pokrytych bizmitem [31]. AVS jest techniką obejmującą dwa etapy. W pierwszym etapie, nazywanym zateżaniem, na elektrodzie w wyniku elektrolizy gromadzony jest oznaczany składnik. Proces akumulacji (elektrolizy) realizowany jest poprzez elektrochemiczną redukcję oznaczanej substancji przy stałym potencjale. W zależności od charakteru wydzielonego metalu oraz materiału elektrody, metal tworzy film na powierzchni elektrody. Po elektrolitycznym zateżaniu, elektroda polaryzowana jest w kierunku anodowym i przy odpowiedniej wartości potencjału (charakterystycznego dla danego metalu), wydzielony metal przechodzi do roztworu. Proces ten jest połączony z rejestracją prądu płynącego przez komórkę pomiarową, a wartość prądu jest wprost proporcjonalna do stężenia jonu metalu w roztworze. Ten etap jest nazywanym strippingiem [32]

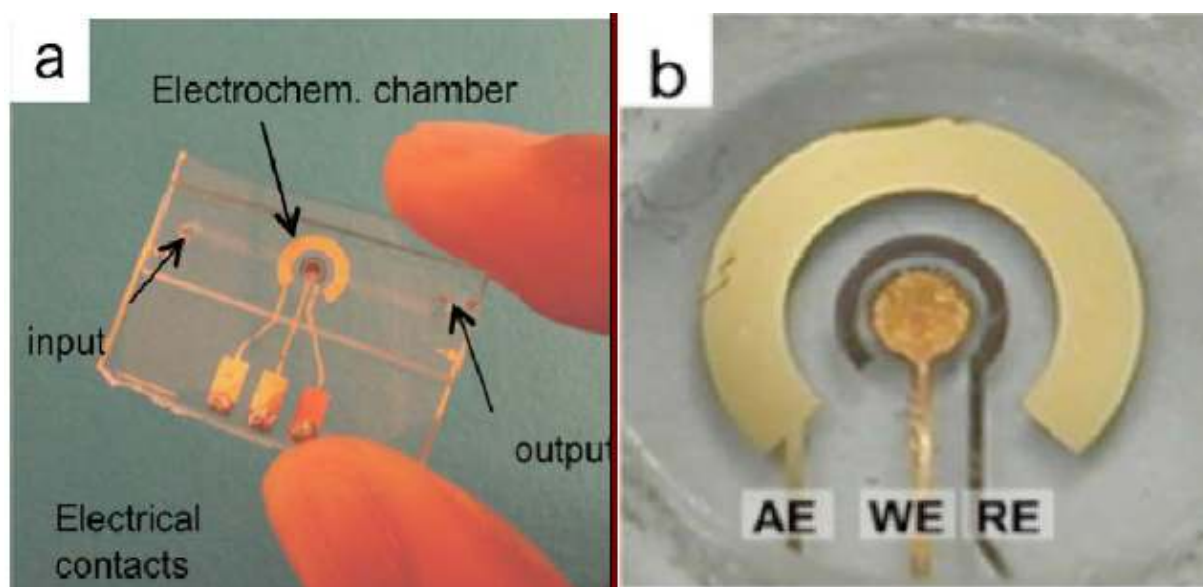


Rys.8 Dwuetapowa metoda AVS wykorzystywana w opisywanym układzie LOC. Źródło [31]

W opisywanym układzie *lab-on-a-chip* najistotniejszym elementem jest sensor składający się z trzech elektrod – elektrody bizmutowej, elektrody odniesienia Ag/AgCl oraz złotej elektrody pomocniczej. W procesie fabrykacji użyto metod galwanizacji i miękkiej litografii.



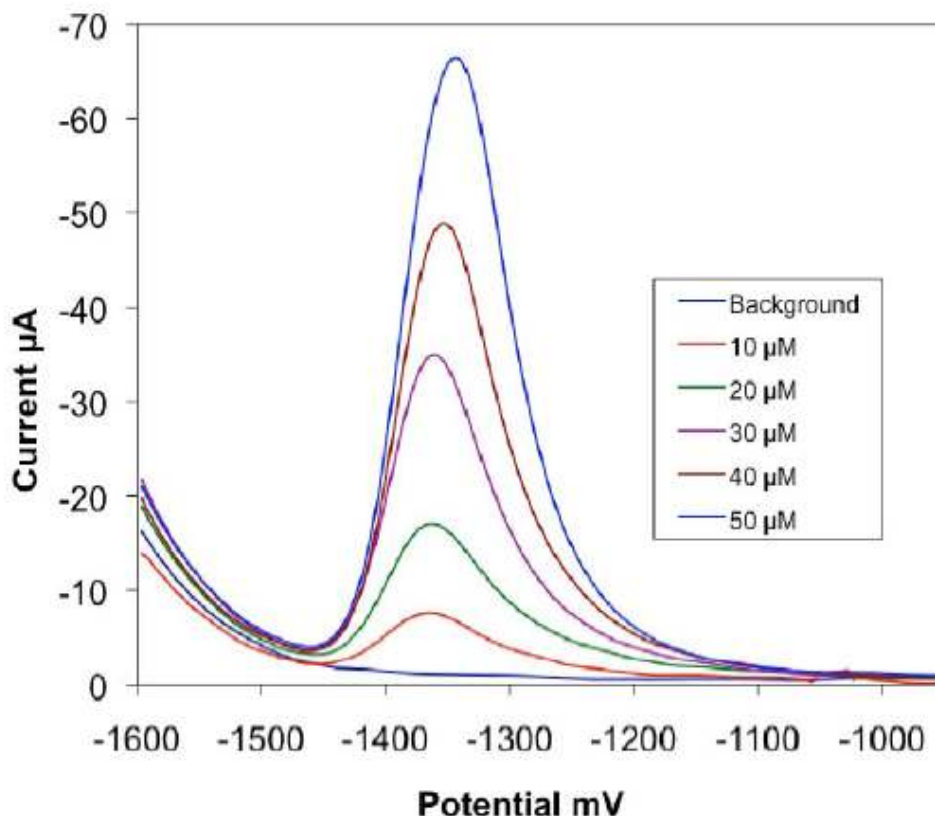
Rys. 9 Metody fabrykacji układu LOC i elektrodowego czujnika. Źródło [31]



Rys. 10 Fotografia układu LOC. Źródło [31]

Rysunek nr 10 przedstawia rzeczywistą postać zarówno całego układu LOC (a), jak i dokładny obraz sensora do pomiaru stężenia cynku (b). AE – złota elektroda, WE – bizmutowa elektroda, RE – elektroda Ag/AgCl. [31]

Wynik analizy przeprowadzonej przez układ LOC obrazuje wykres na rysunku nr 11.



Rys. 11 Zależność stężenia jonów cynku od zarejestrowanej wartości natężenia przy zadanej wartości napięcia. Źródło [31]

Analizując wykres, łatwo można zauważyć zależność opisywaną już wcześniej, tzn. że zarejestrowane natężenie prądu jest wprost proporcjonalne do wartości stężenia jonów cynku w badanej próbce. Zaprojektowany układ jest więc nieskomplikowanym urządzeniem pomiarowym, które może być szeroko wykorzystywane w badaniach krwi, a dostosowanie układu do pomiaru stężenia również innych pierwiastków, pozwoliłoby na duże usprawnienie procedury analizy krwi pod kątem stężenia jonów metali. [31]

5.2.4. Lab-on-a-chip wykorzystywane w detekcji wirusów

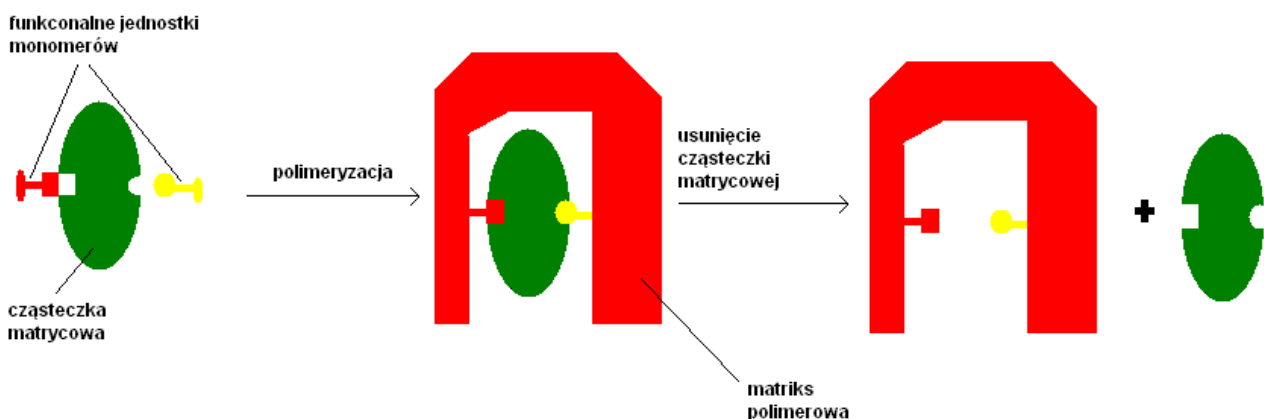
Obserwuje się wzrost częstości występowania zakażeń wirusowych w ciągu ostatnich dziesięcioleci. Spowodowane jest to przede wszystkim ciągłym wzrostem liczby ludności jak i wzrostem popularności zagranicznych wycieczek, szczególnie do krajów tropikalnych. [33]

W konsekwencji szybkie wykrywanie i identyfikacja wirusa odpowiedzialnego za zakażenie jest zawsze nagłym problemem nie tylko dla zdrowia ludzkiego, diagnostyki klinicznej i jednostek odpowiedzialnych za monitorowanie chorób przenoszonych przez patogeny, ale w dobie szerzącego się terroryzmu, niezwykle ważna jest także kontrola żywności w celu wykrycia biologicznych środków bojowych. Możliwość aplikacji szybszych i bardziej dokładnych urządzeń diagnostycznych, pozwoliłoby skorzystać systemom opieki zdrowotnej, w szczególności poprzez znaczne ograniczenie kosztów i zapewnienie lepszego dostępu do danych epidemiologicznych, które mogą być wykorzystane do modelowania sposobu rozprzestrzeniania się chorób zakaźnych, w celu jak najefektywniejszego zapobiegania epidemii. [34] Obecnie dostępne są bardzo różne testy do wykrywania zakażenia wirusowego, bazujące na bardzo wielu technikach detekcji, niestety w większości przypadków są one drogie, pracochłonne i czas oczekiwania na wynik jest stosunkowo długi. [35] Dlatego nadal istnieje zapotrzebowanie na wprowadzanie nowych rozwiązań. Dobrą alternatywą byłyby miniaturowe,

możliwie tanie lub nawet jednorazowe układy, wykorzystujące biosensory do szybkiego wykrywania i dokładnej identyfikacji wielu drobnoustrojów. [36-38] Dlatego aparatura μ -Tas i układy *lab-on-a-chip* zyskują bardzo dużą popularność w przypadku przeprowadzania badań tego typu. [39]

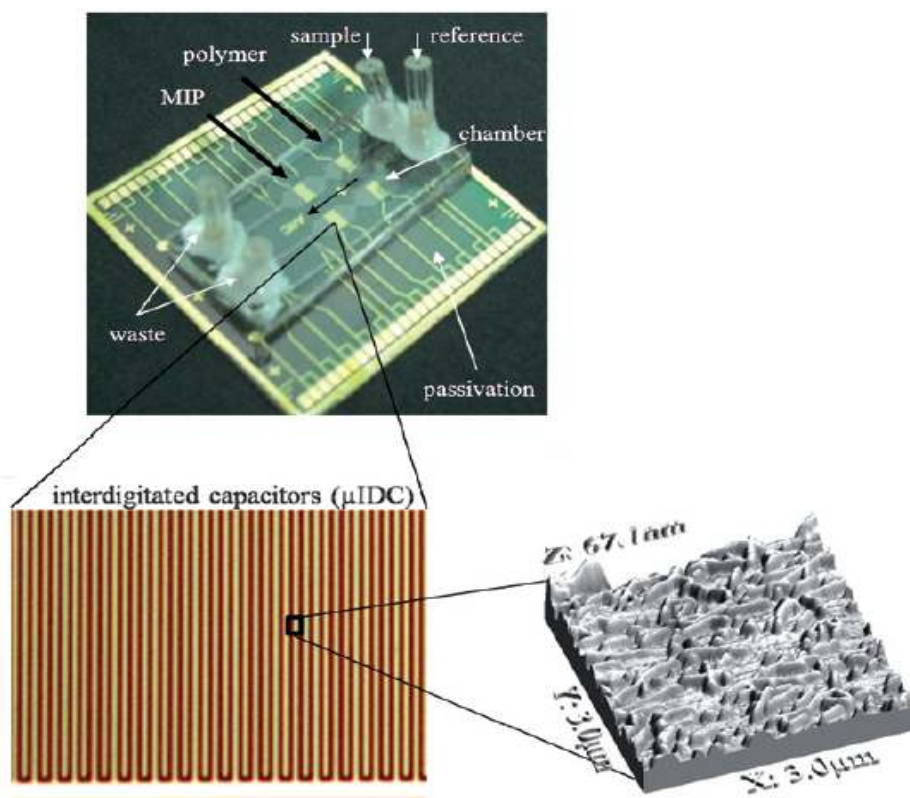
W ostatnich latach analizy za pomocą mikrochipów, którym są poddawane zachowawcze sekwencje DNA lub RNA, metodą PCR i *real time-PCR*, były stosowane w celu wykrycia chorób zakaźnych i określenia rzeczywistego stopnia zaawansowania choroby. [40-42] Kolejnym bardzo ważnym narzędziem analitycznym wykrywającym patogeny, jest chip wykorzystujący metody immunologiczne, które polegają na specyficznych oddziaływaniach typu białko-białko, białko-węglowodany lub białko-DNA. [43] W przypadku analiz opierających się na specyficznych interakcjach, bardzo często wykorzystuje się przeciwciała. Jednak nie jest metoda niezawodna - główną wadą jest nietrwałość unieruchomionego przeciwciała na powierzchni czujnika (biosensora), co prowadzi do zmniejszenia wrażliwości reakcji i braku możliwości ponownego wykorzystania układu. [44-46] Dobrą alternatywą jest zastosowanie techniki „*molecular imprinted polymers*” (MIPs). [47] MIPs są wysoce usieciowanymi polimerowymi strukturami wykazującymi specyficzność dla pojedynczej cząsteczki lub grupy powiązanych strukturalnie cząsteczek.

W metodzie MIP selektywność dla danych molekuł jest warunkowana poprzez rozpuszczenie danej cząsteczki wraz ze związanymi do niej monomerami w rozpuszczalniku i po reakcji polimeryzacji i odmyciu cząsteczek matrycowych, otrzymuje się złożoną strukturę zawierającą polimerową „matriks”, w której zakotwiczone są monomery. [48]



Rys. 12 Schemat reakcji MIP. Źródło : opracowanie własne na podstawie [48]

Układ LOC przedstawiony w tym opisie, złożony jest z kwarcowego podłoża i z polimerowej (PDMS) części układu. Rysunek numer 13 przedstawia rzeczywisty wygląd układu LOC z powiększonymi elementami układu. Działanie tego nowatorskiego mikroukładu *lab-on-a-chip*, było oceniane poprzez detekcję wirusa mozaiki tytoniu (TMV) oraz wirusa HRV2 (*Human Rhinovirus serotype 2*). Wirus mozaiki tytoniu został wyizolowany z tytoniu szlachetnego, który podczas uprawy był systematycznie zakażony wirusem TMV, natomiast wirus HRV2 został wyizolowany z komórek zakażonej hodowli bakteryjnej. Przeprowadzenie reakcji MIP w tym eksperymencie polega na specyficznym zatrzymaniu cząstek wirusowych podczas polimeryzacji w obecności roztworu zawierającego cząstki wirusowe. Obecność patogenów na powierzchni polimeru jest wykrywana za pomocą przeprowadzenia skomplikowanych pomiarów dielektrycznych w odniesieniu do polimeru związanego z cząstkami wirusowymi. [47]



Rys. 13 Układ LOC do detekcji wirusów. Źródło [47]

Pomiary przeprowadzane są przy użyciu systemu składającego się z czterech bezkontaktowych kondensatorów (mikrosensory). Związanie wirusa indukuje zmiany impedancji w materiale polimerowym, co skutkuje zmianą pojemności kondensatorów. Zmiana w dielektrycznej przenikalności polimeru jest spowodowana zastąpieniem buforu wypełniającego zagłębienia na powierzchni polimeru, przez cząsteczki wirusa. Następuje wzrost impedancji, a moment ten jest rejestrowany przez dielektryczne mikrosensory. Dzięki tym zależnościom dwukanałowy system zawierający cztery bezkontaktowe mikrosensory dielektryczne jest bardzo dobrym rozwiązaniem w ciągłym i precyzyjnym wykrywaniu obecności cząsteczek wirusowych. Poza tym układ zapewnia precyzyjną kontrolę nad dynamiką cieczy i tym samym umożliwia badanie powinowactwa wiązania cząstek wirusa i warunków zachodzenia reakcji MIP. [47]

Ze względu na swoją wszechstronność, przedstawiony mikroukład *lab-on-a-chip* doskonale nadaje się do wykrywania szerokiej gamy zakażeń wirusów i jest układem o wysokiej czułości dzięki selektywnemu dostosowaniu warunków mikrofluidalnych, geometrii czujników i wyboru polimerowych materiałów używane w reakcjach MIP. Popularyzacja technologii projektowania układów LOC z wykorzystaniem reakcji MIP, stwarza duże możliwości co do wdrożenia przenośnych, szybkich i niezawodnych urządzeń, pozwalających na wykrycie zakażeń wirusowych. [47]

6. Lab-on-a-chip – prognozy na przyszłość.

Z roku na roku naukowcy z całego świata projektują coraz to nowe układy *lab-on-a-chip*, które wykorzystują zarówno standardowe reakcje i metody obróbki próbek poddawanych analizie jak i nowatorskie i niespotykane dotąd rozwiązania. Trend ten będzie się utrzymywał – współczesny świat potrzebuje rozwiązań opartych na LOC.

Ogromne zapotrzebowanie na urządzenia wykorzystujące mikrochipy obserwujemy w krajach rozwijających się, gdzie nie ma dostępu do wielu nowoczesnych technologii diagnostyki medycznej. One zostały dostosowane do klimatyzowanych i świetnie wyposażonych laboratoriów, ze stałym dostępem do wzorców i odczynników chemicznych, stabilnym zasilaniem elektrycznym, wysoko wykwalifikowanym personelem i szybkim transportem próbek. Systemy LOC pozwalają na miniaturyzację i integrację złożonych funkcji, które można przenieść z zaawansowanych i nowoczesnych laboratoriów nawet do dżungli afrykańskiej. Systemy te muszą być tanie, ale także dokładne w pomiarach, solidne w wykonaniu i dobrze dostosowane do rzeczywistych problemów, miejsca, w którym mają zostać użyte. [49] Wiązane są ogromne nadzieje ze stworzeniem i rozpowszechnieniem jednorazowych układów, które będą mogły być na szeroką skalę wykorzystywane w każdych warunkach, dając jednocześnie pewne wyniki przeprowadzonej analizy i tym samym mogące uratować wiele milionów ludzkich żyć.

Zastosowania LOC nie muszą ograniczać się tylko do medycyny. Układy LOC mają potencjał, aby zrewolucjonizować sektor żywności, rolnictwo i przemysł biosystemów. Przykłady potencjalnych zastosowań układów LOC w przemyśle żywnościowym obejmuje enkapsulację nano-cząsteczek oleju z ryb, monitorowanie patogenów i toksyn w żywności i w wodzie, przeprowadzanie mikro-nano-filtracji dla poprawy jakości żywności, wykrywanie antybiotyków w produktach mlecznych i wiele innych zastosowań. Ponadto mikrochipy umożliwiłyby duży postęp w unowocześnieniu rolnictwa poprzez monitorowanie substancji odżywczych w komórkach roślinnych i sortowanie tychże komórek w celu poprawy jakości upraw, kontrolę stężeń pestycydów i azotanów w roślinach czy nawet uproszczone zapłodnienia *in vitro* u zwierząt hodowlanych, monitorowanie zdrowia zwierząt i ingerencję w szczepienia i terapie. W odniesieniu do LOC można mówić nawet o możliwościach stworzenia nowego podejścia w badaniach dotyczących bioenergii. [50]

Jak widać w dzisiejszym świecie mikrotechnologie mają szansę poprawić bardzo wiele aspektów naszego życia i można się spodziewać, że w niedługim czasie wraz z coraz to nowymi projektami i rozwiązaniami dotyczącymi mikrochipów i urządzeń integrujących działanie tych układów, ludzkość uzyska wiele możliwości do skorzystania z tego dobrodziejstwa nauki.

7. Bibliografia

1. G. A. Silva, *Introduction to Nanotechnology and Its Applications to Medicine*, Surg Neurol,(2004), 61, 216–20
2. A. Manz, N. Graber, H.M Widmer, *Miniaturized total chemical analysis systems: a novel concept for chemical sensing*, Sens. Actuators B,(1990), 1, 244-248.
3. P.S. Dittrich, K.Tachikawa, A. Manz, *Micro total analysis systems. Latest advancements and trends*, Anal. Chem., (2006), 78, 3887-3908.
4. S. Yang, A. Undar, J.D. Zahn, *A microfluidic device for continuous, Real time blond plasma separation*, Lab Chip, (2006), 6, 871-880.
5. K. Herold, A. Rasody, *Lab on a Chip Technology, volume 2: Biomolecular separation and Analysis*, Norfolk, UK, Caister Academic Press, (2009),Preface.
6. S.C. Terry, J.H. Jerman, J.B. Angel, *A gas chromatographic air analyzer fabricated on a silikon wafer*, IEEE, (1979), 26, 1880-1886.
7. Y. C. Lim, A. Z. Kouzani, W. Duan, *Lab-on-a-chip: a component view*, Microsyst Techno,(2010),16, 1995–2015
8. S. J. Lee, S. Y. Lee, *Micro total analysis system (μ -TAS) in biotechnology*, Appl Microbiol Biotechnol (2004) 64: 289–299
9. K. Herold, A. Rasody, *Lab on a Chip Technology, volume 1: Fabrication and Microfluidics* , Norfolk, UK, Caister Academic Press, (2009), *Microtechnology to fabricate lab-on-a-chip for biology applications* .
10. Y. Xia, G.M. Whitesides, *Soft lithography*, Ann. Rev. Mater. Sci.,(1998), 28, 153-85
11. H.B. Liu, H.Q. Gong, N. Ramalingam, Y. Jiang, C.C Dai, K.M. Hui, *Micro air bubble formation and its control during polymerase chain reaction (PCR) In polydimethylsiloxane (PDMS) microreactors*, J. Micromech. Microeng.,(2007) 17, 2055-2064
12. D.T. Chiu, N. L. Jeon, S. Huang, R. S. Kane, C. J. Wargo, I. S. Choi, D. E. Ingber, G. M. Whitesides, *Patterned deposition of cells and proteins onto surfaces by using three-dimensional microfluidic systems*, PNAS, (2000) vol. 97, 2408–2413
13. B. Walkowiak, V. Kochmańska, *Skrypt Elektroforeza Przykłady Zastosowań*.
14. W. A. Ausserer, L. Bousse, S. J. Gallagher, C. B. Kennedy, H. L. Phan, *Automated Lab-on-a-Chip Analysis of DNA Fragments*, JALA , 2001, 6, 69-72
15. S.Götz, U. Karst, *Recent developments in optical detection methods for microchip separations*, Anal Bioanal Chem, (2007), 387, 183–192
16. Y.S. Lee, M. Mrksich, *Protein chips : from concept to practice*, Trends in Biotechnology, (2002), 20, 14-18.
17. J.M Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemia* wyd. 4,Warszawa, Wydawnictwo Naukowe PWN SA, (2009), *Poznanawanie białek i proteomów, Poznanawanie genów i genomów*.
18. T.R. Downs, W.W. Wilfinger, *Fluorometric quantification of DNA in cells and tissue*, Anal Biochem, (1983), 2, 538-47.
19. S. Choi, S. Song, C. Choi, J.K. Park, *Continuous blood cell separation by hydrophoretic filtration*, Lab Chip, (2007), 7, 1532–1538
20. X.-B. Wang, J. Yang, Y. Huang, J. Vykoukal, F. F. Becker, P. R. C. Gascoyne, Anal. Chem., (2000), 72, 832.
21. K.-H. Han and A. B. Frazier, *J Microelectromech. Syst.*, (2005), 14,1422.
22. D. W. Inglis, R. Riehn, R. H. Austin and J. C. Sturm, *Appl. Phys. Lett.*, (2004), 85, 5093.
23. J.K. Park, *NanoBiotech Laboratory, Bio and Brain Engineering*, (2009-2010), Annual Report, 79-81

24. W.E. Frank, B.E. Llewellyn, P.A. Fish, A.K. Riech, T.L. Marcacci, D.W. Gandor, D. Parker, R.R. Carter, S.M. Thibault, *Validation of the AmpFISTR Profiler Plus PCR amplification kit for use in forensic casework*, J-Forensic-Sci. (2001), 46(3), 642-46
25. C.L. Holt, M. Buoncristiani, J.M Wallin, T. Nguyen, K.D. Lazaruk, P.S Walsh, *TWGDAM validation of AmpFISTR PCR amplification kits for forensic DNA casework*. J-Forensic-Sci. (2002), 47(1), 66-96
26. R. Pawlowski, A. Maciejewska.: *Forensic validation of a multiplex containing nine STRs-population genetics in northern Poland*. *Int-J-Legal-Med.* (2000), 114 (1-2), 45-49.
27. A. Dettlaff-Kąkol, R. Pawłowski, *Additional variability at the D21S11 locus: sequencing evidence of a new allele D21S11*33.1*, *Z Zagad. Nauk sądowych* (2001), XLVII, 314-322
28. P. Liu, X. Li, S. A. Greenspoon, J. R. Scherer, R. A. Maties, *Integrated DNA purification, PCR, sample cleanup, and capillary electrophoresis microchip for forensic human identification*, *Lab Chip*, (2011), 11, 1041–1048
29. I. Żak, *Chemia medyczna*, Katowice, Śląska Akademia Medyczna, (2001), Składniki bionieorganiczne.
30. N.Z. Cvijanovich, “*Zinc homeostasis in pediatric critical illness*”, *Pediatric Critical Care Medicine* ,(2009),10, p. 29.
31. P. Jothimuthu, R. A. Wilson,S. Sukavasi, J. Herren, H. Wong, F. R. Beyette, W. R. Heineman I. Papautsky, *Lab-On-A-Chip Sensor for Measuring Zinc In Blood Serum*, *Sensors 2010 IEEE*,(2010), 1222 – 1225.
32. R. Piech, W. W. Kubiak, *Woltamperometria stripingowa*, Skrypt. Akademia Górniczo-Hutnicza, Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki, Katedra Chemii Analitycznej.
33. D. M. Morens, G. K. Folkers, A. S. Fauci, *Lancet Infect. Dis.*, 2008, 8, 710–719.
34. P. Yager, T. Edwards, E. Fu, K. Helton, K. Nelson, M. R. Tam , B. H. Weigl, *Nature*, (2006), 442, 412–418.
35. K. Sliva, O. Erlwein, A. Bittner, B. S. Schnierle, *Virol. J.*, (2004), 1,14.
36. M. F. Diouani, S. Helali, I. Hafaid, W. M. Hassen, M. A. Snoussi, A. Ghram, N. Jaffrezic-Renault, A. Abdelghani, *Mater. Sci. Eng., C*, (2008), 28, 580–583.
37. M. Bisoffi, B. Hjelle, D. C. Brown, D. W. Branch, T. L. Edwards,S. M. Brozik, V. S. Bondu-Hawkins and R. S. Larson, *Biosens. Bioelectron.*, (2008), 23, 1397–1403.
38. P. M. Boltovets, B. A. Snopok, V. R. Boyko, T. P. Shevchenko, N. S. Dyachenko and Y. M. Shirshov, *J. Virol. Methods*, (2004), 121, 101–106.
39. 10 J. Mairhofer, K. Roppert, P. Ertl, *Sensors*, (2009), 9, 4804–4823.
40. C. D. Chin, V. Linder, S. K. Sia, *Lab Chip*,(2007), 7, 41–57.
41. C. Zhang, J. Xu, W. Ma, W. Zheng, *Biotechnol. Adv.*, (2006), 24, 243–284.
42. M. G. Roper, C. J. Easley, J.P.L, *Anal. Chem.*, (2005), 77, 3887–3894.
43. O. Lazcka, F. J. Del Campo and F. X. Munoz, *Biosens. Bioelectron.*, (2007), 22, 1205–1207.
44. R. H. Hall, *Microbes Infect.*, (2002), 4, 425–432.
45. A. Talapatra, R. Mouse, G. Hardiman, *Pharmacogenomics*, (2002), 3, 527–536.
46. S. L. Seurnyck-Servoss, C. L. Baird, K. D. Rodland, R. C. Zangar, *Front. Biosci.*, (2007), 12, 3956–3964.
47. G. M. Birnbaumer, P. A. Lieberzeit, L. Richter, R. Schirhagl, M. Milnera, F.L. Dickert, A. Bailey, P. Ertl, *Detection of viruses with molecularly imprinted polymers integrated on a microfluidic biochip using contact-less dielectric microsensors*, *Lab Chip*, (2009), 9, 3549–3556.

48. C. Widstrand, E. Yilmaz, B. Boyd, J. Billing, A. Rees, Molecularly Imprinted Polymers: A New Generation of Affinity Matrices, *American Laboratory News* October (2006).
49. P. Yager, T. Edwards, E. Fu, K. Helton, K. Nelson, M. R. Tam, B. H. Weigl, *Microfluidic diagnostic technologies for global public Health*, *NATURE*, (2006), 442, 412-418.
50. S. Neethirajan, I. Kobayashi, M. Nakajima, D. Wu, S. Nandagopal, F. Lin, *Microfluidics for food, agriculture and biosystems industries*, *Lab Chip*, (2011), 11, 1574-1586.