

POLITECHNIKA WARSZAWSKA

WYDZIAŁ CHEMICZNY

# Rozprawa doktorska

mgr inż. Kasper Marchlewicz

Opracowanie przenośnego zminiaturyzowanego urządzenia  
diagnostycznego z elektrochemicznym czujnikiem DNA

Promotor

prof. dr hab. inż. Elżbieta Malinowska

Kopromotor

prof. dr hab. Renata Bilewicz

WARSZAWA 2023



Promotorzy:

prof. dr hab. inż. Elżbieta Malinowska (Politechnika Warszawska)

prof. dr hab. Renata Bilewicz (Uniwersytet Warszawski)

Projekt Interdyscyplinarne Studia Doktoranckie "Od chemii do bioinnowacji" TRI-BIO-CHEM jest realizowany w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014-2020 współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego





Dziękuję wszystkim osobom, bez których ta praca by nie powstała. Szczególne podziękowania kieruję do:

**prof. dr hab. inż. Elżbiecie Malinowskiej**, za olbrzymie wsparcie, opiekę naukową, wyrozumiałość i motywowanie do działania,

**prof. dr hab. inż. Renacie Bilewicz**, za cierpliwość, wsparcie i konsultacje,

**dr hab. inż. Robertowi Ziółkowskiemu**, za pomoc w opracowaniu biosensorów, konsultacje oraz wpierającą postawę,

**dr inż. Kamilowi Żukowskiemu**, za pomoc w opracowaniu mikrosystemów PCR, przekazaną wiedzę i doświadczenie,

**prof. dr hab. inż. Zbigniewowi Brzózce**, za wsparcie merytoryczne i konsultacje,

**prof. dr hab. Aleksandrze Zasadzie**, za udostępnienie materiału biologicznego do badań,

**mgr inż. Zuzannie Iwoń** oraz **mgr inż. Idze Ostrowskiej**, za pomoc w prowadzonych badaniach,

**dr inż. Katarzynie Tokarskiej** za konsultacje oraz wsparcie w codziennej pracy,

wszystkim **Pracownikom oraz Doktorantom Katedry Biotechnologii Medycznej** za dobrą atmosferę pracy,

**Przyjaciółom i Rodzinie** za nieocenione wsparcie.

Pracę dedykuję moim Dziadkom,  
Grażynie, Mieczysławowi oraz śp. Halinie

## Streszczenie

Wyniki przedstawione w pracy „Opracowanie przenośnego zminiaturyzowanego urządzenia diagnostycznego z elektrochemicznym czujnikiem DNA” dotyczą badań nad opracowaniem mikrosystemu przepływowego, składającego się z modułu przeznaczonego do przeprowadzania łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) oraz biosensora. Rolą opracowanego biosensora jest detekcja amplifikowanego w module mikrosystemu PCR fragmentu DNA. W niniejszej pracy jako model badawczy wybrano fragment genu zjadliwego szczepu maczugowca błonicy. Prowadzone badania miały na celu umożliwienie detekcji modelowego patogenu z zastosowaniem opracowanego mikrosystemu oraz wykazanie jego przewag nad obecnie stosowanymi metodami.

Część literaturowa pracy obejmuje zagadnienia związane z urządzeniami typu Lab on a chip oraz biosensorami DNA. Główna część rozdziału koncentruje się na opisie budowy i działaniu urządzeń mikrofluidycznych. Opisane zostały sposoby wytwarzania mikrosystemów, ze szczególnym uwzględnieniem stosowanych materiałów konstrukcyjnych oraz technik ich mikroobróbki. Zwrócono również uwagę na najważniejsze elementy mikrosystemów takie jak mikrokanały, mikrozawory, mikropompy oraz mikromieszalniki. Opisane zostały również mikrofluidyczne urządzenia służące do przeprowadzania reakcji PCR. Przedstawiono zastosowania tego typu urządzeń oraz dokonano ich podziału względu na sposób prowadzenia reakcji. W części literaturowej opisane zostały podstawowe zagadnienia związane z biosensorami, ze szczególnym uwzględnieniem biosensorów DNA typu spinki do włosów (ang. *hairpin*). Rozdział zamyka krótki opis problemów epidemiologicznych wywoływanych przez nowe, jak i powracające choroby zakaźne z uwzględnieniem błonicy.

Część dotycząca metodyki pracy rozpoczyna się od przedstawienia stosowanych reagentów, aparatury, a także niektórych procedur, które były wykonywane wielokrotnie podczas pracy badawczej.

Część doświadczalną w której prezentowane są badania można podzielić na dwie części. Pierwsza dotyczy opracowania mikrosystemu PCR oraz zminiaturyzowanych modułów odpowiedzialnych za kontrolę przepływu cieczy. Druga część przedstawia opracowany elektrochemiczny biosensor DNA oraz jego wykorzystanie w procesie detekcji fragmentu genu zjadliwego szczepu błonicy.

Pierwsza część badań, która dotyczyła opracowania mikrosystemu do przeprowadzania łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) rozpoczyna się od opisanie procedury przygotowania matrycy metodą fotolitografii, opisu wykonania warstw polidimetylosiloksanu (PDMS) metodą

odlewu oraz sposobu łączenia jej ze szkłem. Następnie został przedstawiony system grzałek wykorzystywany w badaniach w celu zapewnienia odpowiednich warunków temperaturowych, jego optymalizacja oraz metody pomiarów temperaturowych.

Jako pierwszy został zaprojektowany hybrydowy mikrosystem PCR PDMS/szkło o geometrii serpentynowej. Pierwotnie warstwa PDMS, w której obecne były mikrostruktury została wykonana przy użyciu matrycy wykonanej za pomocą miękkiej fotolitografii (ang. *soft lithography*). Ze względu na liczne ograniczenia tej techniki wytwarzania matrycy, zdecydowano o wykonaniu jej w poli(metakrylanie metylu) (PMMA) techniką mikrofrezowania. Mikrosystem ten wykorzystano do przeprowadzenia szeregu reakcji PCR. Przeprowadzono również badania mające na celu zbadanie możliwości adsorpcji DNA oraz polimerazy DNA na powierzchni mikrosystemu wykonanego z PDMS. Potwierdzony został efekt adsorpcji polimerazy DNA na powierzchni PDMS, któremu postanowiono przeciwdziałać poprzez zastosowanie procedury polegającej na 24 godzinnej inkubacji surowiczej albuminy bydlęcej w mikrokanalach opracowanego mikrosystemu PDMS/szkło przed przeprowadzeniem reakcji PCR.

Kolejnym etapem badań było opracowanie mikrosystemów pracujących w trybie cyklicznym, które umożliwiały przeprowadzenia dowolnej liczby cykli reakcyjnych. Mikrosystemy te wykonano w kilku wariantach różniących się zastosowanym materiałem konstrukcyjnym. Wytworzono mikrosystemy cykliczne PDMS/szkło, ale również mikrosystemy wykonane z PMMA metodą mikrofrezowania, co pozwoliło na uszczelnienie mikrosystemu i ograniczenie objętości martwej poprzez zastosowanie odpowiednio wykonanych złączy (nanoportów). Ponadto wykorzystano zminiaturyzowaną pompę oraz zawór, które pozwoliły na automatyczne wprowadzenie mieszaniny reakcyjnej do mikrosystemu, jej cyrkulację oraz wyprowadzenie.

Ostatnim opisanym w pracy typem mikrosystemu był wielowarstwowy układ składający się z folii poliestrowych wycinanych za pomocą plotera laserowego. Strukturę trójwymiarową mikrosystemu uzyskano, poprzez nakładanie na siebie kolejnych płaskich warstw mikrosystemu. Zastosowane techniki wytwarzania umożliwiły uzyskanie integracji pomiędzy poszczególnymi elementami mikrosystemu, które były wykonywane podczas jednego procesu obróbki, zapewniając wysoką szczelność układu. Integralną część mikrosystemu stanowił system opracowanych pasywnych mikrozaworów zwrotnych, które w połączeniu z zewnętrznymi tłokami pozwalały na kontrolowanie przepływu. Mikrozawory zostały przebadane pod kątem minimalnego ciśnienia otwarcia oraz minimalnego ciśnienia



powodującego ich przeciekanie w przepływie zwrotnym. Mikrosystem ten został z sukcesem wykorzystany do przeprowadzenia asymetrycznej reakcji PCR.

Drugi etap części doświadczalnej stanowiły badania nad biosensorem DNA, które rozpoczęto od wyboru sondy do konstrukcji warstwy receptorowej. Przetestowane zostały cztery sondy różniące się sekwencją nukleotydów oraz strukturą i stabilnością tworzonych przez nie struktur drugorzędowych. Dla każdej z nich mierzona była zmiana sygnału w funkcji stężenia analitu, którym był fragment jednoniciowego DNA o sekwencji nukleotydów komplementarnej do sondy w warstwie receptorowej (cDNA), który został wcześniej wyizolowany z mieszaniny poreakcyjnej PCR oraz oczyszczony przy użyciu wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Zostały określone parametry pracy biosensora dla dwóch czasów hybrydyzacji sondy z analitem: 5 i 30 minut. Zakres liniowej detekcji wynosił dla nich odpowiednio: 0,2–2,0  $\mu\text{M}$  i 13,5–60,0 nM, czułość 0,2  $\mu\text{M}^{-1}$  i 12,8  $\mu\text{M}^{-1}$ , granica wykrywalności: 20,8 nM i 0,5 nM.

Biosensor został następnie wykorzystany do wykrywania cDNA w mieszaninie poreakcyjnej PCR. Obecność w próbce białek użytych do przeprowadzenia reakcji PCR prowadziła do zmniejszenia wydajności hybrydyzacji analitu z warstwą receptorową biosensora. Przeprowadzono badania mające na celu zwiększenie wydajności hybrydyzacji, poprzez modyfikację składu buforu hybrydyzacyjnego (zwiększeniem stężenia jonów magnezu do 15 mM), prowadzenie pomiarów w podwyższonej temperaturze (40°C) oraz dodatek rozpuszczalnika organicznego (30% v/v DMSO).

Opracowany biosensor TOX3/MCH został przebadany pod względem selektywności na zjadliwy szczep maczugowca błonicy. Porównano odpowiedź biosensora na próbki zawierające różny materiał genetyczny. Do badań wybrano DNA wyizolowane ze szczepów bakterii występujących w górnych drogach oddechowych, w tym toksyczny oraz nietoksyczny szczep maczugowca błonicy. Znaczący sygnał analityczny był rejestrowany wyłącznie w przypadku pomiarów prowadzonych w próbkach zawierających analit, co dowodziło selektywności biosensora.

Przeprowadzono badania porównujące dwa różne związki wykorzystane jako wypełniacz w warstwie receptorowej biosensora: merkaptoheksanol (MCH). Oraz dietyloditiokarbaminian (DEDTC). DEDTC w warstwie receptorowej charakteryzował się wysoką stabilnością, a jego zastosowanie pozwoliło na uzyskanie odpowiedzi biosensora na cDNA otrzymane w reakcji PCR prowadzonej w mikrosystemie bez konieczności rozcieńczenia mieszaniny poreakcyjnej.

Opracowany biosensor został poddany miniaturyzacji z wykorzystaniem komercyjnie dostępnego przetwornika trójelektrodowego. Biosensor został zintegrowany z opracowanym mikrosystemem PCR, a następnie wykorzystany jako element detekcyjny w celu wykrywania cDNA amplifikowanego w trakcie 30 minutowej reakcji PCR. Badania prowadzone były dla dwóch typów biosensorów różniących się wypełniaczem: TOX3/MCH i TOX3/DEDTC. Zastosowanie zintegrowanego urządzenia składającego się z mikrosystemu PCR oraz biosensora pozwoliło na przeprowadzenie procesu wykrywania analitu w niecałe 60 minut. Proces ten składał się z reakcji amplifikacji DNA w mikrosystemie, a następnie wykrywania cDNA przez biosensor.

## Abstract

Ph. D. thesis "Development of a portable miniaturized diagnostic device with an electrochemical DNA sensor" concerns research on the development of a microsystem, consisting of a module for carrying out the polymerase chain reaction (PCR) and a biosensor. The purpose of the developed biosensor is to detect the DNA fragment amplified in the PCR microsystem module. In this work, a fragment of the gene of a toxigenic strain of *Corynebacterium diphtheria* was selected as a research model. The conducted research was aimed at enabling the detection of a model pathogen using the developed microsystem and demonstrating its advantages over currently used methods.

The literature part of the work covers issues related to Lab on a chip devices and DNA biosensors. The main part of the chapter focuses on the description of the construction work principle of microfluidic devices. Methods of manufacturing microsystems have been described, focusing on the construction materials used and their micromachining techniques. Other important elements of microsystems such as microchannels, microvalves, micropumps and micromixers were also emphasised in this chapter. Different approaches to developing microfluidic PCR devices and their applications were described. In the literature part this thesis biosensors were described with particular emphasis on DNA biosensors and hairpin type DNA biosensors. The chapter closes with a brief description of the epidemiological problems caused by new and re-emerging infectious diseases, including diphtheria.

The part on the methodology of work begins with the presentation of the reagents, apparatus and selected procedures that were performed during the research work.

The experimental part of this thesis can be divided into two parts. The first concerns the development of a PCR microsystem along with miniaturized modules responsible for flow control in the microsystem. The second part presents the developed electrochemical DNA biosensor and its use in the process of detecting the toxigenic strain of *Corynebacterium diphtheria*.

The first experimental part of this thesis, concerning the development of a microsystem for carrying out the polymerase chain reaction (PCR), begins with the description of the procedure of the matrix preparation by soft photolithography technique. It was used for fabrication of poly(dimethylsiloxane) (PDMS) layer, which was later bonded with a glass substrate. This chapter also presents the system of heaters used in the research to ensure appropriate temperature conditions, its optimization and methods used for temperature measurements.

The hybrid PDMS/glass PCR microsystem with a one long serpentine type geometry channel was designed. Originally, the PDMS layer was fabricated using a matrix made by soft lithography technique. Due to the numerous limitations of this matrix production technique, it was decided to fabricate the matrix in poly(methyl methacrylate) (PMMA) by micromilling technique. This microsystem was used to perform a series of PCR reactions. The possibility of adsorption of DNA and DNA polymerase on the surface of a microsystem made of PDMS was also investigated. The adsorption effect of DNA polymerase on the PDMS surface was confirmed, which was counteracted by the procedure of 24-hour incubation of bovine serum albumin in the microchannels of the developed PDMS/glass microsystem before the PCR reaction.

The next stage of research was the development of microsystems operating in a cyclic mode, which allowed to perform any number of reaction cycles. These microsystems were made in several variants differing in the construction material used. Cyclic PDMS/glass microsystems were fabricated, as well as PMMA PCR microsystems using micromilling technique. The second approach allowed to reduce the dead volume in the microsystem by the use of connectors (nanoports) that were specially created for this purpose. In addition, a miniaturized pump and valve were used, which allowed for the automatic introduction of the reaction mixture into the microsystem, its circulation and removal.

The last type of microsystem described in this thesis was a multi-layer system consisting of polyester foils microfabricated by laser ablation technique. The three-dimensional structure of the microsystem was obtained by joining several layers of foils together. The applied fabrication techniques made it possible to obtain integration between the individual elements of the microsystem, which were made during one machining process. Developed microsystem consisted of a PCR chip integrated with a system of passive micro check valves, which in combination with external pistons allowed to create and control the liquid flow inside the microsystem. Microvalves have been tested for minimum opening pressure and minimum leaking pressure. This developed microsystem was successfully used for carrying out an aPCR reaction.

The second part of the experimental chapter of this thesis was research on the DNA biosensor, which began with the selection of the probe for the construction of the receptor layer. Four probes (TOX 1-4) with different nucleotide sequences were tested. For each of them, the signal change as a function of the concentration of the analyte measured. The analyte was a fragment of single-stranded DNA (ssDNA) to which the nucleotide sequence of the probe in the receptor layer (cDNA) was complementary. The analyte used in preliminary research was

isolated from the PCR reaction mixture and purified using high-performance liquid chromatography (HPLC). The operating parameters of the TOX3/DEDTC biosensor were determined for two hybridization times of the probe with the analyte: 5 and 30 minutes. The linear detection range was respectively: 0.2–2.0  $\mu\text{M}$  and 13.5–60.0 nM, sensitivity 0.2  $\mu\text{M}^{-1}$  and 12.8  $\mu\text{M}^{-1}$ , detection limit: 20.8 nM and 0.5 nM.

The biosensor was then used to detect cDNA in the PCR post-reaction mixture. The presence in the sample of proteins used to carry out the PCR reaction led to a decrease in the hybridization efficiency of the analyte with the biosensor receptor layer. Research was carried out to increase the efficiency of hybridization by modifying the composition of the hybridization buffer (increasing the concentration of magnesium ions to 15 mM), conducting measurements at elevated temperature (40°C) and adding an organic solvent (30% v/v DMSO).

The developed biosensor TOX3/MCH was tested for selectivity for a toxigenic strain of *Corynebacterium diphtheria*. The biosensor response to samples containing different genetic material was compared. DNA isolated from selected strains of bacteria found in the upper respiratory tract, including a toxigenic and non-toxigenic strain of diphtheria corynebacteria, was selected for the study. A significant analytical response was recorded only for mixtures containing the analyte, which proved the selectivity of the biosensor.

Studies were conducted comparing two different compounds used as a blocking agent in the biosensor receptor layer: mercaptohexanol (MCH) and diethyldithiocarbamate (DEDTC). DEDTC in the receptor layer showed high stability, and TOX3/DEDTC biosensor allowed detect cDNA-PM without the modification of the post-reaction mixture.

The developed biosensor was miniaturized using a commercially available three-electrode transducer. The biosensor was integrated with the developed PCR microsystem, and then used as a detection element to detect cDNA-PM amplified during a 30-minute PCR reaction. The research was carried out using types of biosensors differing in blocking: TOX3/MCH and TOX3/DEDTC. It allowed to carry out the entire analyte detection process, which consisted of cDNA amplification in the microsystem, and then its detection by a biosensor in less than 60 minutes.

## Spis treści

WSTĘP I CELE PRACY .....	10
I. Część literaturowa.....	13
1. Lab on a chip .....	13
1.1.Podstawy mikrofluidyki.....	14
1.2.Wytwarzanie urządzeń typu Lab on a Chip.....	15
1.3.Materiały i technologie obróbki.....	16
1.4.Elementy mikrosystemów.....	25
1.5.Mikrofluidyczne urządzenia PCR.....	30
1.6.Zastosowanie zminiaturyzowanych urządzeń PCR do celów diagnostycznych.....	37
2. Biosensory jako narzędzia do wykrywania bioanalitów .....	40
2.1.Biosensory DNA i RNA .....	42
2.2.Biosensory DNA typu „hairpin” .....	45
2.3.Sposoby immobilizacji DNA.....	47
3. Błonica i metody jej wykrywania .....	50
II. Metodyka .....	52
1. Reagenty .....	52
2. Roztwory.....	54
3. Materiały.....	54
4. Aparatura .....	54
5. Amplifikacja fragmentu genu zjadliwego szczepu błonicy za pomocą standardowej reakcji PCR.....	55
6. Amplifikacja fragmentu genu zjadliwego szczepu błonicy za pomocą asymetrycznej reakcji PCR.....	56
7. Procedura przygotowania warstwy receptorowej biosensora.....	57
8. Elektroforeza żelowa .....	57
III. Część doświadczalna .....	59
1. Mikrosystemy PCR.....	59
2. System grzewczy .....	60

<b>3.</b>	Hybrydowy mikrosystem PCR PDMS/szkło.....	63
3.1.	Serpentynowy mikrosystem PCR .....	66
3.2.	Mikrosystemy cykliczne PDMS/szkło.....	79
<b>4.</b>	Mikrosystem cykliczny wykonany z PMMA .....	86
<b>5.</b>	Mikrozawór.....	91
<b>6.</b>	Wielowarstwowy przepływowy mikroukład PCR z zintegrowanym systemem mikrozaworów pasywnych .....	100
<b>7.</b>	Biosensor .....	107
7.1.	Wybór sekwencji nukleotydów w sondzie .....	108
7.2.	Zastosowanie biosensora do badania próbek rzeczywistych .....	115
7.3.	Wpływ DMSO na proces hybrydyzacji w matrycy zawierającej białka .....	118
7.4.	Selektywność sensora na zjadliwy szczep maczugowca błonicy .....	120
7.5.	Miniaturyzacja biosensora .....	124
7.6.	Dietyloditiokarbaminian jako czynnik blokujący warstwy receptorowej .....	126
<b>8.</b>	Propozycja zintegrowanego urządzenia służącego do wykrywania zjadliwego szczepu maczugowca błonicy .....	129
PODSUMOWANIE I WNIOSKI .....		134
BIBLIOGRAFIA .....		138
WYKAZ SKRÓTÓW .....		148

## Wstęp i cele pracy

Zagrożenia związane z rozprzestrzenianiem się chorób zakaźnych pozostają jednym z głównych czynników ryzyka dla ochrony zdrowia publicznego we współczesnym świecie. Ostatnia pandemia COVID-19 wywołana przez wirusa SARS-CoV-2 wyraźnie pokazała jak ogromne znaczenie ma szybka diagnostyka dla ochrony zdrowia i życia pacjentów a także w zapobieganiu nowym zakażeniom. Trudno jest przewidywać pojawienie się nowych, nieznanych patogenów oraz sposobów walki z nimi, jednak nie tylko one stanowią zagrożenie. W ostatnich latach odnotowano rosnącą liczbę przypadków pojawienia się niektórych chorób zakaźnych, które od dłuższego już czasu były uważane za opanowane przez światowe programy szczepień. Jedną z takich chorób jest błonica, która diagnozowana jest obecnie u kilku tysięcy osób rocznie. Zarówno w przypadku COVID-19 jak i błonicy, szybka diagnoza jest podstawą do rozpoczęcia leczenia oraz walki z rozprzestrzenianiem się choroby. Tradycyjne metody diagnostyczne, pomimo swojej skuteczności, posiadają szereg ograniczeń takich jak czas wykonywanych oznaczeń oraz konieczność dostępu do zaawansowanych laboratoriów oraz wykwalifikowanego personelu. Duża odległość od ośrodków diagnostycznych stanowi poważny problem szczególnie dla słabo zurbanizowanych rejonów świata o niskim poziomie publicznego systemu ochrony zdrowia [1].

Urządzenia typu Point-of-Care (POC) stanowią alternatywę dla badań diagnostycznych wykonywanych w specjalistycznych laboratoriach. Charakteryzują się możliwością przeprowadzenia badań w krótkim czasie w miejscu przebywania pacjenta, bez konieczności transportu próbki. Zazwyczaj urządzenia tego typu są proste w obsłudze, gdyż procedura prowadząca do uzyskania wyniku przeprowadzana jest w sposób zautomatyzowany. Rozwój platform POC jest ściśle związany z urządzeniami typu Lab on a chip (LOC), które pozwalają na przeprowadzanie jednego lub więcej procesów laboratoryjnych w systemach o niewielkich wymiarach. Operują one również na niewielkich objętościach roztworów, co przyczynia się do uzyskania niskich kosztów diagnostyki, a także może mieć wpływ na szybkość uzyskiwanych wyników. Przykładem urządzenia typu Lab-on-a-chip są mikrosystemy służące do przeprowadzania łańcuchowej reakcji polimerazy, które z powodzeniem zostały wykorzystane jako elementy platform diagnostycznych w kierunku detekcji patogenów odpowiedzialnych za różnego rodzaju choroby zakaźne [2, 3].

Mikrosystemy PCR stanowią alternatywę do tradycyjnie stosowanych termocyklerów, pozwalającą na amplifikację DNA w niewielkim urządzeniu. Istnieje wiele typów tego rodzaju urządzeń, różniących się podejściem do sposobu prowadzenia reakcji, wymiany ciepła,



uzyskiwania przepływu oraz zastosowanych materiałów [4–8]. To co łączy większość mikrosystemów PCR to krótki czas amplifikacji. W przypadku termocyklerów czynnikiem limitującym szybkość reakcji jest powolna zmiana temperatury komór grzewczych, w których znajduje się mieszanina. W przypadku mikrosystemów PCR, ze względu na niewielkie objętości stosowanych roztworów, problem ten rozwiązuje się poprzez prowadzenie reakcji w przepływie lub zastosowanie zaawansowanych sposobów dostarczania i odbierania energii.

Systemy mikroprzepływowe znajdują obecnie coraz szersze zastosowanie w różnych dziedzinach nauki, a nowoczesne technologie wytwarzania sprawiają, że są również coraz częściej przeznaczone do masowej produkcji i użytku komercyjnego. Mimo niewątpliwych zalet mikrosystemów, opracowywanie tego typu urządzeń wiąże się z wieloma wyzwaniami. Ze względu na niewielkie wymiary mikrostruktur oraz małe objętości reagentów, siły powierzchniowe przeważają nad objętościowymi. Powoduje to między innymi przepływ laminarny w mikrokanałach, a także utrudnione mieszanie reagentów lub ich niepożądaną adsorpcję. Te oraz inne efekty należy brać pod uwagę w trakcie tworzenia oraz badania mikrosystemów, szczególnie na etapie doboru materiałów konstrukcyjnych, technik ich obróbki oraz samej geometrii mikrostruktur.

Istotną częścią większości mikrosystemów, w szczególności tych z wymuszonym przepływem, są takie elementy jak pompy oraz zawory. Do poprawnego funkcjonowania niektórych systemów mikrofluidycznych mogą być z powodzeniem wykorzystane urządzenia dużych rozmiarów, często wielokrotnie większe niż sam mikrosystem. Jednak proces miniaturyzacji elementów kontrolujących przepływ pozwala na ich integrację z mikrosystemami, co pozwala na automatyzację, obniżenie kosztów oraz zastosowanie w przenośnych urządzeniach analitycznych.

Detekcja DNA amplifikowanego w reakcji PCR może odbywać się na różne sposoby. Jednym z nich jest zastosowanie biosensorów DNA, które ze względu na specyficzne oddziaływania na poziomie molekularnym pomiędzy warstwą receptorową a analitem umożliwiają selektywną detekcję. W urządzeniach tego typu wykorzystuje się często przetworniki elektrochemiczne, ze względu na niskie koszty oraz możliwość ich miniaturyzacji, co wpisuje się w ideę tworzenia przenośnych, jednorazowych systemów przeznaczonych do detekcji patogenów w miejscu przebywania pacjenta. Biosensory DNA przeznaczone do analizy próbek rzeczywistych wymagają odpowiedniego zaprojektowania warstwy receptorowej oraz dostosowania warunków, w których prowadzone są pomiary. Istotnym parametrem elementu detekcyjnego jest jego selektywność na wybrany patogen, ale także czułość i granica wykrywalności. Ostatecznie najistotniejszą informacją, którą powinien

dostarczać tego typu biosensor jest odpowiedź jakościowa, czy w badanej próbce znajduje się fragment DNA patogenu, dla wykrywania którego został on opracowany.

Celem niniejszej pracy jest opracowanie systemu umożliwiającego szybkie i jednoznaczne wykrywanie fragmentu genu przykładowego patogenu tj. szczepu maczugowca błonicy odpowiedzialnego za wywoływanie błonicy. Patogen ten został wybrany nie tylko ze względu na tendencję wzrostową odnotowywanych przypadków choroby, ale również jako model, na którego przykładzie mogą być opracowywane podobne rozwiązania dotyczące innych chorób zakaźnych. Badania przedstawione w niniejszej pracy mogą stanowić podstawę do rozwijania innych systemów czy urządzeń diagnostycznych, gdyż część opracowanych rozwiązań, zarówno pod względem zastosowanych materiałów, technik wytwarzania oraz mechanizmów działania charakteryzuje się dużym stopniem uniwersalności.

#### Główne etapy pracy:

- opracowanie zminiaturyzowanego systemu przeznaczonego do szybkiej amplifikacji określonego fragmentu DNA;
  - zastosowanie najnowszych materiałów oraz technologii obróbki;
  - opracowanie mikrostruktur służących do kontrolowania przepływu oraz ich integracja z mikrosystemem PCR;
  - przynajmniej trzykrotne skrócenie czasu reakcji PCR prowadzonej w mikrosystemie w stosunku do standardowej procedury
- opracowanie biosensora elektrochemicznego umożliwiającego detekcję fragmentu DNA amplifikowanego w wyniku reakcji PCR;
  - wybór sondy molekularnej oraz wypełniacza wykorzystanych do stworzenia warstwy receptorowej;
  - dostosowanie warunków pomiarowych oraz składu próbki;
- integracja mikrosystemu PCR z biosensorem DNA oraz jego ewaluacja;
  - wykonanie biosensorów z zastosowaniem zminiaturyzowanych przetworników;
  - potwierdzenie eksperymentalne możliwości wykrywania zjadliwego szczepu maczugowca błonicy za pomocą opracowanego urządzenia.

## I. Część literaturowa

### 1. Lab on a chip

Lab on a chip (LOC), nazywane również laboratorium na chipie, jest niewielkim urządzeniem, zazwyczaj o wymiarach od kilku milimetrów do kilku centymetrów, które umożliwia przeprowadzenie z jego wykorzystaniem jednego lub kilku procesów laboratoryjnych. Opracowane urządzenia LOC często przypominają standardowe urządzenia laboratoryjne, których rozmiar został wielokrotnie zmniejszony, jednak ich zasada działania może być znacząco różna, ze względu na technologie, materiały i rozwiązania stosowane w procesie miniaturyzacji. LOC mogą być wykorzystywane w połączeniu z innymi urządzeniami lub działać niezależnie tworząc systemy, które integrują wiele procesów, takich jak pobieranie i transport próbki, oczyszczanie, rozdzielanie i detekcja, prowadzących do ostatecznej analizy. Takie niezależne urządzenia nazywane są  $\mu$ TAS (ang. *micro Total Analysis System*), a ich przykładem zastosowania w dziedzinie medycyny są urządzenia służące do bezpośredniej i szybkiej diagnostyki pacjenta (POC Devices, ang. *Point of care Devices*).

Wykorzystanie urządzeń LOC posiada wiele zalet w porównaniu ze standardowymi procedurami laboratoryjnymi. Miniaturowe chipy operują niewielkimi objętościami próbek rzędu mikro, nano, a czasami nawet pikolitrow. Pozwala to na zmniejszenie ilości dostarczanych reagentów i energii, a także na zmniejszenie ilości powstających odpadów, co w ostatnich latach (ze względu na ciągle zaostrzanie przepisów dotyczących postępowania z odpadami niebezpiecznymi) ma coraz większe znaczenie, zwłaszcza w przypadku wykorzystania tego typu urządzenia poza specjalistycznymi laboratoriami. Niewielkie objętości próbek, które mogą być wykorzystywane w LOC, często w standardowych procedurach laboratoryjnych wymagają wielokrotnego rozcieńczenia, które może prowadzić do utraty informacji np. poprzez zmniejszenie stężenia analitu poniżej poziomu wykrywalności. Systemy typu LOC umożliwiają prowadzenie reakcji chemicznych w mikroskali, celem wytworzenia niewielkiej ilości produktów, które są wykorzystywane w dalszej procedurze analitycznej lub stanowią wartość samą w sobie (w takim przypadku mamy do czynienia z mikroreaktorem na chipie). W zminiaturyzowanym urządzeniu dyfuzja reagentów oraz transport ciepła przebiega znacznie szybciej ze względu na niewielkie objętości, co powoduje skrócenie czasu reakcji. Dodatkowo procesy w urządzeniach LOC prowadzone są często w specyficznych warunkach przepływowych co umożliwia w pewnym stopniu imitację równowag charakterystycznych dla warunków *in-vitro*. Ta właściwość mikrosystemów jest

wykorzystywana w celu tworzenia modeli komórkowych tkanek lub całych organów na chipie (Organ on a Chip) do badań biologicznych. Miniaturowe chipy mogą zostać zintegrowane z elementami mechanicznymi i elektronicznymi tworząc automatyczne, niezależne i przenośne urządzenia, które są łatwe w użytkowaniu. Zmniejsza to w znacznym stopniu błędy pochodzenia ludzkiego, które są nieuniknione w standardowej pracy laboratoryjnej. Taka koncepcja urządzeń LOC umożliwia często ich wykorzystanie i operowanie nimi przez osoby bez specjalistycznego szkolenia i wieloletniego doświadczenia. Ponadto wiele zminiaturyzowanych systemów jest projektowanych w formie tanich, jednorazowych chipów lub kaset, co ułatwia ich komercjalizację [9].

### 1.1. Podstawy mikrofluidyki

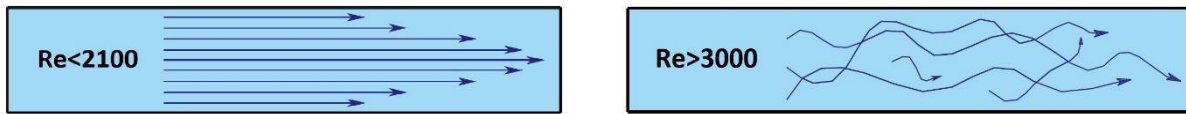
Mikrofluidyka zajmuje się opisem zachowania płynów i ich charakterystycznych właściwości w objętościach rzędu mikrolitrów i mniejszych. Niewielkie ilości płynów charakteryzują się dużym stosunkiem powierzchni do objętości, co wpływa na inny niż w makroskali rozkład sił. Napięcie powierzchniowe oraz lepkość zaczynają odgrywać kluczową rolę, kosztem grawitacji i bezwładności. Jedną z typowych dla mikroskali właściwości jest laminarny charakter przepływu. Charakter przepływu (laminarny lub turbulentny) jest determinowany przez liczbę Reynoldsa, która określa stosunek sił bezwładności do sił lepkości. Definiowana jest ona jako:

$$Re = \frac{\text{siły bezwładności}}{\text{siły lepkości}} = \frac{u \cdot L}{\nu} = \frac{\rho \cdot u \cdot L}{\mu} \quad (1)$$

Gdzie:  $u$  – prędkość przepływu,  $L$  – wymiar charakterystyczny (dla przepływu w rurach i kanałach jest to standardowo wymiar wewnętrznej średnicy),  $\nu$  – lepkość kinematyczna płynu,  $\rho$  – gęstość płynu,  $\mu$  – lepkość dynamiczna płynu.

Zazwyczaj przyjmuje się, że liczba Reynoldsa o wartościach poniżej 2100 oznacza laminarny charakter przepływu, zaś wartości powyżej 3000 wskazują na przepływ turbulentny. W układach mikrofluidycznych, ze względu na niewielkie wymiary kanałów, liczba Reynoldsa jest znacznie poniżej granicznej wartości przepływu laminarnego. W przepływie laminarnym warstwy płynu poruszają się równolegle względem siebie i nie dochodzi między nimi do zakłóceń (schematycznie zostało to zaprezentowane na Rysunku 1). Wykazuje on często paraboliczny profil prędkości, w którym prędkość płynu w centrum kanału jest największa i stopniowo maleje osiągając najmniejszą wartość przy jego ściankach. Powoduje to trudności

w procesie mieszania w mikrosystemach, który jest często wymuszony przez specjalnie w tym celu zaprojektowane struktury w chipie (mikromieszalniki).



Rysunek 1: Schematyczne przedstawienie przepływu laminarnego i turbulentnego.

Istotnym zjawiskiem w urządzeniach mikrofluidycznych jest dyfuzja, która częściowo odpowiada za proces mieszania. Ze względu na niewielkie wymiary struktur, czas dyfuzji w mikrosystemach jest znacząco krótszy niż w makroskali. Warto jednak zaznaczyć, że proces dyfuzji w warunkach przepływu laminarnego jest procesem wielokrotnie wolniejszym niż ma to miejsce w przypadku intensywnej wymiany masy, pędu i energii w warunkach chaotycznego ruchu płynu o stochastycznym charakterze [10]. Podobnie ze względu na niewielkie wymiary oraz przepływ laminarny płynu w mikrosystemach, wymiana ciepła odbywa się głównie przez przewodzenie ciepła, zaś proces konwekcji jest znikomy. Ciecze w mikroskali podlegają również zjawiskom kapilarnym, a więc przepływowi w przestrzeniach o niewielkich wymiarach bez użycia zewnętrznej siły. Ruch ten jest kolejną konsekwencją przeważania sił powierzchniowych, takich jak napięcie powierzchniowe i siły adhezyjne nad objętościowymi. Typowym przykładem jest samoistny pionowy przepływ cieczy w cienkich rurkach, gdzie naocznie można zaobserwować przewagę sił powierzchniowych nad grawitacją. Zjawiska kapilarne bywają wykorzystywane w miniaturowych chipach jako podstawa przepływu cieczy w mikrostrukturach [11].

## 1.2. Wytwarzanie urządzeń typu Lab on a Chip

Od lat 60-tych dwudziestego wieku prężnie rozwijane były technologie wytwarzania półprzewodników, których głównym celem była miniaturyzacja tranzystorów w układach scalonych. Doprowadziło to do powstania mikroukładów elektromechanicznych (MEMS – ang. *microelectromechanical systems*) w latach 80tych. Warto w tym momencie wspomnieć o profesorze Politechniki Warszawskiej Janie Czocharlskim, którego metoda otrzymywania monokryształów krzemu w ogromnym stopniu przyczyniła się do rozwoju układów scalonych, a co za tym idzie rewolucji komputerowej. Technologia wytwarzania mikroukładów elektromechanicznych w krzemie posłużyła później do powstania układów mikrofluidycznych. Pierwszym (1979) urządzeniem typu lab-on-a-chip był zminiaturyzowany chromatograf

gazowy składający się z zaworu do wprowadzania próbki i kolumny kapilarnej, który został wytworzony na podłożu krzemowym [12]. Dalszy i szybki rozwój systemów mikrofluidycznych wiązał się z wprowadzeniem nowych technologii wytwarzania oraz nowych materiałów, w szczególności poli(dimetylosiloksanu) (PDMS) oraz tworzyw termoplastycznych. Wprowadzone zostały terminy takie jak urządzenia typu  $\mu$ TAS, POC oraz Lab on a Chip. Z czasem zakres aplikacji urządzeń mikrofluidycznych rozszerzył się z chemii analitycznej, również na chemię organiczną, genomikę, biologię molekularną, proteomikę i biologię komórkową, diagnostykę medyczną, ochronę środowiska itp. Obecnie technologia Lab on a Chip nie jest już jedynie domeną badań uniwersyteckich, ale stanowi sporą i ciągle rosnącą gałąź przemysłu.

### 1.3. Materiały i technologie obróbki

Pierwszym materiałem, jak już zostało wspomniane, wykorzystywanym do produkcji miniaturowych systemów fluidycznych był krzem. Swoją popularność zawdzięczał dobrze znanym technologiom jego obróbki, wcześniej opracowanym na potrzeby mikroukładów elektromechanicznych. Wiele nowatorskich mikrosystemów zostało wykonanych w krzemie, który do dzisiaj pozostaje istotnym dla mikrofluidyki materiałem konstrukcyjnym [13]. Jego zastosowanie ograniczone jest jednak przez wysoką cenę oraz skomplikowany proces wytwarzania wymagający szczególnie dostosowanych laboratoriów o wysokich standardach czystości (tzw. clean room). Ponadto właściwości fizyczne krzemu takie jak przewodność elektryczna i brak transparentności optycznej ograniczają jego zastosowanie w niektórych typach miniaturowych chipów (np. wymagających wysokiego napięcia elektrycznego lub wykorzystujących detekcję optyczną). Pomimo wspomnianych ograniczeń, krzem jest nadal wykorzystywany w opracowywanych urządzeniach mikrofluidycznych ze względu na rozdzielczość wykonywanych mikrostruktur, która pozostaje nieosiągalna w przypadku innych materiałów.

Szkło jest transparentnym optycznie i względnie obojętnym chemicznie materiałem, który jest często wykorzystywany w konstrukcji układów mikrofluidycznych, jednak podobnie do krzemu wymaga skomplikowanych metod mikroobróbki takich jak fotolitografia, trawienie chemiczne lub reaktywne trawienie jonowe do których niezbędny jest clean room. Istnieje wiele rodzajów szkła, z których najczęściej wykorzystywane jest szkło krzemowe i borokrzemianowe. Szkło często wykorzystywane jest w mikrosystemach hybrydowych, czyli takich, do których konstrukcji użyto więcej niż jednego materiału. Wyjątkowo dobrze sprawdza

się jako podłoże chipów stosowanych do hodowli komórkowych ze względu na biokompatybilność oraz hydrofilowy charakter, który ułatwia adhezję komórek do podłoża [14].

Najczęściej wykorzystywaną grupą materiałów w przemyśle są obecnie materiały polimerowe. Ma to swoje odzwierciedlenie także w urządzeniach LOC. Z jednej strony wynika to z dużej dostępności i różnorodności tych materiałów dzięki czemu można dobrać materiał o praktycznie dowolnych właściwościach chemicznych bądź fizycznych. Z drugiej strony technologie ich wytwarzania i obróbki są bardzo powszechne co przekłada się na ich łatwą dostępność oraz względnie niski koszt tych technologii. Wreszcie ważnym elementem jest także wysoka wydajność technologii wytwarzania mikrouządzeń z materiałów termoplastycznych dzięki czemu urządzenia te nie muszą się już ograniczać tylko do zastosowań naukowych. Najczęściej wykorzystywanymi materiałami polimerowymi w konstrukcji LOC są poli(dimetylosiloksan) (PDMS), poli(metakrylan metylu) (PMMA), poliwęglan (PC), cykliczne kopolimery olefinowe (COC), poli(tereftalan etylenu) (PET) i polilaktyd (PLA). Dwa z nich (PDMS i PMMA) zostały pokrótce opisane, ze względu na ich powszechne zastosowanie w urządzeniach mikrofluidycznych.

Poli(dimetylosiloksan) (PDMS) jest jednym z najczęściej wykorzystywanych materiałów do wytwarzania mikrosystemów w praktyce laboratoryjnej. Swoją popularność zawdzięcza między innymi przez stosunkowo niski koszt oraz nieskomplikowaną technologię obróbki i wytwarzania mikrosystemów. PDMS pozwala na wytworzenie mikrosystemów za pomocą metody odlewu z bardzo wysoką dokładnością odwzorowania struktur, sięgającą dziesiątek nanometrów [15]. Jest on materiałem elastycznym, transparentnym w szerokim zakresie promieniowania elektromagnetycznego, biernym chemicznie, biokompatybilnym i przepuszczalnym dla gazów, co jest pożądaną cechą w przypadku  $O_2$  i  $CO_2$  (jako składniki niezbędne w hodowlach komórkowych i tkankowych), ale także negatywne w przypadku pary wodnej, bo umożliwia jej odparowanie z wnętrza mikrokanałów i mikrostruktur przez co może doprowadzić do zbyt dużego wzrostu stężenia szkodliwych metabolitów lub ogólnej zmiany stężenia analitów w przypadku procesu analitycznego. Właściwości te sprawiają, że jest on często wykorzystywany w tworzeniu chipów do hodowli komórkowych. Struktury wykonane w PDMS można trwale łączyć ze sobą lub ze szkłem, tworząc układy hybrydowe, poprzez aktywację jego powierzchni za pomocą plazmy tlenowej. Materiał ten jest często wykorzystywany do prototypowania urządzeń mikrofluidycznych, jednak nie jest odpowiedni do wykorzystania w wielkoskalowej produkcji.

Poli(metakrylan metylu) (PMMA) jest polimerem termoplastycznym, który podobnie jak PDMS znalazł szerokie zastosowanie w wytwarzaniu urządzeń typu LOC. PMMA jest transparentny w szerokim zakresie promieniowania elektromagnetycznego, biokompatybilny, wykazuje niską autofluorescencję i można poddawać go sterylizacji. Charakteryzuje się wysoką temperaturą zeszklenia, co pozwala na wykorzystanie go w mikrosystemach z podwyższoną temperaturą. Wykonanie mikrostruktur w PMMA odbywa się poprzez obróbkę mechaniczną taką jak mikrofrezowanie, grawerowanie laserowe, formowanie wtryskowe lub *hot embosing*.

Do wytwarzania mikrosystemów wykorzystuje się niezwykle szeroką gamę materiałów. Poza wymienionymi wcześniej, stosuje się również żywice epoksydowe, hydrożele, a nawet papier [16] (LOP – ang. *Lab-on-Paper*). Dobór materiału konstrukcyjnego o optymalnych właściwościach fizykochemicznych dla mikrosystemu o danym przeznaczeniu jest kluczowym elementem etapu projektowania. Najczęściej wykorzystywane materiały do konstrukcji urządzeń typu LOC z uwzględnieniem polimerów, ich wybrane właściwości oraz metody obróbki zostały zebrane w Tabeli 1.

Tabela 1: Zestawienie materiałów konstrukcyjnych mikrosystemów, ich wybranych właściwości oraz technologii obróbki.

<b>Materiały konstrukcyjne do wytwarzania mikrosystemów - polimerowe</b>					
Nazwa	Temperatura zeszklenia [°C]	Transmitancja w zakresie widzialnym [%]	Biokompatybilność	Przepuszczalność gazów	Technologia mikroobróbki
PDMS	-125 – -122	91	b. dobra	średnia	Odlewanie („miękką litografią”)
PMMA	100 – 122	92	b. dobra	niska	tłoczenie na gorąco, ablacja laserowa, frezowanie
PC	140 – 148	89	b. dobra	wysoka	tłoczenie na gorąco, ablacja laserowa, frezowanie
PS	92 – 106	90	b. dobra	b. wysoka	tłoczenie na gorąco, ablacja laserowa, frezowanie
COC	90 – 180	94	b. dobra	średnia	tłoczenie na gorąco, ablacja laserowa, frezowanie
<b>Materiały konstrukcyjne do wytwarzania mikrosystemów - niepolimerowe</b>					
Nazwa	Transmitancja w zakresie widzialnym	Biokompatybilność	Przepuszczalność gazów	Najczęściej stosowane rodzaje materiału	Technologia mikroobróbki
Krzem	b. niska	b. dobra	niska	Monokryształ krzemu	Fotolitografia, reaktywne trawienie jonowe
Szkło	wysoka	b. dobra	niska	Borokrzemianowe, sodowe, kwarcowe	Fotolitografia, trawienie chemiczne, reaktywne trawienie jonowe
Papier	niska	dobra [16]	średnia	Bibuła filtracyjna, papier chromatograficzny, nitrocelulozowy	Fotolitografia, drukowanie (często drukowanie woskiem)

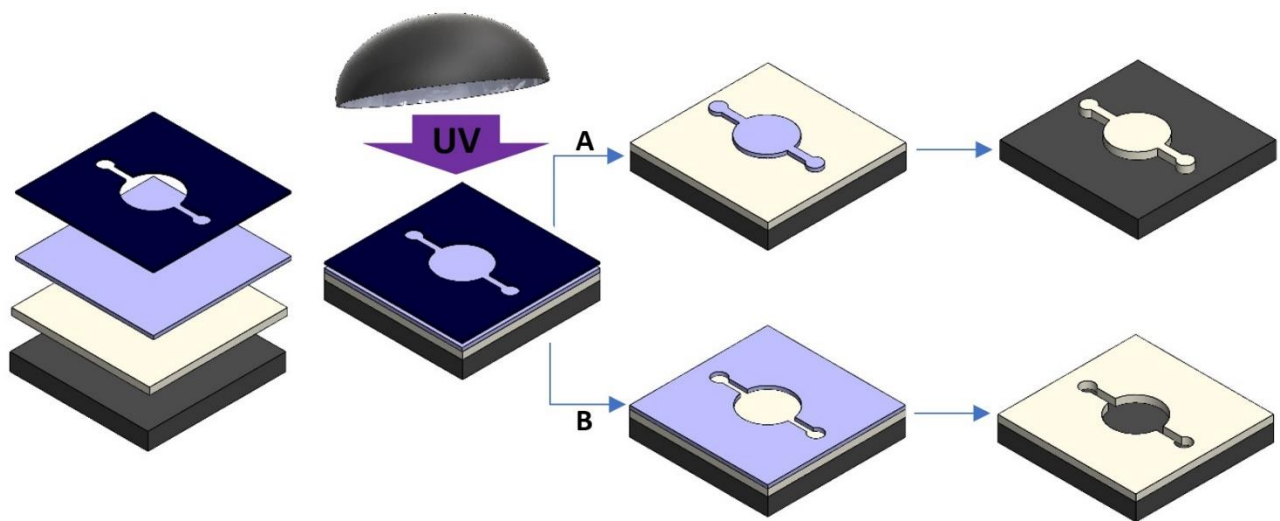


## Fotolitografia

Fotolitografia jest procesem polegającym na odwzorowaniu mikrostruktur na powierzchni substratu za pośrednictwem promieniowania elektromagnetycznego (najczęściej z zakresu UV) z zastosowaniem odpowiednich fotoczułych materiałów. Fotolitografia występuje w wielu wariantach, ale najczęściej można ją podzielić ze względu na zastosowany substrat oraz typ materiału fotoczułego (fotorezystu). Na rynku dostępnych jest wiele różnych fotorezystów, które różnią się między sobą właściwościami chemicznymi oraz fizycznymi. Najczęściej fotorezysty mają postać ciekłą. W takiej postaci fotorezysty rozprowadza się na powierzchni substratu przy pomocy rozwirowywania (ang. *spin coating*). Dodatkowo takie fotorezysty występują w różnych wariantach lepkości dzięki czemu przez dobór odpowiednich parametrów procesu rozwirowywania można uzyskać warstwy o różnych, precyzyjnie ustalonych grubościach. Najczęściej spotykanym fotorezystem w takim wariantcie jest SU-8. Oprócz tego typu występują także fotorezysty w stanie stałym przy czym najczęściej są one fabrycznie umieszczone na odpowiednim substracie. W tym przypadku również są dostępne różne warianty grubości fotorezystów, jednak ich zasób jest bardzo ograniczony (w odróżnieniu od SU-8, w którym można wytworzyć warstwy o praktycznie dowolnej grubości). Przykładem fotorezystu w formie stałej jest film kapilarny. Dodatkowo występują także fotorezysty w formie spreju, ułatwiające ich nanoszenie na powierzchnię substratu. Bez względu na stan skupienia fotorezysty dzielimy na dwa rodzaje: pozytywowe, które stają się rozpuszczalne w wywoływaczu w wyniku ekspozycji na promieniowanie elektromagnetyczne oraz negatywowe, które w wyniku działania promieniowania elektromagnetycznego zostają utrwalone. Dodatkowo fotorezysty można podzielić ze względu na zastosowany substrat. W tym przypadku fotorezyst może być substancją zabezpieczającą docelowy substrat (np. krzem lub szkło) w procesie trawienia lub sam fotorezyst może być substratem.

Proces fotolitografii wymaga zastosowania fotomaski, która zawiera dwuwymiarową architekturę mikrostruktury przy czym w zależności od zastosowanego fotorezystu (pozytywowy lub negatywowy) architektura tych mikrostruktur może być przepuszczalna dla promieniowania lub je blokować. Po procesie naświetlania fotorezystu następuje jego wywoływanie. Jest to proces, w wyniku którego zostaje usunięta warstwa fotorezystu, która nie została utrwalona w wyniku naświetlania. Wywoływanie wykonuje się najczęściej w roztworach dedykowanych do konkretnego fotorezystu. Wykonane w ten sposób mikrostruktury mogą być docelowym elementem mikroukładu LoC. Ale może być także formą/pieczątką będącą negatywowym odbiciem docelowego elementu. W takim przypadku

stosowana jest mieszanina monomeru i czynnika sieciującego, które są wylewane do formy i po usieciowaniu i oddzieleniu od formy zostaje uzyskany docelowy element mikrouządzenia LoC. Wreszcie fotorezyst może stanowić warstwę zabezpieczającą w procesie trawienia substratu (np. szkła lub krzemu) gdzie części nie pokryte fotorezystem, w wyniku chemicznego oddziaływania czynnika trawiącego zostają usunięte. Przy czym im dłuży czas oddziaływania tym grubsza warstwa zostaje usunięta. Po procesie trawienia fotorezyst zostaje usunięty z powierzchni substratu. Schemat procesu fotolitograficznego został zaprezentowany na Rysunku 2.



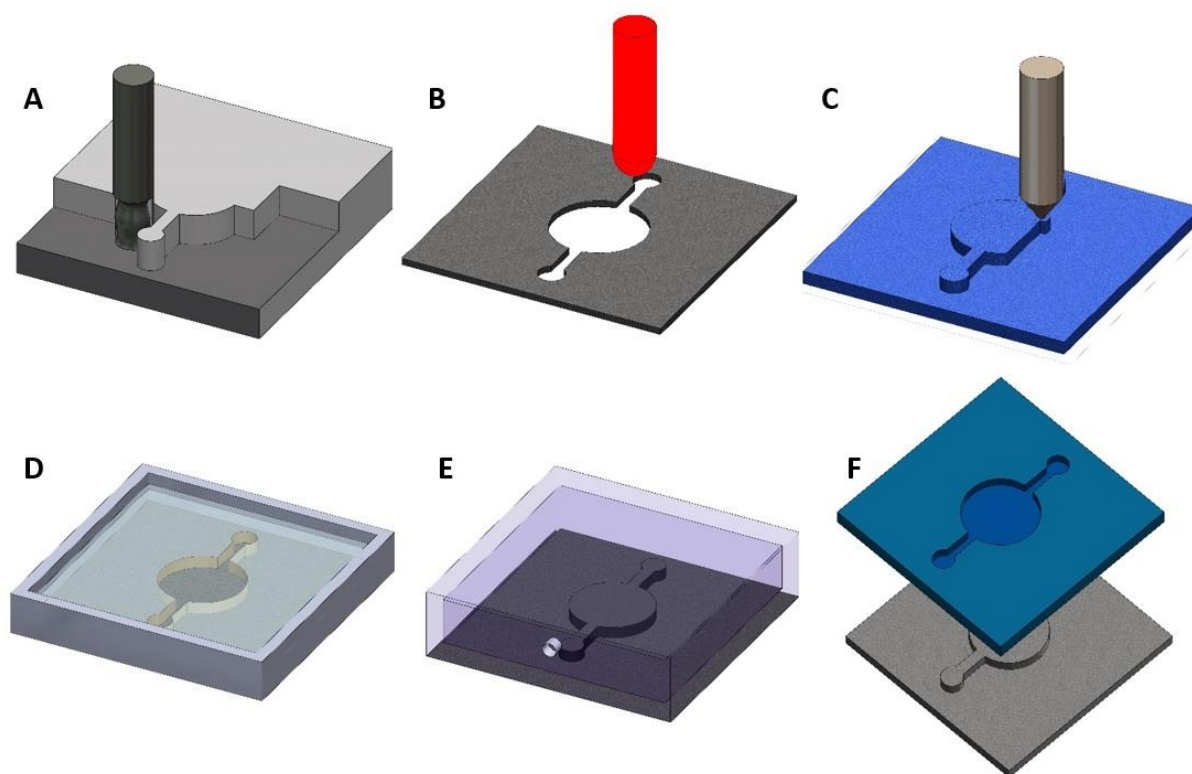
Rysunek 2: Schemat procesu fotolitografii z wykorzystaniem fotorezystu negatywnego (A) oraz pozytywnego (B).

### *Metoda odlewu*

Wytwarzanie mikrostruktur za pomocą odlewu jest powszechnie wykorzystywaną metodą mikroobróbki elastomerów takich jak PDMS. Jest to technika replikacyjna wymagająca zastosowania wcześniej wytworzonej matrycy (nazywanej też pieczętką) o określonym wzorze, który ma być powielony w mikrosystemie. Często wykorzystywaną techniką wytwarzania mikrosystemów w skali laboratoryjnej jest tzw. miękka fotolitografia (ang. *soft lithography*), która pozwala rozszerzyć zastosowanie standardowej fotolitografii o nowe materiały. W technice tej jako materiały konstrukcyjne stosowane są elastomery, w których wykonywane są mikrostruktury. Najczęściej wykorzystywane są tworzywa polimerowe o właściwościach elastycznych takie jak PDMS, różnego rodzaju gumy, a także żele. Pieczętka wykonywane są zazwyczaj z materiałów polimerowych, metali albo fotorezystu, przy zastosowaniu odpowiednich dla nich technik wytwarzania. Precyzja wykonania matrycy jest niezwykle istotna, gdyż ewentualne błędy będą powielane w mikrostrukturach. Materiałem, który

rozpoczął nową erę w dziedzinie LOC jest PDMS. Spowodowane to jest łatwą techniką jego obróbki oraz specyficznymi właściwościami, które zostały opisane wcześniej.

Wytworzenie mikroukładów z PDMS rozpoczyna się od przygotowania prepolimeru poprzez zmieszanie prekursora z odczynnikiem sieciującym. Następnie należy poddać go odgazowaniu, aby na etapie utwardzania nie wytworzyły się bąble w objętości polimeru. PDMS jest następnie wylewany do formy z matrycą i pozostawiany w podwyższonej temperaturze, zazwyczaj 60-80°C przez 1-4 h, do uzyskania elastomeru w stanie stałym (Rysunek 3-D). Po oddzieleniu polimeru od pieczętki otrzymuje się mikrosystem z półotwartymi strukturami, który łączy się najczęściej ze szkłem lub warstwą innego polimeru. PDMS charakteryzuje się wyjątkowo dokładnym odwzorowaniem matrycy sięgającym kilkudziesięciu nanometrów, dlatego nawet najmniejsze wady w strukturze, takie jak ślad po frezie lub resztki fotorezystu na matrycy, będą widoczne w mikrosystemie przy odpowiednim powiększeniu.



Rysunek 3: Zestawienie najczęściej wykorzystywanych technik wytwarzania mikrostruktur. Techniki mechaniczne: A - frezowanie, B - ablacja laserowa, C - druk 3D. Techniki replikacyjne: D - odlew, E - formowanie wtryskowe, F - odciskanie

### *Mikrofrezowanie*

Frezowanie jest techniką mechanicznej obróbki materiałów takich jak metale lub tworzywa sztuczne poprzez usuwanie warstw materiału za pomocą frezu, który obraca się w

osi wrzeczona (Rysunek 3-A). Mikrofrezowanie odnosi się do rozmiarów wykorzystywanych frezów, których średnica może osiągać wymiary nawet kilku  $\mu\text{m}$ . Minimalne wymiary bezpośrednio wykonywanych wklęsłych mikrostruktur w płaszczyźnie poziomej są bezpośrednio ograniczone przez średnicę używanego frezu, zaś w płaszczyźnie pionowej zależą od rozdzielczości frezarki. W przypadku wykonywania wypukłych mikrostruktur takie ograniczenie nie ma zastosowania. Do wytwarzania mikrostruktur wykorzystuje się urządzenia CNC (ang. *computer numerical control*), które są sterowane za pomocą odpowiedniego kodu maszynowego. Jest wiele języków maszynowych, z czego jednym z najpopularniejszych jest G Kod, który zawiera zestaw prostych komend zrozumiałych dla oprogramowania konkretnego urządzenia. Istnieją także różne standardy programowania takich urządzeń. Prostsze urządzenia wymagają ręcznego wprowadzenia całego kodu do urządzenia. Jednak obecnie najczęściej używa się do tego celu odpowiednie oprogramowanie CAD/CAM, w których w module CAD projektowany jest element do wykonania natomiast moduł CAM służy do automatycznego wygenerowania kodu maszynowego na podstawie modelu 3D. Umożliwia to łatwą modyfikację struktur, dlatego technika ta jest z powodzeniem wykorzystywana na etapie prototypowania. Mikrofrezowanie może zostać użyte do wytworzenia struktur w twardych polimerach takich jak termoplasty (PMMA, PC, POC), zaś nie nadaje się do obróbki miękkich materiałów takich jak elastomery (PDMS).

Technikę tę stosuje się do wytwarzania zarówno całych mikrosystemów, ich poszczególnych elementów, jak i do produkcji matryc używanych jako pieczętki w metodach replikacyjnych. Niewątpliwą zaletą mikrofrezowania jest możliwość wykonania trójwymiarowych struktur w trakcie trwania jednego programu maszyny, należy jednak pamiętać, że szerokość jest ograniczona przez średnicę frezu. Mikrofrezowanie jest techniką często wykorzystywaną na etapie prototypowania, jednak zazwyczaj niedostatecznie wydajną dla wielkoskalowej produkcji.

### *Ablacja laserowa*

Ablacja laserowa jest technologią mikroobróbki za pomocą silnej wiązki laserowej. Polega ona na dostarczeniu znacznej ilości energii w postaci promieniowania, tak aby usunąć pożądaną fragment polimeru poprzez odparowanie (Rysunek 3-B). W tym celu można wykorzystać źródła światła z zakresu od ultrafioletu do podczerwieni, w zależności od obrabianego materiału. Lasery UV są zazwyczaj wykorzystywane do przezroczystych materiałów, podczas gdy do obróbki polimerów, które absorbują konkretną długość promieniowania stosowane są lasery z zakresu IR. Jednym z najczęściej wykorzystywanych są

lasery CO<sub>2</sub>, które działają w zakresie podczerwieni. Do mikroobróbki laserowej, podobnie jak w przypadku mikrofrezowania, wykorzystywane są maszyny CNC, których zalety zostały już pokrótce przedstawione. Parametry pracy lasera, takie jak jego moc, częstotliwość pulsów, czas ich trwania, prędkość posuwu, dokładna długość fali, muszą zostać zoptymalizowane, aby uzyskać odpowiednią jakość wykonanych mikrostruktur. Duża ilość energii dostarczana do materiału może powodować nadtopienia lub innego rodzaju nierówności krawędzi elementów usuniętych przez laser. Ponadto otrzymanie prostopadłych ścian jest utrudniona przez profil intensywności wiązki lasera przyjmujący rozkład normalny. Mimo pewnych trudności, mikroobróbka za pomocą lasera jest przydatną techniką w szczególności przy wytwarzaniu elementów mikrosystemów w cienkich warstwach polimerów [17]

### *Druk 3D*

Druk 3D zyskał w ostatnich latach popularność poprzez stosunkowo niewielką cenę podstawowego urządzenia oraz uniwersalność zastosowań, stając się dostępny dla indywidualnego użytkownika. Jest on również wykorzystywany w tworzeniu urządzeń typu LOC, a w szczególności w ich prototypowaniu. W przeciwieństwie do mikrofrezowania i ablacji laserowej, druk 3D nie polega na usuwaniu naddatków materiału, ale na tworzeniu określonych struktur poprzez nakładanie kolejnych warstw polimeru (Rysunek 3-C). Najczęściej wykorzystywaną metodą w druku 3D jest stereolitografia (SLA) polegająca na utwardzaniu, najczęściej za pomocą promieniowania ultrafioletowego, kolejnych porcji nanoszonego materiału [18]. Niewątpliwą zaletą tej technologii jest możliwość trwałego połączenia kilku materiałów ze sobą. Ponadto wytwarzanie mikrosystemu od podstaw pozwala na tworzenie skomplikowanych trójwymiarowych struktur, których konstrukcja za pomocą innej technologii wymagałaby wieloetapowego procesu. Pomimo wielu zalet, druk 3D jest stosowany jedynie do prototypowania urządzeń LOC, gdyż rozdzielczość tej technologii nie pozwala na wytworzenie dobrej jakości miniaturowych struktur.

### *Formowanie wtryskowe*

Technologia formowania wtryskowego (ang. *injection molding*) jest niezwykle popularna w wielkoskalowej produkcji różnego rodzaju urządzeń oraz elementów z tworzyw sztucznych. Podobnie jak technikę odlewu, można zaliczyć ją do metod replikacyjnych. Polega ona na upłynnieniu tworzywa termoplastycznego, poprzez działanie ciśnienia i temperatury, które jest następnie wtryskiwane do specjalnie przygotowanej formy. Dochodzi tam do ochłodzenia wypełniającego ją tworzywa poniżej temperatury zeszklenia, które została się

odwzorowując kształt formy (Rysunek 3-E). Tak wykonany element jest następnie usuwany z maszyny a następnie oczyszczany z nadmiarowych resztek zastygniętego tworzywa. Jakość wykonanego materiału zależy przede wszystkim od jakości i dokładności wykonania formy wtryskowej. Dlatego formy takie mogą kosztować nawet kilkadziesiąt tysięcy złotych, jednak za pomocą jednej formy można wykonać tysiące kopii elementu. Na jakość oraz wydajność procesu formowania wtryskowego wpływają takie parametry jak temperatura ekstrudera, ciśnienie wtrysku, prędkość wtrysku oraz czas chłodzenia. Parametry te są dobierane przede wszystkim pod konkretny materiał termoplastyczny, ale także pod wymiary oraz rodzaj elementu, który będzie wykonywany. Formowanie wtryskowe pozwala na szybkie wytwarzanie elementów z tworzyw sztucznych, których koszt ze względu na efekt skali jest również zredukowany. Ze względu na skomplikowany proces oraz wysoki koszt wytworzenia formy, technologia ta nie jest wykorzystywana na etapie prototypowania. Używana forma powinna być wykonana z najwyższą dokładnością, stosując trwałe materiały, gdyż jakiegokolwiek jej defekty zostaną powielone w wytwarzanych elementach.

#### *Tłoczenie na gorąco*

Tłoczenie na gorąco (częściej spotykane jest określenie w języku ang. *hot embossing*) jest techniką obróbki materiałów umożliwiającą uzyskanie powtarzalnych mikrostruktur w krótkim czasie. Polega ona na wytworzeniu w wybranym materiale struktury poprzez odcisnięcie jej za pomocą rozgrzanego stempla (pieczętki). W tej technice materiał poddawany obróbce umieszczany jest pomiędzy stemplem i podłożem lub pomiędzy dwoma stemplami, które poprzez zastosowanie odpowiedniego ciśnienia i temperatury pozwalają na wykonanie negatywnego (wklęsłego) wzoru na powierzchni materiału. Najczęściej w tej technice wykorzystuje się polimerowe materiały termoplastyczne takie jak PMMA, PC i PET. Najważniejszymi parametrami w procesie obróbki poprzez wytłaczanie na gorąco są siła nacisku stempli na materiał, temperatura stempli oraz czas trwania procesu.

Tłoczenie na gorąco pozwala na precyzyjne, powtarzalne oraz szybkie wytwarzanie struktur w wielu materiałach. Ta technika obróbki znalazła zastosowanie między innymi w wytwarzaniu układów typu MEMS, a także układów mikrofluidycznych. Jest to jedna z technik, które mogą zostać z powodzeniem wykorzystane do przemysłowej produkcji mikrosystemów, jednak ze względu na drogą aparaturę oraz wysokie koszty wytworzenia stempli, nie jest ona często spotykana w laboratoriach badawczych oraz na etapach prototypowania.

## 1.4. Elementy mikrosystemu

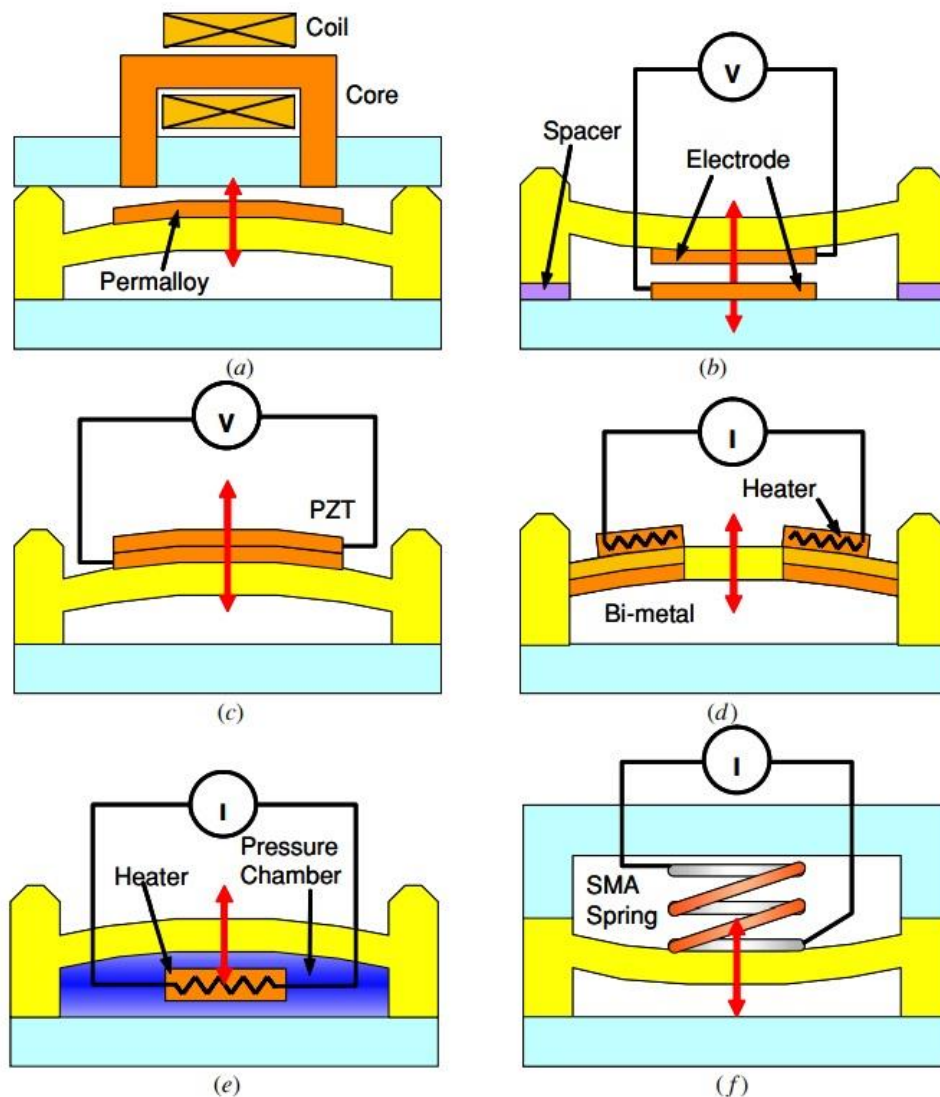
### *Mikrokanaly*

Podstawowym elementem, obecnym w większości mikroukładów są mikrokanaly. Ich główną funkcją jest zapewnienie obszaru przepływu po wyznaczonej ścieżce oraz połączenie kluczowych struktur urządzenia typu LOC. Przyjmuje się, że mikrokanal jest barierą dla płynu, w którym dochodzić w nim może do przepływu, a jego szerokość wynosi poniżej 1 mm. Najczęściej spotykane szerokości mikrokanalów są dużo niższe i wynoszą kilka bądź kilkadziesiąt  $\mu\text{m}$ , a głównym ograniczeniem w procesie ich miniaturyzacji są technologie obróbki materiałów. Kształt przekroju mikrokanalu nie jest ściśle zdefiniowany i może przyjmować różne formy. Najpopularniejszymi typami mikrokanalów są te o prostokątnym przekroju poprzecznym, prostokątnym z obłymi kątami, półkolistym (są one często spotykane ze względu na łatwy sposób ich wykonania, co wynika z technologii ich wytwarzania) oraz kolistym. Poza główną funkcją transportową mikrokanaly są wykorzystywane jako elementy wspomagające mieszanie, wymianę ciepła, a nawet jako środowisko do prowadzenia reakcji.

### *Mikrozawory i mikropompy*

Przepływ w LOC może być wywoływany na wiele sposobów. Siłą napędową może być różnica ciśnień na wlocie i wylocie mikrosystemu lub siły kapilarne (np. w *Lab-on-Paper*). Aby zapewnić kontrolowany przepływ wykorzystuje się zazwyczaj zewnętrzne urządzenia. W praktyce laboratoryjnej najczęściej spotykane są pompy strzykawkowe i perystaltyczne, jednak ich wymiary przekraczają wielokrotnie rozmiar mikrosystemów. Ideą urządzeń typu  $\mu\text{TAS}$  i POC jest prosta obsługa, niewielkie rozmiary, automatyzacja, a często także integracja, dlatego konieczne jest opracowywanie zminiaturyzowanych zaworów i pomp będących integralną częścią tych systemów. Przedstawiony zostanie podział oraz opis najczęściej spotykanych mikrozaworów. W wielu przypadkach budowa mikropomp jest bardzo podobna do budowy mikrozaworów. Także podział mikropomp i mikrozaworów jest bardzo podobny dlatego oba te typy mikrouządzeń zostaną przedstawione w jednym rozdziale. Mikrozawory można podzielić na dwie podstawowe grupy: aktywne oraz pasywne, w zależności od tego czy potrzebują dostarczenia energii zewnętrznej do poprawnego działania, a wśród nich wyróżnia się podgrupy zaworów mechanicznych i niemechanicznych [19].

W podgrupie zminiaturyzowanych pasywnych zaworów mechanicznych najczęściej spotykane są zawory zwrotne. Ich głównym celem jest zapewnienie przepływu tylko w jednym kierunku. Zazwyczaj zawory te pozostają zamknięte aż do przekroczenia tzw. ciśnienia otwarcia. Kluczowym elementem tego typu zaworów jest miniaturowy element w postaci klapki, korka lub kulki spełniający funkcję zatyczki [20]. W przypadku przepływu w niepożądanym kierunku, ruchomy element blokuje kanał doprowadzający płyn. Zawory zwrotne stosowane są często jako dodatek do mikropomp, aby zwiększyć ich wydajność. Pasywne mikrozawory niemechaniczne nie posiadają ruchomego elementu, a swoje działanie opierają na specyficznej geometrii lub właściwościach. Przykładem jest zminiaturyzowany zawór Tesli, który poprzez charakterystyczny kształt kanałów umożliwia preferencyjny przepływ cieczy w jednym kierunku [21]. Do tej podgrupy należą również elementy blokujące



Rysunek 4: Zestawienie zminiaturyzowanych aktywnych zaworów mechanicznych: (a) elektromagnetyczny b) elektrostatyczny, (c) piezoelektryczny, d) bimetaliczny, (e) termopneumatyczne, (f) ze stopem z pamięcią kształtu. Źródło ilustracji [19].



przepływ ze względu na swoje powinowactwo do roztworu. Takie mikrozawory składają się np. z hydrofobowego fragmentu kanału, którym przepływa wodny roztwór, stanowiąc naturalną barierę dla sił kapilarnych.

Aktywne mikrozawory mechaniczne wymagają dostarczenia dodatkowej energii określonego rodzaju oraz posiadają w swojej konstrukcji ruchomy element, którym zazwyczaj jest membrana. Połączenie kilku zaworów tego typu prowadzi do powstania mikropompy. Jej działanie opiera się na ruchu membrany powodującej naprzemienną zmianę objętości komory. Skutkiem tego jest wywołanie podciśnienia zaopatrującego komorę w dodatkową ciecz, a następnie nadciśnienia i jego wypompowanie. Mikrozawory można podzielić ze względu na rodzaj siły, która prowadzi do aktywacji membrany, co zostało przedstawione na Rysunek 4. Mikrozawory piezoelektryczne opierają się na zdolności niektórych kryształów do zmiany swoich wymiarów pod wpływem przyłożonego napięcia (odwrotne zjawisko piezoelektryczne). Materiał wykazujący zdolności piezoelektryczne stykający się z membraną jest w stanie ją odkształcić, umożliwiając lub blokując przepływ [22]. Mechanizm ten został wykorzystany w zminiaturyzowanych, komercyjnie dostępnych urządzeniach [23]. Mikrozawory elektrostatyczne opierają się na wzajemnym przyciąganiu naładowanych różnoimiennie elektrod, z których przynajmniej jedna jest połączona z elastyczną membraną. Wykorzystanie tego typu zaworów często ogranicza się do regulacji przepływu gazów, gdyż ze względu na stosunkowo wysokie napięcie może dochodzić do elektrolizy cieczy. W przypadku zaworów magnetycznych, elastyczna membrana może zostać zastąpiona przez materiał paramagnetyczny. Kształt tego elementu bywa projektowany podobnie do miniaturowych kłapek w pasywnych mikrozaworach mechanicznych [24]. Kolejną podgrupą są mikrozawory termiczne, których działanie uzależnione jest od temperatury. W przypadku mikrozaworów bimetalicznych, membrana wykonana jest z dwóch warstw metali charakteryzujących się różnymi współczynnikami rozszerzalności cieplnej. Pod wpływem temperatury bimetale wygina się (poprzez większe rozszerzenie jednej z warstw) blokując przepływ [25]. Podobnie działają mikrozawory wykorzystujące w swojej konstrukcji stopy z pamięcią kształtu [26]. W konstrukcji mikrozaworów termopneumatycznych wyróżnia się często dodatkową komorę będącą w bezpośrednim kontakcie z membraną. Jest ona wypełniona gazem, który pod wpływem przy podwyższonej temperaturze zwiększa swoją objętość prowadząc do odkształcenia ruchomego elementu.

Aktywne mikrozawory niemechaniczne pozbawione są ruchomego elementu w postaci membrany lub klapki, która odpowiadałaby za zamknięcie kanału. Wykorzystują one materiały, które zmieniają swoje pewne właściwości pod wpływem określonego impulsu. Przykładem

mogą być hydrożele, czyli trójwymiarowe sieci polimerowe, które są wypełnione wodą. Masa samego polimeru często stanowi jedynie ułamek masy wody w strukturze hydrożelu. Specyficzną właściwością termoczułych hydrożeli jest uwalnianie wody z sieci polimerowej (zapadnięcie hydrożeli) po przekroczeniu tzw. temperatury objętościowego przejścia fazowego. Mikroawory hydrożelowe działają poprzez regulację temperatury, a co za tym idzie objętość sieci polimerowej, która blokuje lub umożliwia przepływ w mikrosystemie [27].

Ferrofluidy są cieczami o właściwościach paramagnetycznych, które znalazły zastosowanie w LOC jako element mikrozaworów i mikropomp. Pod wpływem zewnętrznego pola magnetycznego, ferrofluid w postaci cieczy niemieszającej się z medium mikroukładu (zazwyczaj jest to oleisty ferrofluid w zewnętrznym środowisku wodnym) porusza się w mikrokanalach tworząc pompę tłokową wywołującą przepływ lub stanowi zawór w postaci bariery blokującej określone ścieżki przepływu [28].

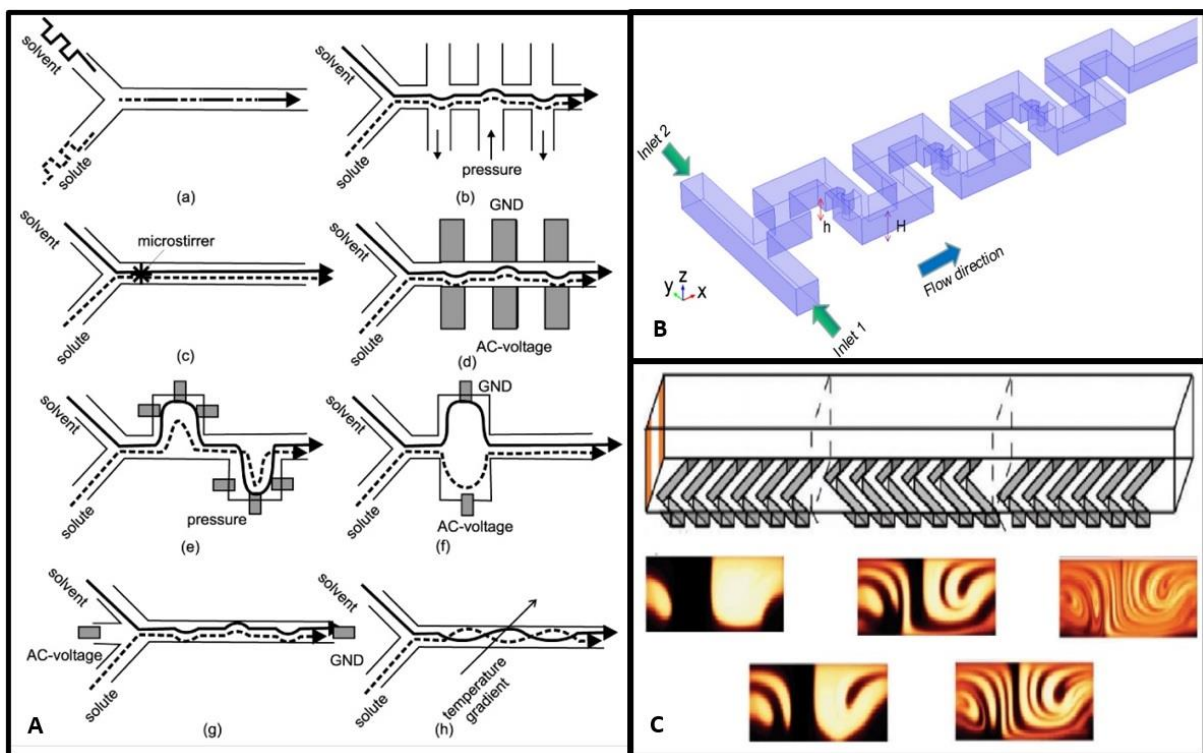
Przepływ w mikrosystemach może być wywołany poprzez oddziaływanie cieczy, bądź jej niektórych składników, z zewnętrznym polem elektromagnetycznym. Pompy magneto-hydrodynamiczne opierają się na ruchu cząstek obdarzonych ładunkiem elektrycznym pod wpływem siły Lorentza w polu elektromagnetycznym [29]. Mikropompy elektrokinetyczne wykorzystują zjawiska takie jak elektroforeza i elektroosmoza do wywołania ruchu cząsteczek pod wpływem przyłożonego napięcia [30].

Ciekawym, a zarazem trudnym do zakwalifikowania rodzajem mikropomp są zminiaturyzowane urządzenia elektrochemiczne wywołujące przepływ. Ich działanie polega na zastosowaniu napięcia, które powoduje elektrolizę roztworu w mikrosystemie prowadząc do powstania gazu na elektrodach. Pojawienie się pęcherzyków gazu, a co za tym idzie wzrost ciśnienia, jest siłą napędową przepływu. Mikropompy elektrochemiczne nazywane są czasami „bąbelkowymi” [31].

### *Mikromieszalniki*

Jak już zostało wspomniane, ze względu na niewielkie wymiary struktur i duży wpływ sił powierzchniowych, w urządzeniach LOC typowy przepływ w mikrokanalach ma charakter laminarny. Powoduje to uporządkowany ruch płynu, w którym mieszanie składników jest ograniczone i odbywa się głównie poprzez zjawisko dyfuzji. Aby zwiększyć efektywność mieszania stosuje się specjalnie w tym celu zaprojektowane elementy nazywane mikromieszalnikami. Można podzielić je na dwie grupy: aktywne i pasywne, w zależności od tego czy wymagają zewnętrznego dostarczenia energii. Szczególnie często w urządzeniach LOC wykorzystywane są mikromieszalniki pasywne, których specyficzna geometria i

połączenia mikrokanalów odpowiadają za zaburzenia przepływu. Połączenia typu T lub Y, których nazwa pochodzi od kształtu mikrokanalów łączących dwa strumienie płynu w jeden, są często niewystarczające, aby uzyskać odpowiednie wymieszanie. Główną strategią zapewnienia mieszania jest zwiększenie powierzchni oraz czasu kontaktu między strumieniami. W tym celu projektowane są mikrokanaly o specyficznym serpentynowym lub zygzakowatym kształcie (Rysunek 5-B) [32], które mogą przyjmować również struktury trójwymiarowe powodujące wielokrotną zmianę kierunku przepływu strumieni. Innym przykładem zastosowania geometrii w celu mieszania są spiralne mikrokanaly, w których do mieszania się strumieni płynów wykorzystywana jest dodatkowo siła odśrodkowa [33]. Aby uzyskać homogeniczny skład mieszaniny, wykorzystywane są również różnego rodzaju bariery, przeszkody lub zagłębienia w dnie mikrokanalu powodujące zwiększenie powierzchni kontaktu między strumieniami (Rysunek 5-C) [34]. Niewątpliwą zaletą mikromieszalników pasywnych jest ich prostota. Mogą one stanowić integralną część mikrosystemu, zastępując np. fragment mikrokanalu i być wytworzone razem z nim podczas tego samego procesu..



Rysunek 5: A – zestawienie mikromieszalników aktywnych: (a) pulsacyjny, (b) ciśnieniowy, (c) z mikromieszadłem, (d) elektrohydrodynamiczny, (e) elektroforetyczny, (f) elektrokinetyczny z komorą mieszalnikową, (g) elektrokinetyczny w kanale, (h) temperaturowy. Źródło ilustracji: [34, 37]

Mikromieszalniki aktywne stanowią rzadziej wykorzystywaną grupę ze względu na konieczność dostarczenia zewnętrznej energii, co dodatkowo komplikuje układ. Można wyróżnić wiele podgrup aktywnych mikromieszalników, ze względu na wykorzystywaną przez

nich siłę lub właściwość płynu. Jednym ze sposobów ujednoczenia składu mieszaniny jest pulsacyjna zmiana wartości przepływu jednego lub dwóch stykających się strumieni prowadzi do powstania zaburzeń w głównym kanale [35]. Mikromieszalniki magneto-hydrodynamiczne wykorzystują w swoim działaniu parę elektrod, magnesy oraz ciecz wykazującą wysoką przewodność, której ruch wywołany jest poprzez siłę Lorentza [36]. Inne typy mikromieszalników opierają się na wykorzystaniu siły elektrokinetycznej, dielektroforetycznej, aktywacji poprzez ultradźwięki lub temperaturę (Rysunek 5-A) [37].

### 1.5. Mikrofluidyczne urządzenia PCR

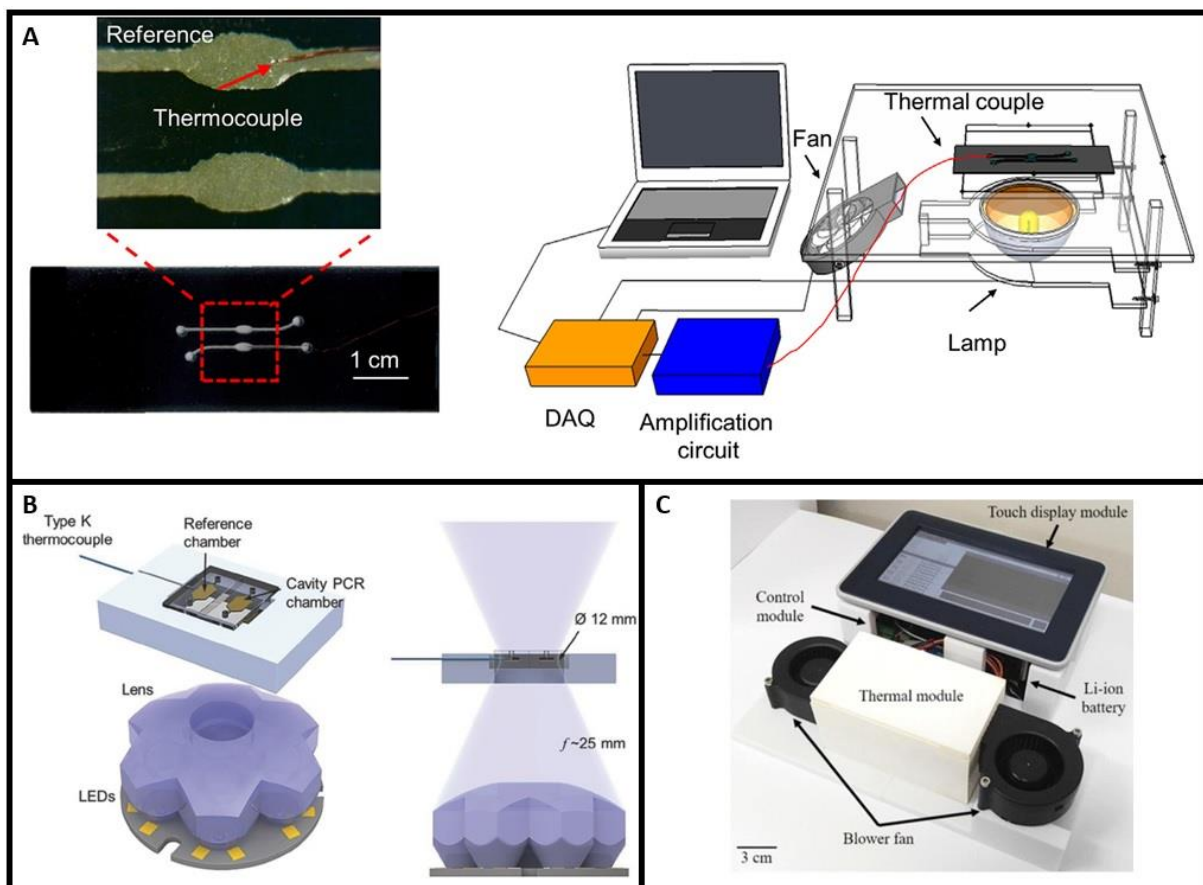
Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR – ang. *polymerase chain reaction*) została opracowana w 1983 roku i od tego czasu zrewolucjonizowała wiele dziedzin nauki. Piętnaście lat później został przedstawiony pierwszy mikroukład typu LOC służący do szybkiej amplifikacji DNA. Na przestrzeni ostatnich lat zostało opracowanych wiele mikrosystemów PCR wykorzystujących różnorodne materiały, technologie wytwarzania oraz same koncepcje prowadzenia reakcji. Obecnie istnieją komercyjnie dostępne przenośne urządzenia służące do przeprowadzenia PCR. Mikrosytemy te zostały opracowane jako alternatywa dla standardowej procedury amplifikacji DNA, która odbywa się w termocyklerach. Termocyklery są urządzeniami laboratoryjnymi wykorzystywanymi do przeprowadzania reakcji PCR w warunkach kontrolowanych. Mieszanina reakcyjna umieszczana jest w probówkach Eppendorfa o niewielkich objętościach (zazwyczaj kilkaset  $\mu\text{L}$ ), a następnie w odpowiednim miejscu wewnątrz urządzenia. Termocykler zapewnia precyzyjne kontrolowanie temperatury reakcji poprzez system grzałek. Obecnie używane modele pozwalają dobrać temperaturę poszczególnych etapów cyklu reakcyjnego, długość tych etapów oraz liczbę cykli. Termocykler jest jednym z podstawowych urządzeń wykorzystywanych we współczesnych laboratoriach. Posiada jednak pewne ograniczenia, którymi są rozmiar urządzenia, długi czas prowadzenia reakcji oraz wysokie zapotrzebowanie energetyczne.

Główną zaletą przepływowych mikroukładów PCR jest skrócenie czasu reakcji i miniaturyzacja, co pozwala na wykorzystanie ich jako element przenośnych urządzeń POC. PCR sam w sobie jest bardzo energo- i czasochłonnym procesem co wiąże się z dużymi kosztami tego procesu. Miniaturyzacja ze względu na małe objętości odczynników oraz szybką wymianę energii może w znacznym stopniu zredukować te koszty. Mikroukłady PCR można podzielić na dwie podstawowe grupy: stacjonarne i przepływowe. Poza nimi warto też zwrócić uwagę na dPCR (ang. *digital PCR*) oraz urządzenia wykorzystujące technikę LAMP.

## Mikrosystemy PCR stacjonarne

Mikrosystem PCR, w którym do amplifikacji dochodzi w trybie stacjonarnym, stanowi bezpośrednie przeniesienie idei prowadzenia reakcji w termocyklerze do mikroskali. Do amplifikacji dochodzi w mikrokomorze lub mikrokomorach reakcyjnych poprzez wielokrotne ogrzewanie i ochładzanie układu. Czynnikiem limitującym szybkość całej reakcji jest więc czas potrzebny na zmianę temperatury roztworu. Istotnym czynnikiem staje się wykorzystanie materiałów o wysokim przewodnictwie cieplnym oraz zapewnienie bezpośredniego lub bardzo bliskiego kontaktu elementu grzewczo-chłodzącego z roztworem.

Podstawowym systemem zapewniającym zmianę temperatury są moduły termoelektryczne, takie jak ogniwo Peltiera [4], pozwalające zarówno na dostarczanie jak i odbieranie ciepła. Są one również wykorzystywane w termocyklerach. Często również spotykane są cienkowarstwowe grzałki (z elastyczną folią poliamidową, cienkowarstwowe grzałki platynowe – Rysunek 6-C) w połączeniu z wentylatorem chłodzącym [38–40]. Urządzenia tego rodzaju znalazły zastosowanie także w przepływowym wariacie mikrosystemów PCR.



Rysunek 6: Przykładowe stacjonarne mikrosystemy PCR. A – mikrosystem wykorzystujący promieniowanie IR do ogrzewania bezkontaktowego. Źródło ilustracji – [5]; B – mikrosystem ogrzewany poprzez zestaw LED. Źródło ilustracji – [41]; C – mikrosystem wykorzystujący cienkowarstwowe grzałki platynowe, Źródło ilustracji – [40]

W podejściu stacjonarnym prowadzenie reakcji amplifikacji DNA, szybkość reakcji jest ograniczona przez czas potrzebny na zmianę temperatury mieszaniny reakcyjnej. Z tego powodu proces ogrzewania i chłodzenia powinien być prowadzony w sposób jak najbardziej wydajny, dlatego wykorzystuje się w tym celu bardziej zaawansowane i wydajne metody zmiany temperatury. Jednym z nich jest przekazanie energii poprzez promieniowanie elektromagnetyczne o określonej długości fali. Sposób ten pozwala na zmianę temperatury w sposób bezkontaktowy. W tym celu stosowane są lapy wolframowe z filtrem przepuszczającym jedynie określoną długość fali z zakresu podczerwieni. Innym źródłem energii mogą być LED (Rysunek 6-B) [41] lub lasery IR (Rysunek 6-A) [5]. Promieniowanie podczerwone, poza tym, że jest emitowane przez ciała o temperaturze większej od zera bezwzględnego, jest również stosowane w urządzeniach jako sposób przekazywania energii, gdyż jest absorbowane jedynie przez obiekty nieprzezroczyste (nie jest pochłaniane przez powietrze). Ten sposób wymiany ciepła w mikroukładach umożliwił zmianę temperatury mieszaniny rzędu 10-60°C na sekundę [42]. Bezpośrednie ogrzewanie foniczne z wykorzystaniem lamp wolframowych i halogenowych również jest wykorzystywane jako sposób bezkontaktowego przekazywania energii [43]. Pośredni wariant tej metody polega na przekazaniu energii (promieniowanie o określonej długości fali) najpierw nanocząsteczkom obecnym w mieszaninie reakcyjnym, które następnie ogrzewają roztwór. Również promieniowanie mikrofalowe, które tak często jest wykorzystywane w wielu domach do podgrzewania posiłków, zostało zaadaptowane w mikrosystemach PCR [44]. Oprócz dostarczenia energii niezbędnej do zainicjowania kolejnych etapów reakcji PCR bardzo poważnym wyzwaniem jest także odbieranie tej energii aby jak najszybciej schłodzić mieszaninę reakcyjną i zainicjować kolejne etapy reakcji PCR. Obniżenie temperatury jest przeprowadzane zazwyczaj poprzez moduły Peltiera, wywietrzniki chłodzące lub kanały stale zaopatrywane w ciecz odbierającą ciepło. Stacjonarne mikrosystemy PCR pozwalają na ograniczenie ilości ruchomych elementów układu takich jak mikrozawory i mikropompy ze względu na brak przepływu. Głównym ograniczeniem jest jednak proces wymiany ciepła, który może ograniczać szybkość reakcji, jeżeli nie jest przeprowadzony w dostatecznie wydajny sposób.

### *Mikrosystemy PCR przepływowe*

Przepływowe mikrosystemy PCR zawierają odpowiedni system kanałów, którego poszczególne części znajdują się w trzech różnych strefach temperaturowych. Zazwyczaj każda z nich zaopatrzona jest w element grzewczy, który odpowiada za ustalenie temperatury

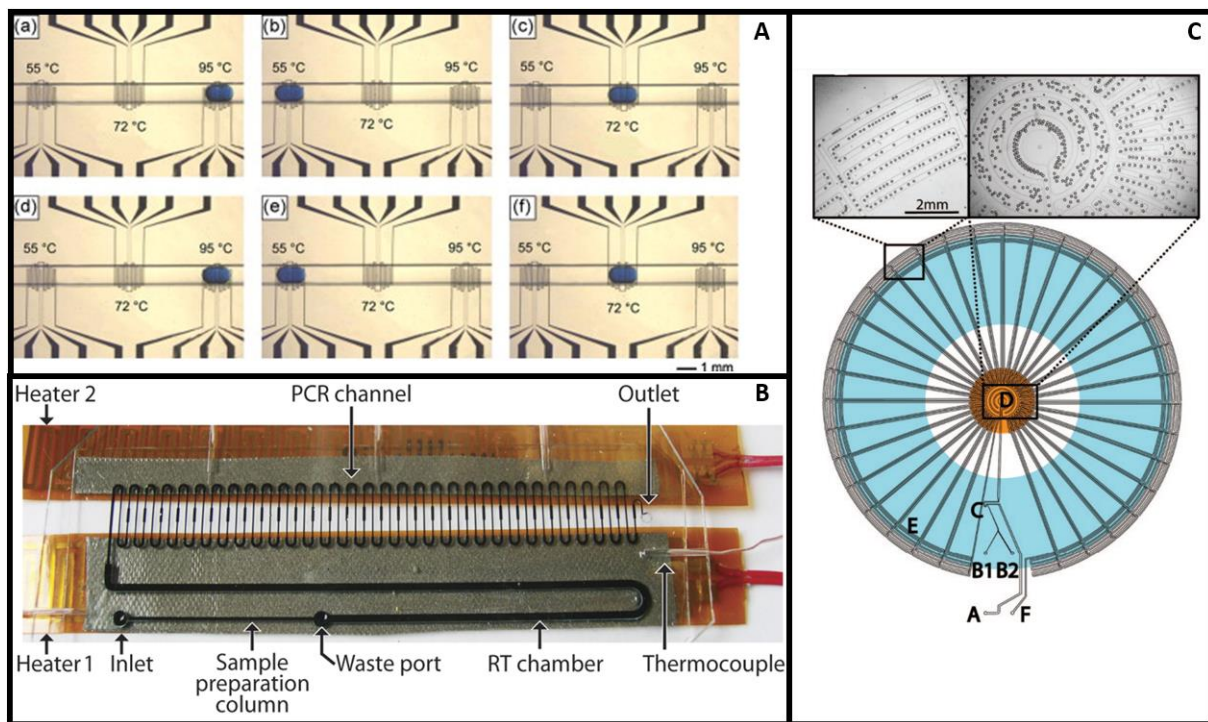
odpowiedniej do zajście jednego z etapów reakcji: denaturacji, przyłączenia starterów i wydłużenia nici. Opracowane zostały mikrosystemy przepływowe, w których obecna była jedna grzałka, zapewniająca najwyższą temperaturę, połączona z systemami chłodzącymi [6], jednak nie jest to typowe rozwiązanie.

W tego typu systemach mieszanina reakcyjna przepływa przez system mikrokanałów, zmieniając swoją temperaturę w zależności od strefy, w której się znajduje. Ze względu na niewielką objętość cieczy oraz stałe ogrzewanie określonych fragmentach układu, temperatura mieszaniny zmienia się skokowo w trakcie przepływu. Podejście to pozwala na skrócenie czasu potrzebnego elementom grzewczo-chłodzącym na zmianę temperatury. W mikrosystemach przepływowych PCR wykorzystuje się zazwyczaj nieskomplikowane systemy grzewcze (zastosowane w tym celu zostały nawet łaźnie wodne) lub moduły termoelektryczne, gdyż w przeciwieństwie do układów stacjonarnych nie wymagają szybkich zmian temperaturowych. Prowadzenie reakcji amplifikacji DNA w przepływie stawia jednak kilka wyzwań. Jednym z nich jest wyjątkowy duży wpływ sił powierzchniowych działających na roztwór. Jest on zazwyczaj większy niż w mikrosystemach ze stacjonarną komorą (przy tej samej objętości mieszaniny reakcyjnej) ze względu na duży stosunek powierzchni do objętości przy podłużnym kształcie mikrokanalu. Może prowadzić to do zmniejszenia wydajności reakcji np. przez adsorpcję aktywnych białek na powierzchni materiału. Szczególnie podatne są mikrosystemy z PDMS, jednak zostały opracowane procedury mające na celu zapobiegać tego typu zakłóceniom [7, 45]. Dodatkowym utrudnieniem w mikrosystemach przepływowych jest konieczność zastosowania elementów wymuszających i kontrolujących ruch cieczy.

Wykorzystuje się w tym celu najczęściej pompy perystaltyczne, strzykawkowe lub opisane wcześniej mikropompy i mikrozapory. Zostały też opracowane przepływowe mikrosystemy PCR, które opierają się na działaniu sił kapilarnych czego przykładem jest urządzenie pozwalające na przeprowadzenie 50 cykli reakcyjnych w 14 minut stworzone przez H. Tachibana [46]. Mikrosystemy przepływowe PCR można podzielić na mikrosystemy działające w cyklu otwartym oraz mikrosystemy działające w cyklu zamkniętym. Działające w cyklu otwartym charakteryzują się tym, że roztwór przez każdy obszar mikrokanalu przepływa tylko jednorazowo. Mikroukłady tego typu umożliwiają przeprowadzenie reakcji amplifikacji w bardzo szerokim zakresie objętości roztworów, ale wiąże się to z bardzo dużym rozwinięciem mikrokanalu, a to z kolei wpływa na znaczne opory przepływu. Dlatego układy tego typu wymagają bardzo wydajnego źródła wymuszania przepływu oraz dużym wyzwaniem jest kontrolowanie tego przepływu. Wśród tej grupy wyróżnia się między innymi mikrosystemy serpentynowe i spiralne, których nazwy pochodzą od charakterystycznego kształtu

mikrokanalów. Mikrosystemy działające w trybie zamkniętym charakteryzują się tym, że roztworów przepływa cyklicznie przez te same strefy mikrokanalu wielokrotnie. Objętość mieszaniny reakcyjnej w tym przypadku jest ograniczona tylko do pętli w której zachodzi reakcja.

Serpentynowe mikrosystemy PCR posiadają charakterystyczny kształt długiego pozwijanego kanału, w którym można wyróżnić pewien fragment powtarzający się określoną ilość razy (Rysunek 7-B). Jeden taki fragment obecny jest w trzech strefach temperaturowych i odpowiada tylko za pojedynczy cykl reakcyjny. Mieszanina w mikrosystemach serpentynowych przepływa przez mikrokanal tylko raz, a liczba cykli reakcyjnych jest ograniczona przez zaprojektowaną geometrię [47]. Mikrosystemy cyrkulacyjne/oscylacyjne, w porównaniu do geometrii serpentynowej, wykorzystują krótszy mikrokanal, w którym mieszanina reakcyjna przepływa wielokrotnie poruszając się w trzech strefach temperaturowych [48].



Rysunek 7: Przykładowe przepływowe mikrosystemy PCR. A – Mikrosystem oscylacyjny: zdjęcia (a) i (d) – mieszanina reakcyjna w temperaturze denaturacji, (b) i (e) – przyłączenie starterów, (c) i (f) – wydłużenie nici. Łącznie przedstawione są dwa cykle reakcyjne. Źródło ilustracji – [48]; B – Mikrosystem serpentynowy z dwiema rozdzielonymi grzałkami. Źródło ilustracji – [47]; C – mikrosystem z geometrią promieniową, w którym zostały wygenerowane krople (dPCR). Źródło ilustracji – [52]

W układach cyrkulacyjnych mikrokanal tworzy swojego rodzaju pętlę, w której ciecz płynie w jednym kierunku. Takie podejście wymaga zastosowanie zaworów, które umożliwiają automatyczne wprowadzenie, cyrkulację oraz wyprowadzenie mieszaniny. Geometria mikrosystemów oscylacyjnych opiera się na jednym prostym mikrokanale, ślepo zakończony z



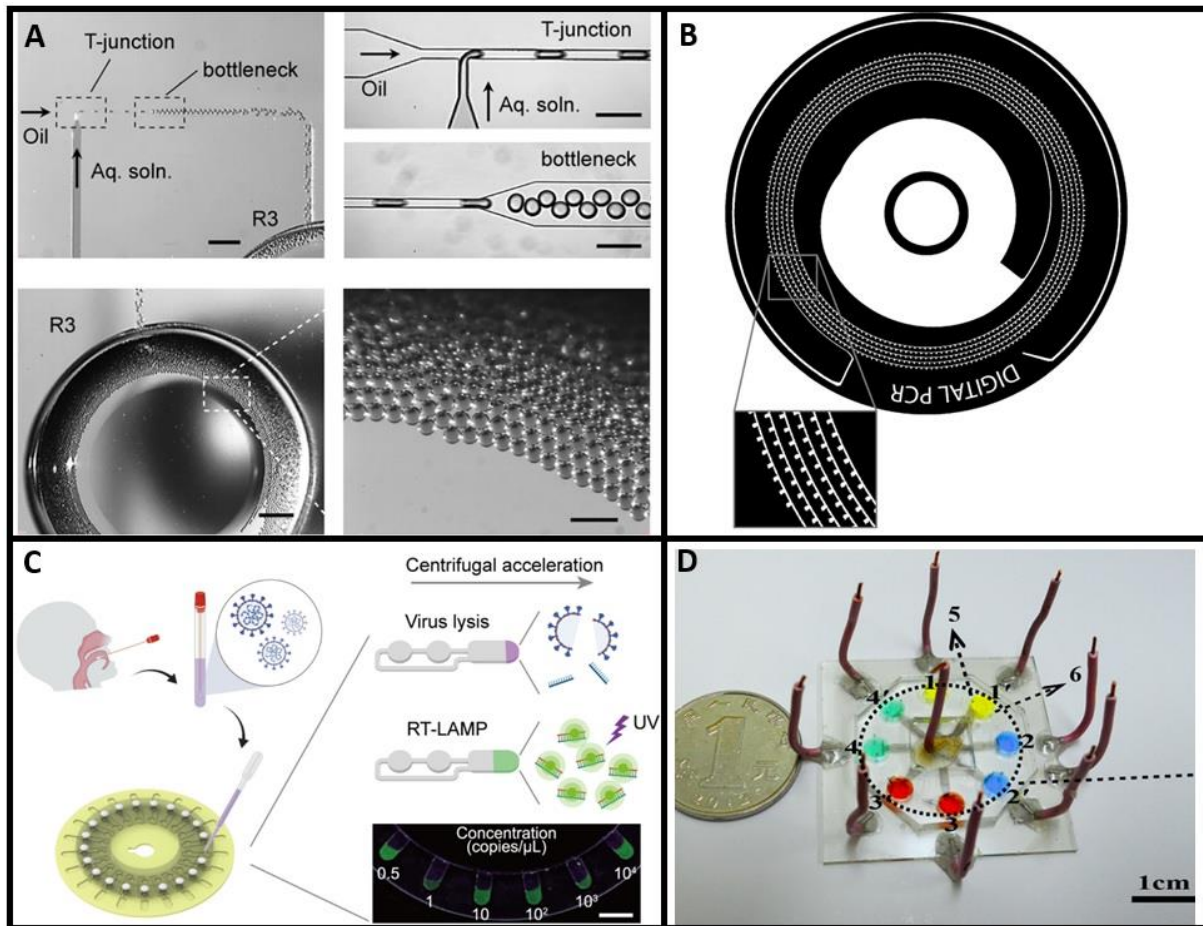
obu stron (Rysunek 7-A). Przepływ w takim układzie odbywa się naprzemiennie w dwóch kierunkach przez odpowiednie strefy temperaturowe. Zaletą mikrosystemów cyrkulacyjnych i oscylacyjnych jest możliwość przeprowadzenia dowolnej liczby cykli PCR, gdyż nie zależy ona od układu mikrokanalów, tylko jest ustalana przez operatora. Ponadto konstrukcja takich urządzeń, szczególnie w trybie oscylacyjnym, jest uproszczona, a wymiary zredukowane.

Spiralne mikrosystemy PCR podobnie jak serpentynowe posiadają jeden długi kanał (Rysunek 7-C). Powoduje to, że liczba cykli jest z góry ograniczona. Główne zalety tego typu układów wynikają z spiralnego kształtu mikrokanalów. Przy zastosowaniu trzech systemów grzewczych, pozwala to na bezpośrednie przejście mieszaniny reakcyjnej do odpowiedniej strefy temperaturowej co zapobiega renaturacji DNA, która może wpływać na wydajność PCR [49, 50] (podobny efekt można uzyskać projektując mikrosystem cyrkulacyjny na bazie okręgu). Promienisty układ mikrokanalów pozwala na zmniejszenie liczby elementów grzewczych w układzie. Zwiększenie temperatury w środku okręgu prowadzi do powstania gradientu temperatury. Przy zastosowaniu takiego rozwiązania, układ mikrokanalów należy zaprojektować promieniście, tak aby strefa denaturacji znajdowała się najbliżej środka okręgu, przyłączania starterów blisko jego obwodu, a wydłużanie nici w środkowej części [8, 51].

#### *Mikrosystemy dPCR*

Od czasu opracowania łańcuchowej reakcji polimerazy powstało wiele jej wariantów. Jedną z nich jest dPCR (ang. *digital PCR*), nazywana czasami cyfrową PCR. Polega ona na przeprowadzeniu olbrzymiej liczby osobnych reakcji w bardzo małych objętościach. Mieszanina reakcyjna (w której zazwyczaj obecny jest też wskaźnik fluorescencyjny ze względu na sposób detekcji) jest rozdzielana na kilka lub kilkadziesiąt tysięcy kropeł o objętości rzędu nanolitrów [52]. Tak niewielkie objętości oraz rozcieńczenie próbki powoduje, że matrycowa cząsteczka DNA, która jest przeznaczona do amplifikacji, będzie obecna jedynie w części kropeł. Warunki prowadzenia reakcji, takie jak skład mieszaniny oraz konieczność cyklicznej zmiany temperatury, pozostają takie same. Główna różnica polega jednak na tym, że każda kropla odgrywa rolę zminiaturyzowanego reaktora. Po zakończeniu reakcji przeprowadzany jest proces detekcji, najczęściej poprzez pomiar fluorescencji. Zarejestrowane wyniki pomiarów zamieniane są na wartości 0 lub 1 w zależności od tego czy w kropli doszło do amplifikacji DNA (wywodzi się stąd nazwa metody *digital PCR*). Procent pozytywnych wyników jest następnie przeliczany na początkową zawartość DNA w badanej próbce. Jest to ilościowa technika, która w przeciwieństwie do RT-PCR (ang. *real time PCR*) nie wymaga

krzywej wzorcowej. Ponadto jest od niej dokładniejsza, gdyż początkowy wzrost DNA w standardowej reakcji PCR może nie mieć charakteru wykładniczego [8].



Rysunek 8: A – Generowanie kropli w mikrosystemie z PDMS służącym do przeprowadzania ddPCR. Źródło ilustracji – [53]; B – Mikrosystem dPCR w formie przepływowej spiralnej. Źródło ilustracji – [54]; C – Mikrosystem służący do przeprowadzania reakcji LAMP, wykorzystujący siłę odśrodkową. Źródło ilustracji – [55]; D – Mikrosystem LAMP służący do jednoczesnej detekcji wielu bakterii. Źródło ilustracji – [56]

Opracowane zostały mikrosystemy umożliwiające przeprowadzenie dPCR na chipie. Ich kluczowym elementem konstrukcji jest zestaw wielu mikrokomór, które umożliwiają rozdzielenie mieszaniny reakcyjnej. Każda z nich spełnia funkcję zminiaturyzowanego reaktora. Formowanie kropli jest procesem, który często odbywa się z wykorzystaniem mikrosystemów. Proces ten w przypadku ddPCR (ang. *droplet digital PCR*) polega na kontrolowanym połączeniu dwóch niemieszających się cieczy w celu wytworzenia emulsji typu faza wodna w fazie oleistej. Najprostszym i najczęściej wykorzystywanym sposobem generowania kropli jest stworzenie odpowiedniej geometrii kanałów w mikrosystemie, z których najczęściej spotykanym jest połączenie typu T (Rysunek 8-A) [53]. Struktura ta opiera się na mikrokanale z fazą wodną, który jest skierowany pod kątem prostym do drugiego mikrokanalu z fazą oleistą. Na ich połączeniu wytwarzana jest niestabilna powierzchnia styku

dwóch faz cieczy, prowadząca do utworzenia kropli. Odpowiada za to połączenie sił powierzchniowych i bezwładności. Poprzez modyfikacje tego typu połączenia można generować krople o określonych parametrach (kształt, wielkość) [57]. Innymi sposobami tworzenia kropli jest zastosowanie zminiaturyzowanych dysz, siły odśrodkowej (Rysunek 7-B) [54], odpowiednie mieszanie lub wykorzystanie promieniowania laserowego.

### *Mikrosystemy LAMP*

LAMP (ang. loop-mediated isothermal amplification) jest techniką amplifikacji DNA, która została opracowana w roku 2000. W przeciwieństwie do PCR, nie wymaga ona cyklicznej zmiany temperatury mieszaniny. Reakcja przy użyciu LAMP przebiega w stałej temperaturze (zazwyczaj w 65°C) poprzez inkubację mieszaniny. Mechanizm amplifikacji DNA nieco się różni od tego za pomocą PCR, a ponadto wymaga zastosowania większej liczby starterów (2 lub 3 pary) oraz polimerazy Bst (*Bacillus stearothermophilus* DNA Polymerase). LAMP umożliwia ponadto prostą wizualizację wyniku reakcji poprzez dodanie specjalnego barwnika lub obserwacji zmętnienia spowodowanego przez pirofosforan magnezu będący produktem ubocznym reakcji. Detekcję w czasie rzeczywistym można przeprowadzić przez dodatek specjalnego interkalującego barwnika i pomiar fluorescencji.

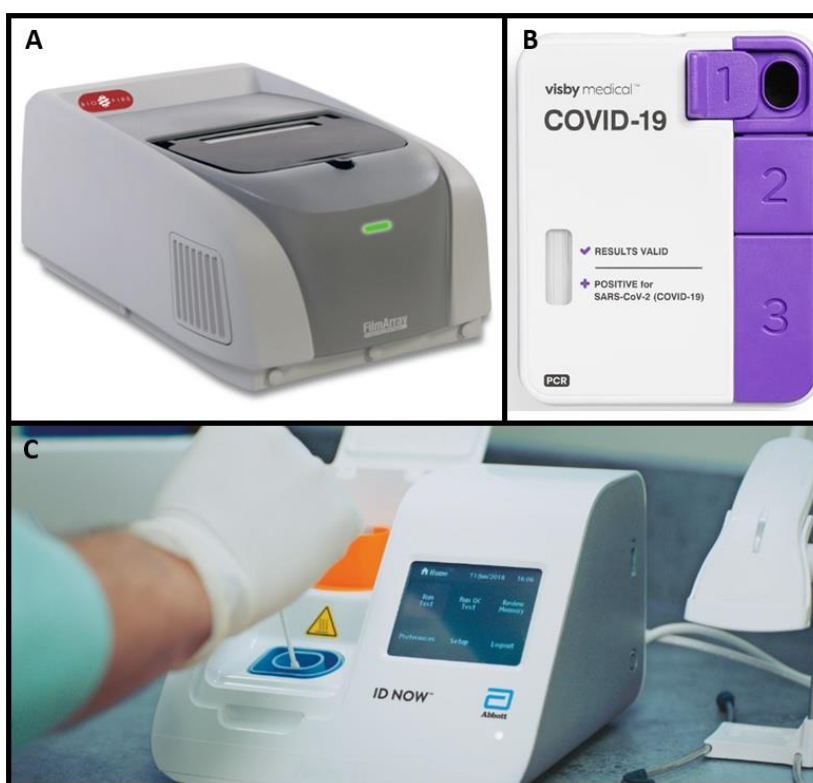
Technika LAMP została z powodzeniem wykorzystana do amplifikacji DNA w mikrosystemach. Jej główną zaletą jest to, że reakcja przebiega w jednej temperaturze, dlatego została zaadaptowana w mikroukładach stacjonarnych, niewymagających skomplikowanego systemu regulującego przepływ mieszaniny. Ponadto w konstrukcji urządzenia można zastosować prosty system grzewczy. Zostały opracowane mikrosystemy zarówno do pojedynczej amplifikacji z wykorzystaniem LAMP (Rysunek 8-C), jak i do równoległego prowadzenia wielu reakcji (Rysunek 8-D) [58, 59]. Detekcja produktu reakcji odbywała się optycznie z użyciem światła UV [60] lub przy użyciu sensorów elektrochemicznych [61]. Ograniczeniem wykorzystania LAMP w mikrosystemach typu POC może być czas reakcji, który może wynosić około godziny. Istnieją jednak doniesienia mówiące o uzyskaniu wyników w krótszym czasie [62, 63].

## 1.6. Zastosowanie zminiaturyzowanych urządzeń PCR do celów diagnostycznych

Mikrosystemy PCR mogą być wykorzystywane do wielu badań, w których analitem są kwasy nukleinowe. Przykładem są mikrofluidyczne układy do diagnostyki nowotworów.

Zostały opracowane mikrosystemy umożliwiające wyłapywanie komórek nowotworowych z krwi, wykorzystują dPCR do detekcji pozakomórkowego nowotworowego DNA oraz wykrywające biomarkery nowotworowe [64, 65].

Najczęściej spotykanym zastosowaniem diagnostycznym mikrosystemów PCR jest powielenie materiału biologicznego (DNA lub RNA) patogenów chorobowych, zarówno bakteryjnych jak i wirusowych, po której następuje oznaczanie amplifikowanej sekwencji nukleotydów przez odpowiedni element detekcyjny. Proces diagnostyczny wykorzystujący mikrosystemy PCR stanowi alternatywę dla hodowli mikroorganizmów, która jest czasochłonna i wymaga wyspecjalizowanego sprzętu oraz personelu. Należy zwrócić uwagę na fakt, że mikrosystem DNA/RNA jest jedynie elementem, choć kluczowym, większego procesu diagnostycznego. Wieloetapowa procedura przygotowania próbki pobranej od pacjenta wymaga przeprowadzenie zazwyczaj takich procesów jak separacja i zagęszczenie komórek, po których następuje ich liza i ekstrakcja DNA/RNA. Przygotowana próbka poddawana jest amplifikacji, po której następuje detekcja kwasów nukleinowych. Najczęściej wykorzystywanymi technikami detekcji DNA w mikrosystemach jest pomiar fluorescencji [66], elektroforeza kapilarna z późniejszą detekcją optyczną [67] oraz elektrochemiczne biosensory [68]. Rozbudowane układy mikrofluidyczne integrują ze sobą poszczególne etapy, tworząc zautomatyzowane urządzenia typu  $\mu$ TAS.



Rysunek 9: Komercyjnie dostępne urządzenia diagnostyczne w kierunku SARS-CoV-2 wykorzystujące mikrofluidyczne podejście do PCR. A – Urządzenie firmy BioFire. Źródło ilustracji – [69]; B – Urządzenie firmy Visby Medical. Źródło ilustracji - [70]; C – Urządzenie firmy Abbott. Źródło ilustracji – [63]

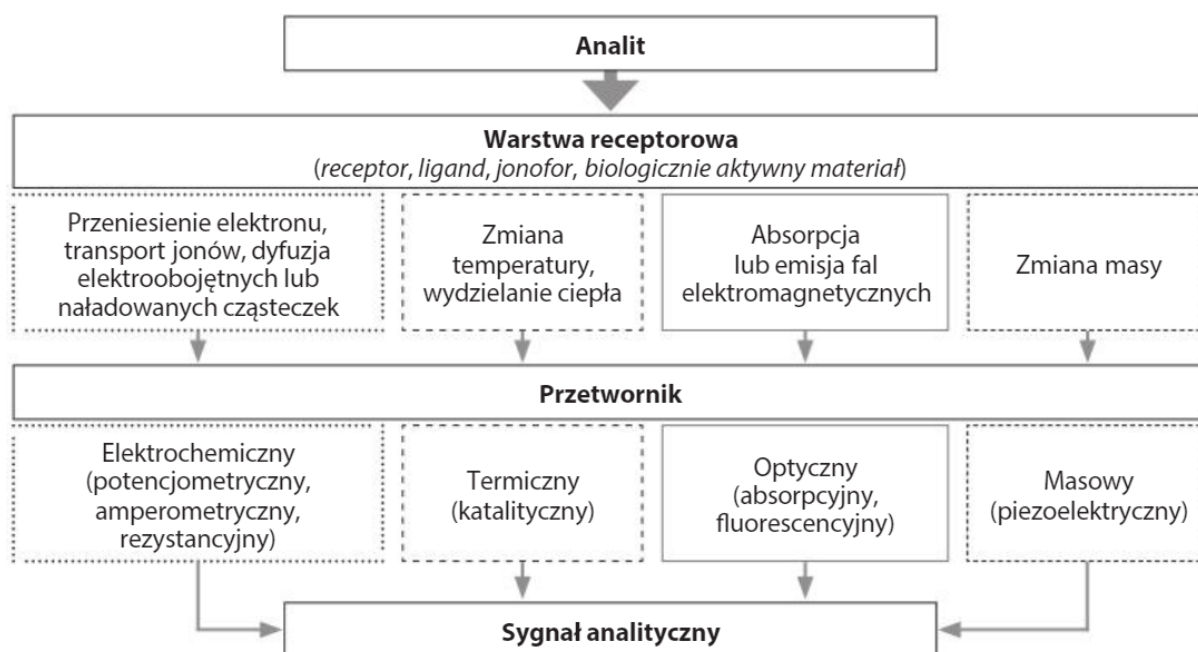
Zostało opracowanych wiele mikrosystemów, które wykorzystują reakcję PCR w celu diagnozowania chorób bakteryjnych jak i wirusowych. Materiałem wyjściowym pobieranym do badań od pacjenta była w nich, w zależności od przeznaczenia urządzenia: krew, surowica krwi, mocz lub wymazy z nosa lub gardła. Szczególnie w obliczu pandemii SARS-CoV-2 i konieczności prostego i masowego testowania populacji, szybkie testy zyskały popularność. Pomimo, że technika PCR jest wykorzystywana głównie w laboratoriach, to została zaaplikowana do zminiaturyzowanych urządzeń diagnostycznych SARS-CoV-2, które są obecnie komercyjnie dostępne. W ich konstrukcji zostały zastosowane różne rozwiązania, które były opisane w poprzednich podrozdziałach. Urządzenie firmy Abbott (ID NOW COVID-19) (Rysunek 9-C) opierając się na jednotemperaturowej reakcji LAMP, jest w stanie dostarczyć wynik w mniej niż 13 minut [63]. System opracowany przez BioFire (Rysunek 9-A) wykorzystuje jednorazową kasetę, w której przeprowadzana jest reakcja PCR w trybie stacjonarnym. Wykrywanych jest 19 różnych patogenów w tym SARS-CoV-2, a wynik dostępny jest po około 45 minutach [69]. Urządzenie Visby Medical COVID-19 (Rysunek 9-B) stosuje z kolei przepływowy wariant reakcji PCR dostarczając wynik w mniej niż 30 minut [70]. Wszystkie te urządzenia powstały w krótkim czasie, w odpowiedzi na zapotrzebowanie spowodowane pandemią. Pozwala to przypuszczać, że systemy POC bazujące na PCR będą coraz częściej wykorzystywane w diagnostyce chorób zakaźnych.

## 2. Biosensory jako narzędzia do wykrywania bioanalitów

Biosensory są urządzeniami, które na przestrzeni ostatnich lat zdobywają coraz większą popularność oraz zastosowania, także w dziedzinie diagnostyki medycznej. Zostały one również wykorzystane w połączeniu z systemami typu LOC, tworząc urządzenia POC umożliwiające szybką diagnostykę pacjenta [71]. Warto jednak rozpocząć do wyjaśnienia, czym jest biosensor, jak jest zbudowany oraz jaka jest zasada jego działania.

Sensor chemiczny, zgodnie z definicją podaną przez Międzynarodową Unię Chemii Czystej i Stosowanej (IUPAC) [72] jest to „urządzenie, które przekształca informacje chemiczne, od stężenia określonego składnika próbki po analizę całkowitego składu, w sygnał użyteczny analitycznie. Wspomniana wyżej informacja chemiczna może pochodzić z reakcji chemicznej analitu lub z właściwości fizycznych badanego układu.”

Podstawowymi elementami konstrukcji sensora chemicznego są warstwa receptorowa oraz przetwornik sygnału. Warstwa receptorowa, poprzez swoje specyficzne oddziaływania z analitem zawartym w próbce pozwala na jego wykrywanie. Podstawowy podział sensorów może zostać dokonany już na podstawie mierzonej wielkości fizycznej, którą może być zmiana sygnału optycznego, prądowego, zmiana temperatury, ciśnienia, kształtu i wiele innych (Rysunek 10) [73].



Rysunek 10: Schemat przedstawiający podstawowe elementy budowy sensorów chemicznych: warstwa receptorowa oraz przetwornik. Schemat przedstawia podział sensorów ze względu na wykorzystaną warstwę receptorową oraz ze względu na rodzaj przetwornika; Źródło ilustracji [73]

Przetwornik w konstrukcji biosensora jest odpowiedzialny za przetworzenie sygnału odpowiadającego zmianie badanej właściwości na mierzalny sygnał analityczny. W zależności od zastosowanego przetwornika sensory można podzielić na elektrochemiczne, optyczne, piezoelektryczne oraz termiczne (Rysunek 10), z których najczęściej wykorzystywane są przetworniki optyczne oraz elektrochemiczne. Sygnał uzyskany za pomocą przetwornika jest następnie wzmacniany, przetwarzany do postaci cyfrowej i ostatecznie zaprezentowany użytkownikowi przy użyciu odpowiedniego interfejsu.

Zgodnie z definicją, mianem biosensora określa się urządzenie analityczne, które w warstwie receptorowej zawiera materiał pochodzenia biologicznego. Do jej konstrukcji mogą zostać wykorzystane różnego rodzaju materiały biologicznie aktywne, takie jak przeciwciała, enzymy, kwasy nukleinowe, a nawet całe komórki lub tkanki. Ze względu na skład warstwy receptorowej biosensora wyróżnia się między innymi biosensory enzymatyczne, komórkowe, tkankowe, immunosensory oraz biosensory DNA i RNA. Mylnie mianem biosensorów zwykło się nazywać sensory przeznaczone do wykrywania analitów pochodzenia biologicznego lub wykorzystywane do pomiarów w próbkach pochodzenia biologicznego [74, 75]. Określenie sensora mianem biosensora nie zależy jednak od rodzaju wykrywanego analitu, ale od samej jego konstrukcji, która zawiera element pochodzenia biologicznego będący aktywnym czynnikiem w procesie detekcji, a warstwa receptorowa jest zintegrowana z przetwornikiem. Współcześnie opracowywane biosensory najczęściej wykorzystują przetworniki optyczne lub elektrochemiczne.

Przetworniki optyczne wykorzystują zmiany w rejestrowanym promieniowaniu elektromagnetycznym podającym na próbkę z analitem. Mogą one polegać zarówno na zmianie intensywności rejestrowanego światła poprzez pochłonięcie, odbicie lub rozproszenie promieniowania padającego na próbkę, jak i emisji promieniowania o innej długości fali. Jednym z najpopularniejszych rodzajów biosensorów optycznych są biosensory fluorescencyjne. Bazują one na możliwości absorpcji przez określone związki (fluorofory) promieniowania elektromagnetycznego o określonej długości fali, a następnie na emisji promieniowania o innej długości fali. Niektóre materiały pochodzenia biologicznego wykazują samoczynnie właściwości fluorescencyjne. W przeciwnym przypadku możliwa jest modyfikacja cząsteczek poprzez wprowadzenie do jej struktury związku odpowiednich znaczników optycznych. Oddziaływanie warstwy receptorowej z analitem prowadzi do zmiany intensywności fluorescencji lub do przesunięcia pasma emisyjnego, które jest podstawą do pomiaru sygnału analitycznego. Biosensory fluorescencyjne znajdują szerokie zastosowanie, w tym jako elementy systemów typu POC [76].

Przetworniki elektrochemiczne są jednymi z najczęściej spotykanych narzędzi służących do wytworzenia sygnału analitycznego przez biosensor. Swoją popularność zawdzięczają między innymi wysokiej czułości, stosunkowo niskim kosztom wytworzenia oraz możliwości skalowania. Sprawia to, że przetworniki elektrochemiczne mogą być dostępne dla szerokiej grupy odbiorców poprzez masową produkcję oraz integrację ich z urządzeniami typu Lab-on-a-chip. Dzięki wspomnianym zaletom, przetworniki elektrochemiczne mogą zostać wykorzystane jako elementy tanich, przenośnych urządzeń stosowanych w diagnostyce medycznej. Biosensory elektrochemiczne jako przetworniki wykorzystują elektrody, które oddziaływania w warstwie receptorowej przetwarzają na mierzalny sygnał w postaci pomiaru prądu, zmiany potencjału lub impedancji. Na tej podstawie można wyróżnić trzy główne rodzaje przetworników elektrochemicznych: woltamperometryczne, potencjometryczne oraz impedancyjne.

Elektrochemiczne biosensory DNA wykorzystują najczęściej techniki woltamperometryczne takie jak woltamperometria cykliczna (CV), woltamperometria pulsowa różnicowa (DPV), woltamperometria sinusoidalna (ACV) i woltamperometria fali prostokątnej (SWV). Woltamperometria cykliczna zazwyczaj jest wykorzystywana do charakteryzowania reakcji chemicznej. SWV jest techniką elektrochemiczną zależną od częstotliwości. Jest ona bardzo czuła, przez co jest szeroko stosowana w analizie ilościowej. Ponadto kształt piku SWV jest wygodny do analizy danych, dlatego technika ta jest często stosowana do określania docelowego stężenia analitu. W elektrochemicznych biosensorach DNA, których warstwa receptorowa zawiera jednoniciowe DNA lub aptamery, najczęściej stosowanymi przetwornikami są elektrody złote, ale również elektrody z węgla szklanego, elektrody grafitowe, sitodrukowe lub elektrody węglowe z cieczą jonową. Biosensory elektrochemiczne charakteryzują się wysoką czułością, niskimi kosztami wytworzenia oraz mogą osiągać niewielkie rozmiary dzięki nowoczesnym technikom mikrowytwarzania, przez co mają potencjał do wykorzystania w przenośnych urządzeniach diagnostycznych [77].

## 2.1. Biosensory DNA i RNA

Biosensory DNA i RNA jako element bioczuły warstwy receptorowej wykorzystują fragmenty kwasów nukleinowych (oligonukleotydy o określonej sekwencji zasad). Ten rodzaj biosensora jest szczególnie istotny w badaniach diagnostycznych oraz opracowywaniu urządzeń typu POC służących do szybkiego wykrywania różnego rodzaju patogenów. Biosensory kwasów nukleinowych mogą być stosowane do wykrywania określonych sekwencji



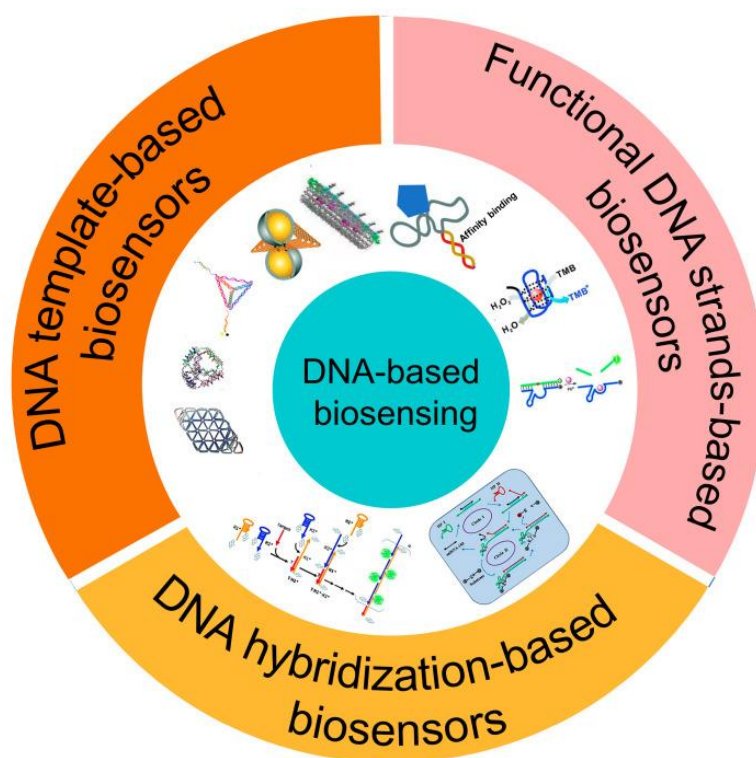
DNA na zasadzie komplementarności dwóch nici, ale mogą również posłużyć do wykrywania innych związków chemicznych, a nawet całych komórek, na zasadzie specyficznego powinowactwa kwasów nukleinowych z określonymi cząsteczkami.

W konstrukcji elektrochemicznych biosensorów DNA i RNA można wyróżnić kilka kluczowych elementów:

1. Fragment kwasu nukleinowego o określonej sekwencji nukleotydów. W przypadku biosensorów DNA są to zazwyczaj fragmenty o sekwencjach nukleotydów komplementarnych do wykrywanej w procesie analitycznym cząstki. W przypadku biosensorów RNA zasada jego działania opiera się najczęściej na specyficznym powinowactwie tworzonych przez RNA drugorzędowych struktur (aptamerów) z analitem, a nie na hybrydyzacji nici, jak w przypadku biosensorów DNA.
2. Znaczniki (nazywane też markerami) odpowiedzialne są za wytworzenie sygnału, który jest następnie zmieniany przez przetwornik na sygnał analityczny. Są to zazwyczaj związki odpowiedzialne za generowanie sygnału optycznego lub elektrycznego, który jest wynikiem oddziaływania warstwy receptorowej z analitem. Znaczniki najczęściej są trwale powiązane z fragmentem kwasu nukleinowego tworząc tzw. sondy molekularne DNA lub RNA. Samym mianem sondy molekularnej określa się różnego rodzaju związki chemiczne, które poprzez swoiste oddziaływania z daną substancją, pozwalają na jej wykrycie lub oznaczenie.
3. Związki chemiczne określane popularnie jako spacery (ang. *spacer*) pozwalają kontrolować odległość pomiędzy powierzchnią elektrody a fragmentem nici kwasu nukleinowego. Zastosowanie „spacerów” przyczynia się do pionowej orientacji sond, co wpływa na jakość uzyskiwanego sygnału elektrochemicznego, w tym możliwość uzyskiwania bardziej precyzyjnych pomiarów oraz zwiększenie czułości biosensora.
4. Czynniki blokujące stosowane są w celu wypełnienia wolnych przestrzeni na powierzchni elektrody. Ich zastosowanie zapobiega niespecyficznemu wiązaniu się jednoniciowego DNA (ssDNA) i RNA do powierzchni elektrody oraz pomaga zapewnić pionową orientację sond.

Mechanizmem, który jest podstawą działania biosensorów DNA w celu wykrywania komplementarnych nici jest proces hybrydyzacji. Elektrochemiczny biosensor tego typu jest najczęściej konstruowany przez immobilizację krótkich, zawierających zazwyczaj od 20 do 60 par zasad (pz), fragmentów jednoniciowego DNA (ssDNA) na powierzchni elektrody. Sekwencja tych fragmentów jest dobierana tak, aby wykazywała jak największą selektywność

względem analitu, a jego immobilizacja prowadzona w taki sposób, aby zapewnić odpowiednią orientację ssDNA oraz dostępność do analitu. Obecne w próbce znaczniki elektrochemiczne są dobrane tak, aby w wyniku hybrydyzacji analitu z sondą biosensora generowały sygnał, który może być następnie zmieniony przez przetwornik na sygnał analityczny [78].



Rysunek 11: Schematyczne przedstawienie podziału biosensorów DNA ze względu na zasadę działania. Źródło ilustracji - [78]

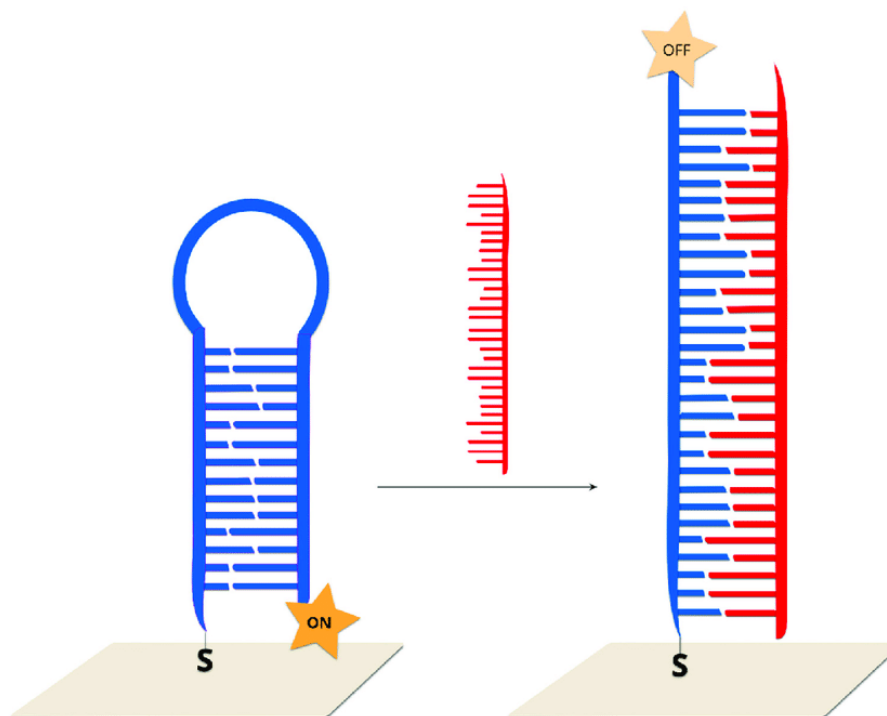
Biosensory kwasów nukleinowych mogą zostać wykorzystane do wykrywania różnego rodzaju związków, a sam proces nie musi koniecznie polegać na zjawisku hybrydyzacji pomiędzy dwiema niciami DNA. Podstawą działania biosensorów kwasów nukleinowych służących do wykrywania analitów innych niż pojedyncze nici komplementarnego DNA jest szczególnie oddziaływanie selektywnie dobranych sekwencji DNA lub RNA z niektórymi związkami. Proces dzięki któremu możliwe jest dobranie sekwencji DNA lub RNA specyficznie oddziaływującej z inną cząsteczką nazwany został SELEX (ang. *systematic evolution of ligands by exponential enrichment*). Pozwala on na wybranie spośród ogromnej liczby przypadkowych sekwencji DNA lub RNA jednej lub kilku, które wykazują największe powinowactwo do danego związku poprzez utworzenie złożonej trójwymiarowej struktury [79]. Co więcej, technika ta w jednym ze swoich wariantów (Cell-SELEX) może być

wykorzystana do dobrania takiej sekwencji łańcucha nukleotydowego, który oddziałuje specyficznie z całą komórką [80].

## 2.2. Biosensor DNA typu „hairpin”

Elektrochemiczne biosensory typu spinka do włosów (ang. *hairpin*) to rodzaj czujnika, który posiada w warstwie receptorowej sondy molekularne DNA o charakterystycznej strukturze. Są one wykorzystywane w celu wykrywania konkretnych sekwencji jednoniciowego DNA w próbce z wysoką selektywnością, co sprawia, że są one z powodzeniem wykorzystane w badaniach biologicznych, genetycznych oraz diagnostycznych.

Konstrukcja tego typu sensora bazuje na unieruchomieniu na powierzchni elektrody jednoniciowego DNA o odpowiedniej sekwencji. Sekwencja ta jest zaprojektowana w taki sposób, aby tworzyła strukturę drugorzędową o charakterystycznym kształcie przypominającym spinkę do włosów (Rysunek 12) [81]. Utworzenie takiego kształtu jest możliwe ze względu na obecność krótkich komplementarnych sekwencji par zasad i ich hybrydyzacji wewnątrz struktury jednoniciowego DNA tzw. trzpieni. Tworzenie struktur drugorzędowych DNA zostało potwierdzone dla dłuższych fragmentów ssDNA [82]. Sekwencja sondy powinna również zostać zaprojektowana w taki sposób, aby była



Rysunek 12: : Schemat działania biosensora typu spinka do włosów na dużym poziomie ogólności. W obecności w roztworze komplementarnej nici DNA dochodzi do jej hybrydyzacji z sondą i oddalenia znacznika od powierzchni elektrody. Najczęściej w tego typu biosensorych wykorzystuje się znaczniki optyczne lub elektrochemiczne Źródło ilustracji - [81]

komplementarna do sekwencji jednoniciowego DNA będącego wykrywanym związkim. Obecność analitu w próbce prowadzi do hybrydyzacji pomiędzy sondą a wykrywanym fragmentem ssDNA, przez co również do zniszczenia struktury drugorzędowej (rozplątania spinki do włosów). Poprzez zmiany przestrzenne w warstwie receptorowej wytwarzany jest sygnał analityczny umożliwiający wykrywanie lub oznaczanie analitu. Proces ten w zależności od zastosowanych technik może być prowadzony z wykorzystaniem odpowiedniego znacznika lub bezznacznikowo. Tego typu warstwy receptorowe zostały użyte do tworzenia zarówno biosensorów elektrochemicznych jak i optycznych.

Biosensory DNA z detekcją optyczną można podzielić na metody bezznacznikowe, takie jak powierzchniowy rezonans plazmowy (SPR) oraz takie które wykorzystują znakowanie np. fluorescencyjne, enzymatyczne lub z zastosowaniem nanocząstek. Mechanizm detekcji w przypadku biosensorów wykorzystujących SPR polega na tym, że cząsteczki adsorbujące lub wiążące się z warstwą receptorową powodują zmianę współczynnika załamania światła dla cienkiej warstwy podłoża rejestrowaną przez urządzenie. Popularniejszym typem biosensorów optycznych są jednak te wykorzystujące znakowane fragmenty jednoniciowego DNA (ssDNA). Jednym z najczęściej spotykanych typem optycznych biosensorów DNA są czujniki fluorescencyjne. Charakteryzują się one wyjątkowo niską granicą wykrywalności, jednak ich zastosowanie wymaga skomplikowanej i kosztownej aparatury pomiarowej. W przypadku tego typu biosensorów optycznych, oba końce pojedynczej nici znakowane są z jednej strony znacznikiem fluorescencyjnym, zaś z drugiej znacznikiem wygaszającym fluorescencję. Struktura drugorzędowa typu „hairpin” powoduje, że oba te znaczniki znajdują się blisko siebie w regionie, który został zaprojektowany jako trzpień (krótkie komplementarne do siebie fragmenty wewnątrz ssDNA), powodując wygaszenie fluorescencji. Sekwencja dłuższego fragmentu sondy (nazywany pętlą) jest zaprojektowany w taki sposób, aby była komplementarna do wykrywanego fragmentu jednoniciowego DNA. Hybrydyzacja sondy i ssDNA będącego analitem prowadzi do zniszczenia struktury typu „hairpin” i oddalenia od siebie znakowanych zakończeń sondy skutkując wzrostem obserwowanej fluorescencji. Tego typu sondy bywają też nazywane „molekularnymi latarniami” [83].

Na podobnej zasadzie działają elektrochemiczne biosensory typu „hairpin”. Różnica polega na tym, że najczęściej tylko na jednym końcu sondy znajduje się znacznik redoks. W przypadku obecności w próbce analitu dochodzi do jego hybrydyzacji z sondą w warstwie receptorowej, przez co znacznik zwiększa swoją odległość od elektrody powodując zmniejszenie rejestrowanego natężenia prądu [84]. W przypadku elektrochemicznych biosensorów DNA ze znacznikami wykorzystuje się różnego rodzaju aktywne związki redoks

umożliwiający transfer elektronów pomiędzy znacznikiem a powierzchnią elektrody. Bezpośrednim sygnałem analitycznym w tego typu biosensorach jest pomiar sygnału elektrycznego, który jest generowany przez znacznik, co umożliwia detekcję DNA. Podczas procesu wyboru związku, który będzie pełnił funkcję znacznika, należy zwrócić uwagę na następujące czynniki: (i) nie powinien on reagować ani wpływać na aktywność warstwy receptorowej, (ii) wiązanie znacznika z pojedynczą lub podwójną nicią DNA powinno być możliwe w określonym miejscu w sposób selektywny, (iii) nie powinien on adsorbować się na powierzchni biosensora. Wymienione właściwości spełniają między innymi błękit metylenowy, błękit toluidynowy, oracet blue oraz Hoechst 33258 i dlatego są one często wykorzystywane przy tworzeniu i modyfikacji warstw receptorowych elektrochemicznych biosensorów DNA [85–87].

Inną techniką detekcji wykorzystywaną przy opracowywaniu biosensorów DNA jest elektrochemiluminescencja (ECL), łącząca zalety chemiluminescencji i elektrochemii. Wykorzystywane jest tu zjawisko emisji promieniowania powstałe w wyniku reakcji elektrochemicznej. Technika ta wymaga zastosowania odpowiedniego znacznika, który będzie wykazywał właściwości redoks i chemiluminescencję. Przykładem takiego związku jest kompleks rutenu  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$  [88].

### 2.3. Sposoby immobilizacji DNA

Immobilizacja DNA to proces polegający na unieruchomieniu nici kwasu deoksyrybonukleinowego na stałej powierzchni. Jest to kluczowy etap w celu uzyskania warstwy receptorowej biosensora. Dobranie odpowiedniej metody immobilizacji pozwala na uzyskanie warstwy receptorowej charakteryzującej się stabilnością, powtarzalnością pomiędzy poszczególnymi sensorami oraz odpowiednim ułożeniem przestrzennym sond, które zapewnia odpowiedni kontakt z analitem. Cząsteczki DNA mogą zostać unieruchomione na różnego rodzaju powierzchniach (np.: nanocząstki metaliczne, krzem, elektrody węglowe), jednak najczęściej w tym celu stosowane są elektrody złote.

Jedną z metod immobilizacji DNA na powierzchni elektrody jest adsorpcja. Jest to najprostszy sposób immobilizacji DNA, gdyż nie wymaga użycia dodatkowych reagentów ani modyfikacji sondy. Bazuje ona na oddziaływaniu elektrostatycznym pomiędzy grupami fosforanowymi DNA posiadającymi ładunek ujemny, a powierzchnią elektrody (może być modyfikowana w celu uzyskania dodatniego ładunku [89]). Zastosowanie adsorpcji jako sposobu immobilizacji DNA na powierzchni elektrody niesie ze sobą jednak wiele zagrożeń.

Przestrzenne rozmieszczenie DNA jest chaotyczne, gdyż każda nić oddziałuje elektrostatycznie z powierzchnią elektrody w losowych miejscach swojej nici. Ponadto ten sposób immobilizacji sprawia, że zmiany pH, temperatury lub siły jonowej roztworu, w którym znajduje się biosensor może powodować desorpcję sond z powierzchni elektrody. Przedstawione trudności dotyczące stabilności warstwy zaadsorbowanej na elektrodzie mogą w znaczny sposób wpływać na wydajność hybrydyzacji, stabilność i selektywność sensora.

Często stosowaną metodą do tworzenia warstwy receptorowej jest immobilizacja DNA przez kowalencyjne wiązanie do powierzchni elektrody. W tym celu konieczna jest modyfikacja DNA ugrupowaniami funkcyjnymi, które wiążą się z powierzchnią elektrody. Wiele grup funkcyjnych może zostać wykorzystanych do łączenia z powierzchnią elektrody, a ich wybór zależy głównie od materiału, z którego jest wykonana. Jednymi z najczęściej stosowanych są ugrupowania tiolowe (immobilizacja na powierzchni złota) i aminowe (immobilizacja z powierzchnia zmodyfikowaną poprzez grupy karboksylowe lub aldehydowe). Ten sposób unieruchomienia DNA na powierzchni elektrody prowadzi do powstania stabilnych, silnie związanych monowarstw. W przeciwieństwie do adsorpcji, metoda ta zapobiega niekontrolowanej desorpcji sond z powierzchni elektrody. Ponadto zapewnia ona korzystną dla poprawnego działania elektrody orientację przestrzenną sond. Immobilizacja DNA z grupą tiolową na złotej elektrodzie prowadzi do powstawania na jej powierzchni samoorganizujących się monowarstw (SAM, ang. *self-assembly monolayer*) [89, 90]. Ten sposób immobilizacji DNA zapewnia utworzenie wysoce stabilnej, uporządkowanej i silnie związanej z podłożem warstwy. W celu zapewnienia właściwej organizacji warstwy receptorowej biosensora stosuje się wypełniacze. Jednym z najczęściej stosowanych jest 1-merkaptto-6-heksanol (MCH). Związek ten posiada ugrupowanie tiolowe, dlatego doskonale wiąże się z powierzchnią elektrody złotej. Zastosowanie wypełniacza (nazywanego też środkiem blokującym) pozwala zredukować wpływ niespecyficznych oddziaływań w warstwie receptorowej oraz zwiększyć wydajność procesu hybrydyzacji [91].

Oddziaływanie pomiędzy streptawidyną a biotyną jest również wykorzystywane jako metoda immobilizacji DNA na powierzchni elektrody. W tym celu koniec nici DNA jest modyfikowany cząsteczką biotyny, która w sposób selektywny łączy się z streptawidyną dowiązaną do powierzchni elektrody. Jest to możliwe, gdyż biotyna wykazuje wyjątkowo silne powinowactwo do streptawidyny, tworząc z nią kompleks o sile wiązania porównywalnej do wiązania kowalencyjnego. Ten sposób immobilizacji zapewnia silne związanie DNA z elektrodą, które wykazuje odporność na zmianę temperatury, pH i dodatek rozpuszczalników organicznych [92].

Elektrochemiczne biosensory DNA posiadają szereg zalet, które wyróżniają je na tle innych urządzeń tego typu:

- selektywność – poprzez zastosowanie w warstwie receptorowej sondy o określonej sekwencji biosensory DNA zapewniają możliwość rozróżnienia pomiędzy jednoniciowymi DNA oraz selektywne wykrywanie cząsteczek o komplementarnej sekwencji nukleotydów,
- czułość oraz granica wykrywalności – elektrochemiczne biosensory DNA wykazują dużą czułość na zmiany stężenia analitu oraz umożliwiają wykrywanie niskich stężeń analitów,
- szybkość detekcji – zastosowanie technik woltamperometrycznych takich jak SWV umożliwia wykonanie pomiarów w bardzo krótkim czasie, który razem z procesem hybrydyzacji pomiędzy sondą a analitem może zająć zaledwie kilka minut,
- niski koszt – zastosowanie przetworników elektrochemicznych umożliwia wykonanie wielu urządzeń w krótkim czasie, przy stosunkowo niewielkich nakładach finansowych,
- możliwość miniaturyzacji – układy trójelektrodowe stosowane w technikach woltamperometrycznych nadają się do miniaturyzacji w produkcji przemysłowej, dlatego konstruowane biosensory DNA mogą być wykorzystane do tworzenia niewielkich, przenośnych urządzeń diagnostycznych.

Przedstawione zalety elektrochemicznych biosensorów DNA sprawiają, że znajdują one coraz więcej zastosowań w różnych dziedzinach życia. Szczególnie istotnym wydaje się ich wykorzystanie w diagnostyce chorób, szczególnie chorób zakaźnych. Elektrochemiczne biosensory DNA zostały wykorzystane do wykrywania patogenów zarówno wirusowych jak i bakteryjnych. Biorąc pod uwagę zalety tego typu czujników, należy zwrócić szczególną uwagę na olbrzymi potencjał ich integracji z urządzeniami typu Lab on a chip. Zastosowanie biosensorów DNA jako elementu odpowiedzialnego za selektywne wykrywanie fragmentów DNA patogenów pozwala na konstruowanie tanich, przenośnych urządzeń, które mogą przyczynić się do walki z wieloma chorobami. Mogą być one szczególnie wartościowe w rejonach świata charakteryzujących się niskim dostępem do usług medycznych oraz narażonych na szybkie i niekontrolowane rozprzestrzenianie się chorób zakaźnych. Elektrochemiczne biosensory DNA zostały również wykorzystane w celu wykrywania mutacji powiązanych z chorobami genetycznymi oraz w szybkiej diagnostyce chorób nowotworowych. Inne zastosowania tego typu urządzeń obejmują również badania żywności i leków, badania

środowiskowe oraz różnego rodzaju badania naukowe w dziedzinie biotechnologii, medycyny, kryminologii oraz innych.

### 3. Błonica i metody jej wykrywania

Błonica jest wysoce zakaźną chorobą wywoływaną przez toksyczny szczep maczugowca błonicy (*Corynebacterium diphtheria*). Okres jej inkubacji jest wyjątkowo krótki i wynosi zazwyczaj od 2 do 5 dni [93]. Ponadto charakteryzuje się ona wysoką śmiertelnością. Szczepienia ochronne przeciw błonicy zostały wprowadzone w pierwszej połowie XX wieku i przyczyniły się znacznego spadku zachorowań. Jeszcze w latach 20tych XX wieku w Stanach Zjednoczonych diagnozowano około 200 tysięcy przypadków rocznie, podczas gdy obecnie są to wyłącznie pojedyncze przypadki [94]. Mimo wyjątkowo skutecznego sposobu prewencji jakim są szczepienia, w wielu rejonach świata choroba ta pozostaje poważnym problemem. Jej ogniska pojawiają się zazwyczaj w krajach o niskim poziomie wyszczepialności oraz na terenach ogarniętych konfliktami zbrojnymi. W 2019 roku liczba przypadków zachorowań na błonicę przekroczyła 22 tysiące – jest to czterokrotnie więcej niż średnia z lat 2005-2015 [95].

Diagnostyka błonicy opiera się na rozpoznaniu objawowym przez lekarza, a także na badaniach laboratoryjnych. Jedną z podstawową metod pozwalającą wykryć zjadliwy szczep maczugowca błonicy jest test Eleka [96]. Polega on na nasączeniu bibuły antytoksyną błoniczą, którą umieszcza się na dnie płytki agarowej, na której hodowane są bakterie pochodzące z wymazu od pacjenta. Inkubacja prowadzona jest przez 24 godziny w temperaturze 37°C, po której następuje obserwacja płytki pod kątem obecności linii precypitacyjnej utworzonej przez wiązanie przeciwciała z antygenem. Procedura ta jest jednak czasochłonna i może trwać nawet kilka dni, a szybka diagnoza w przypadku błonicy jest kluczowa dla zdrowia i życia pacjenta oraz zapobieganiu rozprzestrzeniania się choroby. Błonica na wczesnym etapie choroby daje niespecyficzne objawy, co może prowadzić do błędnej diagnozy.

Technikami, które mogą być wykorzystane do diagnozy to testy enzymatyczne lub spektrometria mas z desorpcją laserową z udziałem matrycy z analizatorem czasu przelotu (MALDI-TOF). Są to jednak techniki uzupełniające, gdyż nie potwierdzają wytwarzania toksyny błoniczej przez wykrywany szczep bakterii [97]. Ponadto podobnie jak test Eleka wymagają one czasochłonnej inkubacji w kontrolowanych warunkach.

Na przestrzeni ostatnich lat prowadzone były nieliczne badania dotyczące zastosowania biosensorów związanych z chorobą jaką jest błonica. Opracowana została między innymi sonda pozwalająca na wykrywanie toksyny błoniczej w czasie poniżej 1 godziny [98]. Działanie



wspomnianej sondy bazowało na oddziaływaniu nanocząsteczek złota modyfikowanych przeciwciałami monoklonalnymi a toksyną błoniczą. Sondę tę wykorzystano do opracowania biosensora z wykorzystaniem zlokalizowanego powierzchniowego rezonansu plazmonowego (LSPR). Granica wykrywalności toksyny błoniczej z wykorzystaniem opracowanego biosensora wynosiła 10 ng/mL.

Opracowany został również biosensor w celu wykrywania przeciwciał przeciw toksynie błoniczej [99]. Jest to o tyle istotne, że mimo powszechnych w większości krajów szczepień, z czasem odporność przeciwko błonicy maleje prowadząc do możliwości pojawienia się nowych ognisk choroby [100]. Do stworzenia biosensora wybrane zostały dwa fragmenty (epitopy) toksyny błoniczej łączące się z przeciwciałem, tworząc peptyd bi-epitopowy. Posłużył do stworzenia warstwy receptorowej immunosensora na powierzchni elektrody. Pomiar z wykorzystaniem opracowanego biosensora prowadzono za pomocą pośredniego testu immunologicznego, stosując drugorzędowe przeciwciało związane z fosfatazą alkaliczną. W obecności difosforanu hydrochinonu (HQ) fosfataza alkaliczna prowadziła do wytworzenia elektroaktywnej formy HQ, która była następnie wykrywana za pomocą woltamperometrii fali prostokątnej (SWV). Granica wykrywalności przeciwciał przy użyciu opracowanego biosensora wynosiła  $5 \cdot 10^{-6}$  IU/mL.

Przytoczone powyżej informacje wskazują, że choroba jaką jest błonica nadal pozostaje w kręgu zainteresowań ośrodków badawczych. Warto jednak zaznaczyć, że wymienione biosensory nie zostały opracowane w celu bezpośredniego wykrywania zjadliwego szczepu błonicy. Pierwszy z nich umożliwiał wykrywanie toksyny błoniczej, drugi zaś posłużył do oznaczania przeciwciał przeciw toksynie błoniczej.

Pojawienie się światowej pandemii COVID-19 wywołanej przez koronawirusa SARS-CoV-2 wyraźnie pokazało jak groźne potrafią być choroby zakaźne w zglobalizowanym świecie. Z tego powodu niezwykle istotne jest podjęcie starań by nie dopuścić do powrotu znanych, ale nadal śmiertelnie groźnych chorób, zarówno poprzez systemowe szczepienia, jak i opracowanie szybkiego i wydajnego sposobu diagnostyki.

## II. Metodyka

### 1. Reagenty

- 6- merkapto-1-heksanol (MCH) (97%) – Sigma Aldrich
- dietyloditiokarbaminian sodu (DETC) · 3 H<sub>2</sub>O (>95%) – Sigma Aldrich
- 2-amino-2-hydroksymetyl-1,3-propanodiol (Tris) – Sigma Aldrich
- kwas etylenodiaminotetraoctowy (EDTA) (≥98,5%) – Sigma Aldrich
- kwas chlorowodorowy (HCl) (36,5-38,0%) – Sigma Aldrich
- kwas siarkowy (VI) (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (95.0–98.0%) – Sigma Aldrich
- dimetylosulfotlenek (DMSO) (≥99,5%) – Sigma Aldrich
- wodorotlenek sodu (NaOH) (≥97%) – Sigma Aldrich
- chlorek sodu (NaCl) (≥99%) – Sigma Aldrich
- chlorek potasu (KCl) (≥99%) – Sigma Aldrich
- żelazicyjanek potasu (K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>) (≥99%) – Sigma Aldrich
- żelazocyjanek potasu (K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>) (≥98,5%) – Sigma Aldrich
- diwodorofosforan potasu (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (≥99%) – Sigma Aldrich
- kwas borowy – Merck (nr kat. STBH1850)
- nadtlenuk wodoru (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (30%) – POCh
- chlorek magnezu (MgCl<sub>2</sub>) · 6 H<sub>2</sub>O (≥98%) – Fluka Analytical
- N,N,N,N'-tetrametyloetylenodiamina (TEMED) (~99%) – Bujno Chemicals
- N,N'-metylenobisakrylamid (BIS) – Bujno Chemicals
- akrylamid (AA) (≥99%) – Bujno Chemicals
- nadsiarczan amonu (APS) – Bujno Chemicals
- tlenek glinu (proszek): wielkości ziarna 1 μm, 0,3 μm, 0,05 μm – Buehler
- agaroz – MP Biomedicals™.
- zestaw odczynników do przeprowadzenia PCR (Master Mix Kit) – QIAGEN.
- bromek etydyiny (~95%) – Sigma Aldrich
- polimeraza Phire Hot Start II – ThermoFisher Scientific
- barwnik DNA do elektroforezy żelowej (DNA Loading Dye Solution) – ThermoFisher Scientific
- marker (drabinka) DNA do elektroforezy żelowej – ThermoFisher Scientific
- Startery do reakcji PCR – DNA-Gdańsk

Sekwencje starterów:

Forward (F): 5'- CAA TCA TCG TCA TAA TTT CCT TGT GTA CC -3'

Reverse (R): 5'- GAA AAC TTT TCT TCG TAC CAC GGG ACT AA -3'

- Fragment genu toksycznego szczepu błonicy (cDNA) o sekwencji:  
5'- CAA TCA TCG TCA TAA TTT CCT TGT GTA CCA GAT TTT GGC TTT TGT  
ATA CCT TTT TGA ATG GAA TCT ACA TAA CCA GGT TTA GTC CCG TGG  
TAC GAA GAA AAG TTT TC -3' został otrzymany od prof. dr hab. Aleksandry Zasady  
z *Zakładu Badania Surowic i Szczepionek, NIZP PZH -PIB*.

W celu zapewnienia odpowiedniej czytelności, w niniejszej pracy zostały wprowadzone dodatkowe oznaczenia:

cDNA – jest to jednoniciowe DNA (ssDNA) o sekwencji nukleotydów komplementarnej do sekwencji sondy biosensora. Na poszczególnych etapach prowadzonych badań wykorzystywane było cDNA, które pochodziło z różnych źródeł.:

cDNA-W – cDNA wzorcowe, oczyszczone za pomocą HPLC, otrzymane od prof. dr hab. Aleksandry Zasady z *Zakładu Badania Surowic i Szczepionek, NIZP PZH -PIB*.

cDNA-PT – cDNA uzyskane w wyniku badań, będące produktem reakcji prowadzonej w termocyklerze

cDNA-PM – cDNA uzyskane w wyniku badań, będące produktem reakcji prowadzonej w mikrosystemie

Należy podkreślić, że wszystkie te oznaczenia odnoszą się do tego samego fragmentu jednoniciowego DNA. Oznaczenia te pozwalają jednak w łatwy sposób wskazać w jaki sposób otrzymano dany materiał do badań.

- Sondy DNA – Metabion

Sekwencje sond (AttoMB2 – błękit metylenowy kowalencyjnie związany z sondą):

TOX1: 5' –thiol - A tataacct GAA AAC TTT TCT TCG TAC CAC GGG ACT AAA  
CCT GGT TAT GTA GAT TCC ATT CAA AAA GGT ATA – AttoMB2 - 3'

TOX2: 5' –tiol - A tataacc GAA AAC TTT TCT TCG TAC CAC GGG ACT AAA CCT  
GGT TAT GTA GAT TCC ATT CAA AAA GGT ATA – Atto MB2 -3'

TOX3: 5' –tiol - A ggaatc GAA AAC TTT TCT TCG TAC CAC GGG ACT AAA  
CCT GGT TAT GTA GAT TCC – Atto MB2 -3'

TOX4: 5' –tiol - A acataa GAA AAC TTT TCT TCG TAC CAC GGG ACT AAA  
CCT GGT TAT GT– Atto MB2 -3'

## 2. Roztwory

- Roztwór immobilizacyjny :1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; pH 4,5
- Roztwór hybrydizacyjny (podstawowy): 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$ ; pH 7,0
- Roztwór pirania:  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{SO}_4$  w stosunku 3:1
- $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$  w 20 mM PBS; pH 7,4
- Bufor do elektroforezy (1x TBE): 0,1 M Tris, 0,1 M kwas borowy, 2 mM EDTA; pH 8.3

Odpowiednie pH roztworów było uzyskiwane poprzez dodatek roboczych roztworów NaOH lub HCl, których stężenia mieściły się w granicach 1 – 10%.

## 3. Materiały

- Poli(metakrylan metylu) (PMMA) bezbarwne formatki o grubościach w zakresie 4 – 7 mm – Evonik GS
- Folie poliestrowe: hydrofilowa 9984, dwustronnie klejąca 9965 – 3M
- Kauczuk fluorowy Viton™ – GG Trading
- PDMS (184 Silicone Elastomer Sylgard zestaw: prepolimer, zestaw sieciujący) – DOW CORNING

## 4. Aparatura

Pomiary woltamperometryczne były wykonywane przy użyciu stacji elektrochemicznej CHI 660A oraz CHI 1040A (CH Instruments). Wykorzystane zostały następujące techniki pomiarowe:

- Woltamperometria cykliczna (CV) – szybkość skanowania 0,1 V/s
- Woltamperometria fali prostokątnej (SWV) – przy amplitudzie impulsu 25 mV, przyroście o 4 mV i częstotliwościach od 15 Hz do 300 Hz

- Woltamperometria prądu zmiennego (ACV) – parametry pomiaru jak w SWV

Pomiary woltamperometryczne wykonywane były przy użyciu trójelektrodowego układu pomiarowego składającego się z:

- Elektrody pracującej – złotej elektrody dyskowej (GDE) (CH Instruments)
- Elektrody odniesienia – Ag/AgCl/1,0 mol·L<sup>-1</sup> KCl (Mineral)
- Elektrody pomocniczej – drut złoty (Sigma Aldrich)

Wykorzystano też przetworniki trójelektrodowe AC1.W1.R2 i PAC1.W1.R2 zakupione w BVT Technologies (Czechy).

Pomiary w podwyższonej temperaturze prowadzono z wykorzystaniem inkubatora z chłodzeniem z modułem Peltiera IPP30 (Mettler).

Reakcje PCR przeprowadzono w termocyklerze Mastercycler AG 22331 (Eppendorf).

Zbiornik do elektroforezy poziomej w żelach agarozowych z BIO-RAD został użyty do rozdzielania produktów reakcji PCR.

Wizualizacja po elektroforezie została przeprowadzona z wykorzystaniem transiluminatora UV (Hofer).

Ploter laserowy Universal Model VLS 2.30 z dodatkową nakładką pozwalającą zwiększyć rozdzielczość.

Mikrofrezarka CNC Datron Model NEO+

Zestaw frezów walcowo-czołowych, jedno oraz dwupiórowych o średnicach w zakresie od 0,25mm do 5mm.

## 5. Amlifikacja fragmentu genu zjadliwego szczepu błonicy za pomocą standardowej reakcji PCR

Standardowa reakcja PCR w celu amplifikacji DNA została przeprowadzona w termocyklerze Mastercycler AG 22331. Całkowita objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 20 µL. Skład mieszaniny reakcyjnej:

- 10 µL Hot Start Taq Master Mix, zawierający polimerazę Hot Start Taq, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, KCl
- 0,5 µL obu ze starterów o stężeniu 10 mM
- 2,5 µL matrycowego DNA (DNA wyizolowane z toksycznego szczepu maczugowca błonicy)

- 6,5  $\mu\text{L}$  sterylnej wody dejonizowanej wolnej od enzymów

Reakcję prowadzono w termocyklerze rozpoczynając od ogrzewania mieszaniny przez 15 minut w 95 °C. Następnie przeprowadzono 35 cykli, na które składało się kolejno:

- Denaturacja: 94 °C przez 45 sekund
- Hybrydyzacja: 60 °C przez 45 sekund
- Elongacja: 72 °C przez 45 sekund

Ostatni etap elongacji został przedłużony do 5 minut. Parametry te zostały zastosowane zgodnie z zaleceniem producenta. Produkty reakcji zostały następnie rozdzielone przy pomocy elektroforezy na 2% żelu agarozowym.

## 6. Amplifikacja fragmentu genu zjadliwego szczepu błonicy za pomocą asymetrycznej reakcji PCR

Celem przeprowadzania asymetrycznej reakcji PCR było uzyskanie jednoniciowego DNA (ssDNA) o sekwencji komplementarnej do sekwencji sondy zaimmobilizowanej na elektrodzie sensora. Aby uzyskać ssDNA, należy do reakcji aPCR użyć w nadmiarze jednego ze starterów. W trakcie kolejnych cykli, jeden ze starterów zostanie wyczerpany, a ten dodany w nadmiarze będzie wydłużany do oczekiwanego produktu. Należy zwrócić uwagę, że po wyczerpaniu jednego ze starterów, będzie amplifikowana forma jednoniciowego DNA (ssDNA), przy czym wzrost ilości ssDNA przebiega wolniej w postępie arytmetycznym [101].

Asymetryczna reakcja PCR w celu amplifikacji DNA została przeprowadzona w termocyklerze Mastercycler AG 22331. Całkowita objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 40  $\mu\text{L}$ . Skład mieszaniny reakcyjnej:

- 20  $\mu\text{L}$  Hot Start Taq Master Mix, zawierający polimerazę Hot Start Taq, dNTPs,  $\text{MgCl}_2$ , KCl
- 0,25  $\mu\text{L}$  starteru Forward o stężeniu 10 mM
- 1,0  $\mu\text{L}$  starteru Reverse o stężeniu 10 mM
- 4,0  $\mu\text{L}$  matrycowego DNA (DNA wyizolowane z toksycznego szczepu maczugowca błonicy)
- 14,75  $\mu\text{L}$  sterylnej wody dejonizowanej wolnej od enzymów

Zarówno parametry reakcji, czyli początkowe ogrzanie mieszaniny, ilość poszczególnych cykli, ich długość oraz temperatury, jak i rozdzielanie produktów reakcji przeprowadzono w

sposób analogiczny do standardowej reakcji PCR opisanej wcześniej. Sposób prowadzenia reakcji różnił się dłuższym czasem elongacji ostatniego cyklu, który wynosił 10 minut.

## 7. Procedura przygotowania warstwy receptorowej biosensora

Przygotowanie biosensora inicjowało polerowanie złotych elektrod dyskowych (elektroda pracująca) proszkiem tlenku glinu o średnicy ziarna 1  $\mu\text{m}$ , a następnie proszkiem tlenku gliny o średnicy 0,05  $\mu\text{m}$ . Elektrody przemyto wodą, a następnie poddawano działaniu ultradźwięków w wodzie demineralizowanej przez 15 minut. Następnie na powierzchnię każdej elektrody nakraplano roztwór piranii i pozostawiono ją na 5 minut, po czym przemywano ją wodą demineralizowaną. Elektrode skanowano elektrochemicznie w 1M NaOH, 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> oraz 0,1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> w zakresie potencjałów -0,5 do 1,7 V aż do uzyskania voltamperogramu cyklicznego charakterystycznego dla czystego złota. Następnie elektrody przemywano wodą demineralizowaną. Tak przygotowaną elektrodę pracującą skanowano za pomocą CV w buforze hybrydazyjnym, stosując zakres potencjału wykorzystywany w dalszych doświadczeniach. W celu unieruchomienia na powierzchni elektrod sond nakraplano na nie bufor immobilizacyjny zawierający 0,2  $\mu\text{M}$  jednej z sond i pozostawiono go na 30 sekund, po czym elektrody były przepłukiwane buforem immobilizacyjnym. Następnie pozostawiano elektrody w buforze immobilizacyjnym zawierającym 2 mM MCH na 24 godziny. Po tym czasie elektrody przepłukiwano roztworem immobilizacyjnym oraz wodą demineralizowaną, a następnie pozostawiano ją w roztworze hybrydazyjnym na 10 minut. Za pomocą biosensorów wytwarzanych zgodnie z powyższą procedurą prowadzono badania przedstawione w niniejszej pracy.

## 8. Elektroforeza żelowa

Elektroforeza w żelu agarozowym prowadzona w odpowiednich warunkach jest prostą metodą pozwalającą na rozdzielenie fragmentów DNA ze względu na długość łańcucha. Poprzez dodanie do rozdzielanych mieszanin czynników interkalujących, możliwa jest późniejsza wizualna detekcja fragmentów DNA. W prowadzonych badaniach został wykorzystano popularnie stosowany bromek etydy, który łącząc się z DNA, zwiększa wielokrotnie intensywność fluorescencji. Zastosowano również mieszaninę zawierającą fragmenty DNA o znanych długościach łańcucha (tzw. drabinka DNA), co pozwalało na przybliżone określenie długości łańcuchów DNA w analizowanych próbkach.

Rozdzielanie produktów reakcji PCR prowadzono w 3% żelu agarozowym, który został przygotowany w 38 ml buforu TBE, poprzez dokładne wymieszanie składników i podgrzanie do temperatury nieprzekraczającej 50°C przez 2 minuty. Do ostudzonego do temperatury pokojowej żelu dodano 14  $\mu\text{L}$  bromku etydyny uzyskując stężenie czynnika interkalującego na poziomie 0,05%. Tak przygotowany żół został wleany do formy i pozostawiony do żelowania. Żel następnie przeniesiono do aparatu do elektroforezy. Do odpowiednich dołków w żelu wprowadzono odpowiednie próbki zawierające DNA (mieszanki poreakcyjne PCR, oczyszczony analit) oraz drabinkę DNA, czyli standardową mieszaninę zawierającą fragmenty DNA o określonych długościach. Komora aparatu do elektroforezy wraz z żelem została następnie zalana buforem TBE.

Skład próbki zawierającej poreakcyjne DNA:

- 6  $\mu\text{L}$  mieszaniny poreakcyjnej
- 4  $\mu\text{L}$  buforu TBE

Skład mieszaniny zawierającej marker DNA:

- 5  $\mu\text{L}$  drabinki DNA
- 3  $\mu\text{L}$  DNA loading bufor
- 2  $\mu\text{L}$  buforu TBE

Proces elektroforezy prowadzono z zastosowaniem napięcia 100 V przez 90 minut. Po zakończeniu procesu żół został delikatnie wyjęty z aparatu elektroforezy i przeniesiony do aparatu Alpha Innotech. Pod wpływem promieniowania ultrafioletowego (zastosowano dwie długości fali: 302 nm i 365 nm) bromek etydyny fluoryzował, co pozwalało na wizualizację wyników na wykonanych zdjęciach.

Proces elektroforezy wraz z detekcją optyczną prowadzono w celu wykrycia produktów reakcji PCR prowadzonych zarówno w opracowanych mikroukładach, jak i w standardowym termocyklerze. Metoda ta pozwalała również ocenić długość fragmentów DNA będących produktem reakcji, co w poszczególnych przypadkach było podstawą do potwierdzenia lub zaprzeczenia skuteczności prowadzonej reakcji PCR.



### III. Część doświadczalna

#### 1. Mikrosystemy PCR

Mikrosystemy PCR są zminiaturyzowanymi urządzeniami, które umożliwiają przeprowadzenie łańcuchowej reakcji polimerazy. Stanowią one alternatywę dla tradycyjnie wykorzystywanych termocyklerów. W tym rozdziale zaprezentowane zostaną opracowane mikrosystemy, które zostały wykonane z zastosowaniem różnego rodzaju materiałów, technik ich obróbki, geometrii mikrostruktur oraz sposoby prowadzenia reakcji.

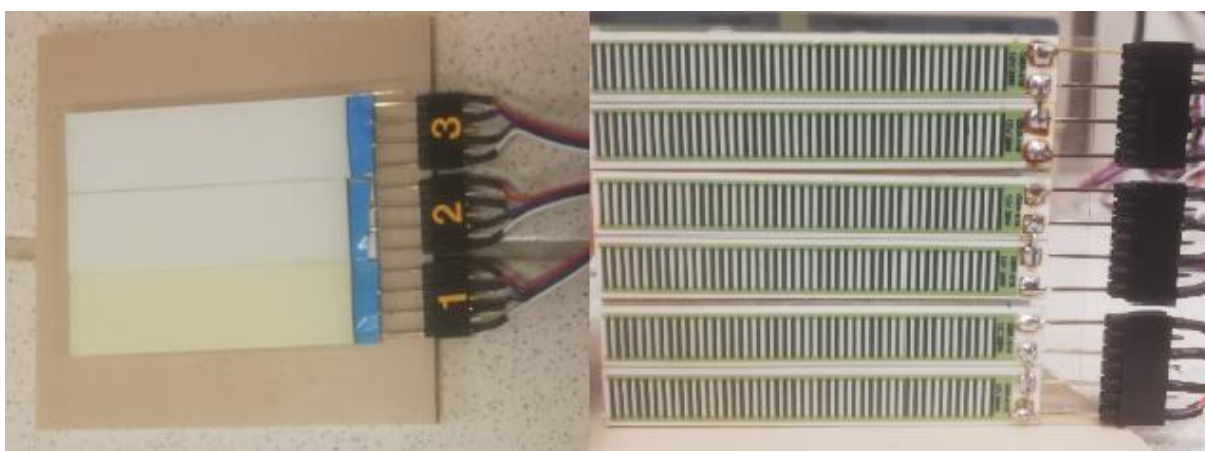
Opracowanie mikrosystemu PCR podyktowane było różnego rodzaju motywacjami. Niewielkie objętości reagentów wykorzystywanych w mikrosystemach wiążą się z małą bezwładnością cieczy, co prowadzi do bardzo szybkiej i skutecznej wymiany energii. Jak zostało wspomniane w części literaturowej, szybkość reakcji PCR jest ograniczona przez czas potrzeby na zmianę temperatury mieszaniny reakcyjnej. Z tego powodu, jednym z głównych założeń badań było skonstruowanie mikrosystemu przepływowego, który umożliwiłby amplifikację DNA w sposób szybszy niż tradycyjnie wykorzystywany termocykler. Ponadto mikrosystemy tego typu mogą stanowić pożyteczne narzędzie jako elementy systemów diagnostycznych, które ze względu na niewielkie rozmiary oraz opracowane elementy automatyzacji mogą być potencjalnie wykorzystane jako urządzenia typu POC w miejscach oddalonych instytucji ochrony zdrowia. Możliwość automatyzacji oraz integracja z biosensorem DNA jako elementem detekcyjnym umożliwia łatwą obsługę urządzenia nawet przez niewykwalifikowany personel.

Przy opracowywaniu mikrosystemów PCR należy się jednak mierzyć z wieloma wyzwaniami. Jednym z nich jest dostarczenie energii do układu w celu zapewnienia odpowiedniej temperatury. Mogą pojawić się również problemy związane z doбором odpowiednich materiałów konstrukcyjnych urządzeń. Należy zwrócić uwagę, aby wykazywały one odpowiednią wytrzymałość termiczną, nie uwalniały niepożądanych substancji do układu oraz nie prowadziły do zatrzymania reakcji np. poprzez adsorpcje składników mieszaniny reakcyjnej. W kontekście mikrosystemów przepływowych niezwykle istotne jest generowanie przepływu o odpowiednich, jakościowych parametrach oraz kontrolowanie tego przepływu, zwłaszcza w warunkach podwyższonych temperatur (zwiększone parowanie, które prowadzi do zwiększenia ciśnienia wewnątrz mikrokanałów mogące powodować cofanie roztworów). Ponadto materiały konstrukcyjne mikrosystemów oraz sposoby ich obróbki powinny być dobrane w taki sposób, aby możliwa była ich integracja z innymi elementami urządzenia.

Ważnym elementem w prowadzonych badaniach było również opracowanie dodatkowych elementów mikrosystemów, takich jak mikropompy oraz mikrozawory, które decydują o właściwościach użytkowych mikrosystemów. Elementy te służą do wymuszania oraz kontrolowania przepływu cieczy w mikrosystemach i są podstawowymi elementami umożliwiającymi automatyzację reakcji amplifikacji materiału genetycznego w warunkach przepływowych. Opracowane mikrosystemy zostały wykorzystane do przeprowadzenia szeregu reakcji PCR.

## 2. System grzewczy

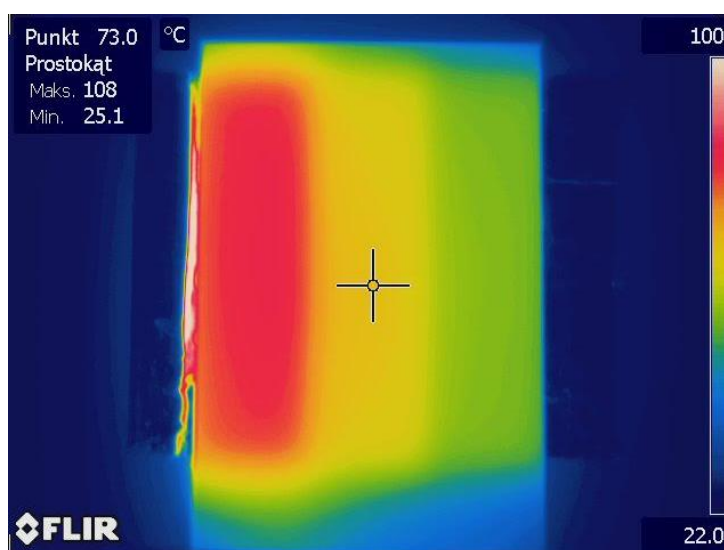
Kluczowym elementem urządzenia umożliwiającym przebieg reakcji PCR jest system grzewczy, który zapewnia odpowiednią temperaturę niezbędną do zajścia reakcji. W prowadzonych badaniach wykorzystano system grzewczy, którego podstawą, jak już wspomniano, były trzy pary rezystorów grzejnych na podłożu ceramiczny. Każda z par odpowiadała za utrzymanie ustalonej, stałej temperatury dla pojedynczej strefy odpowiadającej danemu etapowi reakcji PCR: strefa denaturacji - 94°C, strefa przyłączenia starterów - 55°C oraz strefa elongacji - 72°C. Zastosowany system grzewczy posiadał możliwość kontroli temperatury uzyskiwanej przez poszczególne pary grzałek dzięki platynowym czujnikom Pt 100 (Swema). Na powierzchni każdej pary grzałek umieszczona została aluminiowa płytki, która pozwalała na równomierny rozkład temperatury na całej powierzchni pary grzałek. System grzałek został przedstawiony na Rysunku 13. Mikrosystemy były umieszczone na grzałkach w taki sposób, aby poszczególne strefy temperaturowe odpowiadały zaprojektowanym im fragmentom geometrii mikrokanalów. Warto zwrócić uwagę, że pomiędzy systemem grzałek a mikrokanalami z mieszaniną reakcyjną znajduje się warstwa



Rysunek 13: System trzech par połączonych grzałek wykorzystywanych do zwiększenia temperatury w mikrosystemie.

stanowiąca podstawę mikrosystemu (w przypadku układu hybrydowego PDMS/szkło jest to szklana płytką) i to ona jest bezpośrednio podgrzewana. Dlatego też wskazania temperaturowe samej grzałki nie mogą stanowić podstawy ustalania temperatury w mikroukładzie, a stanowią jedynie jej przybliżenie. Dlatego należy uwzględnić straty ciepła wynikające z przewodzenia ciepła przez warstwę szkła oraz PDMS oraz oddziaływania poszczególnych stref wzajemnie na siebie. W celu uzyskania odpowiedniej temperatury i powiązania wskazań grzałki z warunkami realnie panującymi w mikrosystemie zastosowano dwa podejścia:

1. Pomiary kamerą termowizyjną. Pozwoliły one na zobrazowanie różnic temperaturowych poszczególnych stref. Metoda ta cechuje się jednak dużą niedokładnością, gdyż kamera dokonuje pomiaru temperatury zewnętrznej powierzchni warstwy PDMS i nie odzwierciedla warunków panujących w mikrokanalach. Przykładowy pomiar temperatury powierzchni mikroukładu za pomocą kamery termowizyjnej został przedstawiony na Rysunku 14.
2. Pomiary wykonane za pomocą platynowego czujnika Pt 100. Platynowy czujnik został umieszczony pomiędzy szklaną płytką a warstwą PDMS, które nie zostały ze sobą trwale połączone. Wskazania tak umieszczonego czujnika odpowiadały w znacznie większym stopniu faktycznym warunkom w poszczególnych strefach temperaturowych. Niemniej jednak należy podkreślić, że dokładna temperatura w mikrosystemie może nieco odbiegać od mierzonej za pomocą czujnika. Jednak reakcja PCR pozwala na pewien margines błędu wynoszący zazwyczaj  $\pm 1^\circ\text{C}$ .



Rysunek 14: Pomiar temperatury powierzchni mikrosystemu za pomocą kamery termowizyjnej. Na rysunku widoczny jest podział mikrosystemu na trzy strefy temperaturowe, reprezentowane przez różne kolory.

Pomiary za pomocą platynowego czujnika potwierdziły, że wskazania temperatury dla grzałki przedstawiają wartości wyższe niż wskazania temperatury czujnika znajdującego się pomiędzy warstwą szkła a PDMS, co potwierdza występowanie znacznych strat ciepła mogących mieć znaczny wpływ na efektywność reakcji. Jak można było przewidzieć, różnice we wskazaniach temperatur pomiędzy czujnikami były największe dla grzałki odpowiadającej etapowi denaturacji. Wyznaczone w powyższy sposób dane pozwoliły skalibrować temperatury ustalane bezpośrednio na grzałkach w taki sposób aby finalnie, w mikrokanale panowały warunki niezbędne do zajścia poszczególnych etapów reakcji. Ustalono również parametry grzałki odpowiadające trzem temperaturom potrzebnym do zajścia poszczególnych etapów reakcji PCR, zostały one przedstawione w Tabeli 2. Należy zaznaczyć, że wartości te zostały ustalone dla mikrosystemu o określonej wysokości warstwy PDMS (5 mm). Z tego powodu konieczne było opracowanie procedury wytwarzania mikrosystemów tego typu o powtarzalnej grubości warstwy PDMS.

Tabela 2: Odczyty temperaturowe dla kamery termowizyjnej oraz czujnika Pt 100, wykonane podczas ustalania parametrów systemu grzewczego.

Wskazania czujnika Pt 100 dla grzałki [°C]	Wskazania czujnika Pt 100 dla mikrosystemu [°C]	Pomiar temperatury kamerą termowizyjną [°C]
101	94	86
75	72	68
56	55	52

Zapewnienie odpowiedniej temperatury jest kluczowe dla prawidłowego przebiegu reakcji PCR. W niniejszej pracy zaproponowano dostarczenie energii cieplnej za pomocą systemu sześciu rezystorów grzejnych podzielonych na 3 pary. Każda para odpowiadała za utrzymanie określonej temperatury w danej strefie mikrosystemu. Modułowe podejście do systemu grzewczego zapewniło dużą elastyczność w prowadzonych badaniach. Ułożenie stref temperaturowych mogło być modyfikowane, a system grzewczy być wykorzystywany wielokrotnie. Podejście to wymuszało jednak częste pomiary temperatury, gdyż każda zmiana konstrukcji układu, sposobu prowadzenia reakcji, a nawet warunków zewnętrznych takich jak temperatura otoczenia mogła spowodować różnice w ilości energii cieplnej dostarczanej do mikrosystemu. Stosowano dwa sposoby kontroli temperatury wewnątrz mikroukładu: pomiary kamerą termowizyjną oraz pomiary z wykorzystaniem czujnika Pt 100, z pośród których druga metoda charakteryzowała się większą dokładnością pomiarów.

### 3. Hybrydowy mikrosystem PCR PDMS/szkło

Badania rozpoczęto od opracowania mikrosystemu wykonanego z dwóch materiałów, które następnie były ze sobą trwale łączone. Wykorzystano w tym celu PDMS oraz szkło, ze względu na dostępność materiałów, aparatury oraz doświadczenie zdobyte w pracy z tymi materiałami. Ponadto PDMS jest często wykorzystywany do tworzenia mikrosystemów typu LOC, szczególnie na etapie prototypowania. Metoda odlewu została opisana w Części I, Rozdziale 3.2.3. Polega ona na odwzorowaniu za pomocą matrycy (nazywanej też pieczętką lub stemplem) mikrostruktur w płynnym materiale, lub następnie ulega utwardzeniu. W niniejszej pracy metodę tę wykorzystano w celu uzyskania warstw mikrosystemów z PDMS, które następnie były łączone z podłożem szklanym.

#### *Wykonanie matrycy z filmu kapilarnego*

Podstawowym narzędziem do wykonania mikrosystemu metodą odlewu bezpośredniego jest odpowiednio przygotowana matryca. Matryca, nazywana często pieczętką lub stemplem (ze względu na powierzchniowe podobieństwo wizualne) stanowi negatywowe odwzorowanie wytwarzanego elementu. Matryce wykonano przy pomocy dwóch technologii: metodą fotolitografii z użyciem filmu kapilarnego oraz metodą mikrofrezowania w PMMA. Przygotowanie matrycy z filmu kapilarnego na szklanym podłożu wymagało wykonania ich w pomieszczeniu z ograniczonym dostępem do światła widzialnego, gdyż wykorzystywany materiał zmniejszał swoją rozpuszczalność pod wpływem promieniowania elektromagnetycznego w zakresie UV.

Film kapilarny stanowi warstwa światłoczułej emulsji umieszczona na odpowiednim nośniku, najczęściej jest to cienka folia poliestrowa. Film kapilarny w takiej formie jest bardzo elastyczny, co utrudnia wykonanie w nim mikrostruktur o wysokiej jakości, dlatego konieczne jest jego usztywnienie. W tym celu zastosowano szklane płytki o wymiarach 60mm x 90mm, do których przymocowano folię z filmem kapilarnym za pomocą taśmy dwustronnie klejącej. Na tym etapie istotne było staranne dopasowanie do siebie warstw aby uniknąć pojawienia się pęcherzyków powietrza, które mogłyby zostać odwzorowane w PDMS w postaci wypukłych struktur. Kawałki taśmy oraz folii wystające poza obręb szkiełka zostały odcięte. Następnie na film kapilarny została nałożona fotomaska posiadająca przezroczyste fragmenty, które odpowiadały geometrii struktur docelowego mikrosystemu, a całość została przykryta płytką kwarcową w celu unieruchomienia fotomaski i zapewnienia jej bezpośredniego przylegania do filmu kapilarnego. Płytką kwarcową została wykorzystana ze względu na wysoką

transparentność na promieniowanie w zakresie UV. Film kapilarny był następnie naświetlany za pomocą lampy UV (Black-Ray™) przez 2 minuty. Podczas tego etapu fragmenty filmu kapilarnego, które zostały wystawione na działanie promieniowania uległy fotoutwardzeniu przez co znacząco zmniejszyły swoją rozpuszczalność w roztworach wodnych. Płytki kwarcowa oraz fotomaska została usunięta, po czym rozpoczęto proces wywoływania filmu kapilarnego. Proces ten polegał na wielokrotnym przemywaniu przygotowywanej matrycy wodą (około 30-60 sekund), delikatnym osuszaniu za pomocą sprężonego powietrza oraz pozostawieniu całości na kilkanaście lub kilkadziesiąt minut w celu odparowania wody z filmu kapilarnego. Etap ten był powtarzany kilkakrotnie, przez przemywanie filmu kapilarnego jak najmniejszymi porcjami wody żeby nie uszkodzić naświetlonej struktury filmu kapilarnego, która ze względu na wymiary, mimo fotoutwardzenia jest nadal względnie delikatną strukturą. Tak wykonaną matrycę pozostawiono na kilka godzin do pełnego osuszenia, po czym posłużyła jako forma do wykonania docelowej mikrostruktury.

#### *Wykonanie warstwy PDMS mikrosystemu*

Warstwę PDMS mikrosystemu wykonano za pomocą techniki odlewu. Wcześniej wykonaną matrycę umieszczono w specjalnie przygotowanej formie. Wytwarzanie kolejnych mikrosystemów prowadzono w formach o jednakowych wymiarach, co pozwoliło na uzyskanie warstw PDMS o w miarę powtarzalnych grubościach. Bezpośrednio przed wykonaniem odlewu przygotowano mieszaninę prepolimeru z czynnikiem sieciującym w stosunku wagowym 10 do 1. Składniki te dokładnie wymieszano. Struktura i właściwości fizyczne mieszaniny (gęstość i lepkość) sprzyja zatrzymywaniu w jej wnętrzu pęcherzyków powietrza. Wykorzystanie takiej mieszaniny do wykonania odlewu skutkowałoby wieloma defektami w odlewie. Dlatego przed zastosowaniem mieszaniny konieczne było jej odgazowanie. Wykonano to metodą podciśnieniową z wykorzystaniem eksykatora Kartell i olejowej pompy próżniowej. Odgazowaną mieszaninę wylano na matrycę w formie, a następnie umieszczono w suszarce laboratoryjnej marki Binder w temperaturze 75°C na 90 minut. Usieciowany polimer po wyjęciu z pieca oddzielono od pieczętki oraz wywiercono w nim dwa otwory: wlotowy i wylotowy.

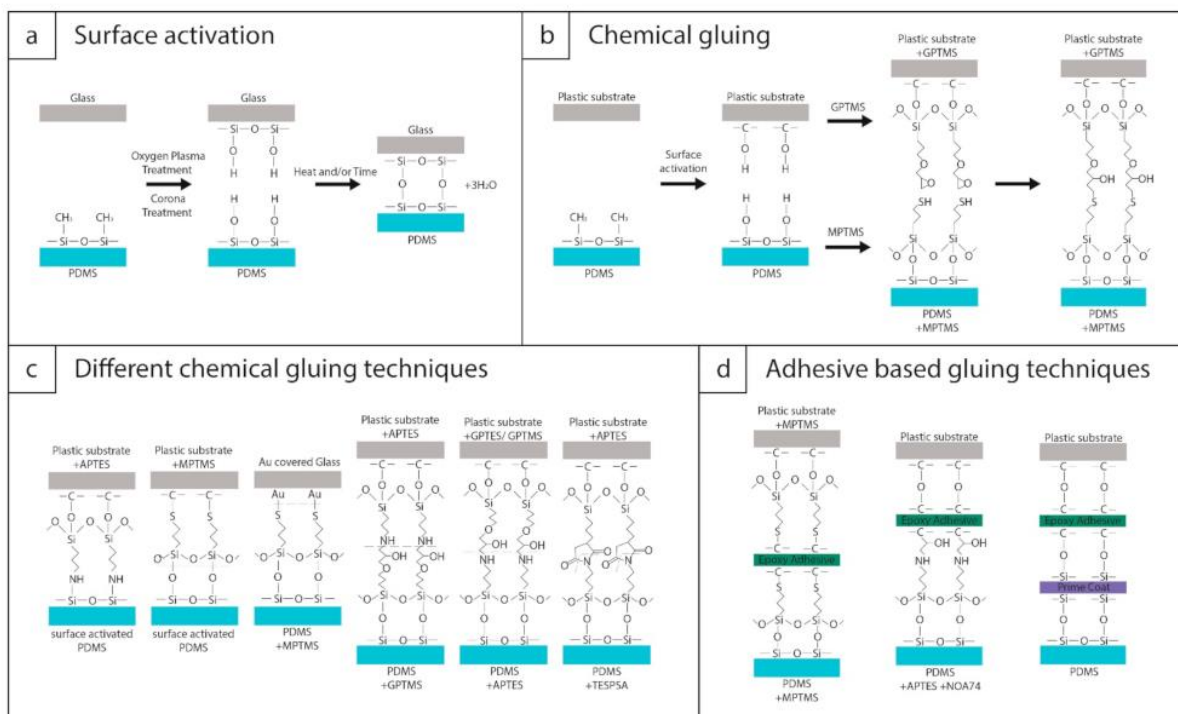
#### *Łączenie warstwy PDMS ze szkłem*

Powstała w wyniku techniki odlewu warstwa PDMS z odwzorowaną strukturą matrycy charakteryzuje się półotwartym systemem mikrostruktur. Konieczne jest jego szczelne

zamknięcie poprzez łączenie z dodatkową warstwą, aby umożliwić przepływ roztworu w mikrosystemie. PDMS najczęściej łączony jest z inną warstwą PDMS lub szkłem.

Popularną metodą łączenia dwóch warstw PDMS lub PDMS ze szkłem jest utworzenie wiązań kowalencyjnych pomiędzy powierzchniami materiałów (proces ten często określa się jako bondowanie – od *ang. bonding*). W metodzie tej wykorzystuje się najczęściej plazmę tlenową (lub rzadziej plazmę powietrzną) w celu aktywacji powierzchni materiałów. Działanie plazmy prowadzi do usunięcia z powierzchni PDMS organicznego materiału węglowodorowego (grup metylowych) oraz do powstania grup silanolowych (Si-OH). Fizyczne zetknięcie dwóch aktywowanych powierzchni z nowoutworzonymi grupami silanolowymi skutkuje powstaniem wiązania kowalencyjnego (O-Si-O) oraz utraty cząsteczki wody. Prowadzi to do trwałego połączenia obu warstw, a w konsekwencji do uszczelnienia systemu mikrostruktur. Rysunek 15-a przedstawia schemat łączenia dwóch warstw poprzez aktywację powierzchni za pomocą plazmy tlenowej. Zastosowanie plazmy tlenowej prowadzi również do zwiększenia hydrofilowości powierzchni PDMS poprzez obecność grup silanolowych. Efekt ten jest jednak krótkotrwały – zazwyczaj około godziny.

W prowadzonych badaniach wykonano mikrosystemy, które składały się z warstwy PDMS oraz szkła. Ten drugi materiał został wybrany jako podstawa i uszczelnienie



mikrostruktur ze względu na swoje hydrofilowe właściwości (PDMS jest hydrofobowym elastomerem), aby ułatwić przepływ roztworów wodnych w mikrokanałach oraz ze względu na dużą stabilność temperaturową w zakresie, w którym prowadzona była reakcja PCR.

Przygotowanie łączonych materiałów rozpoczęto od dokładnego oczyszczenia ich powierzchni. Podłoże szklane zostało umyte przy pomocy detergentu, a następnie rozpuszczalników organicznych takich jak aceton, metanol i izopropanol. Powierzchnię szkła przepłukano wodą dejonizowaną oraz dokładnie osuszono sprężonym powietrzem. Warstwę PDMS umyto przy pomocy detergentu, przemyto wodą dejonizowaną oraz dokładnie osuszono sprężonym powietrzem. Etap ten był konieczny aby odsłonić powierzchnie obu materiałów umożliwiając ich aktywację. PDMS oraz płytkę szklaną umieszczono w komorze niskociśnieniowego systemu generowania plazmy (Diener Electronic, Atto) oraz ustawiono warunki ciśnienia i przepływu tlenu odpowiednie dla tych materiałów zgodnie ze wskazaniami producenta. Ciśnienie w komorze wynosiło 0,3 mbar, przepływ tlenu ustalono na 0,2 sccm (ang. *standard cubic centimeter per minute* – standardowe centymetry sześciennie na minutę). Plazma w komorze była generowana przez 90 sekund. Po wyjęciu z urządzenia materiały zostały ze sobą natychmiast połączone poprzez zetknięcie ze sobą aktywowanych powierzchni oraz pozostawione pod niewielkim obciążeniem na minimum godzinę. Przygotowanie mikroukładu zakończono poprzez umieszczenie silikonowych wężyków, przeznaczonych do użycia z pompą perystaltyczną, o średnicy wewnętrznej 0,13 mm w uprzednio przygotowanych otworach warstwy PDMS. Skuteczność połączenia obu warstw była kontrolowana poprzez fizyczne próby ich rozdzielenia oraz wywołanie przepływu wody destylowanej w mikrosystemie o wartościach kilkukrotnie wyższych niż w docelowym eksperymencie PCR.

Opisany w tym rozdziale sposób wytwarzania mikrosystemów wykonanych z PDMS oraz szkła był niezwykle istotny dla prowadzonych badań. W niniejszej pracy przedstawiono mikrosystemy hybrydowe PDMS/szkło zarówno działające w trybie ciągłym (mikrosystem serpentynowy) jak i w trybie cyklicznym. Opisana technika pozwalała na wprowadzanie licznych modyfikacji projektów jeszcze na etapie prototypowania, dlatego też została wybrana do wytworzenia pierwszych mikroukładów. Charakteryzowały ją jednak pewne ograniczenia, które zostały przedstawione w dalszych rozdziałach.

### 3.1. Serpentynowy mikrosystem PCR

Pierwszym rodzajem mikrosystemu PCR, który został wykonany w ramach prowadzonych badań był hybrydowy mikrosystem PDMS/szkło. Został on zaprojektowany jako mikrosystem przepływowy o geometrii serpentynowej. Jak zostało wspomniane w części literaturowej PDMS jest jednym z najczęściej wykorzystywanych materiałów konstrukcyjnych mikrosystemów, szczególnie na etapie prototypowania. Można go ponadto w łatwy i trwały



sposób łączyć ze szkłem. Kolejnym argumentem przemawiającym za wykorzystaniem PDMSu jako materiału konstrukcyjnego mikrosystemu była jego dostępność oraz doświadczenie zdobyte w pracy z tym polimerem. Warstwa szkła została wykorzystana ze względu na odporność temperaturową, która jest niezbędna w przypadku mikrosystemów projektowanych w celu prowadzenia reakcji PCR. Ponadto szkło charakteryzuje się wysoką obojętnością chemiczną oraz posiada właściwości hydrofilowe, co ułatwia przepływ roztworów wodnych w mikrokanalach.

Zaprojektowana została geometria mikroukładu za pomocą oprogramowania AutoCAD 2018. Opierała się ona o jeden długi mikrokanal, który wpisywał się w często wykorzystywaną w przepływowych mikrosystemach PCR geometrię serpentynową. Mikrosystem taki podzielony jest na trzy oddzielne strefy temperaturowe odpowiadające kolejnym etapom pojedynczego cyklu reakcji PCR. Szczegółowe wymiary zaprojektowanej geometrii przedstawiono na Rysunku 16. Wymiary te zostały dobrane w ten sposób ze względu na następujące czynniki:

1. Wymiary całego mikrosystemu były ograniczone przez elementy grzewcze odpowiedzialne za ustalenie odpowiedniej temperatury w poszczególnych strefach. Wymiary pojedynczej wykorzystanej grzałki (GBR-619, Telpod) wynosiły 9,53 mm x 76,2mm x 1mm. Każda ze stref temperaturowych ogrzewana była dwiema grzałkami, co daje łącznie 6 elementów grzewczych. Grzałki ułożone były równolegle do siebie wzdłuż dłuższej krawędzi. Ustalono również przerwy pomiędzy poszczególnymi parami grzałek, aby zapobiec w ten sposób wzajemnemu wpływowi temperaturowemu poszczególnych stref. Uwzględniono również przestrzeń potrzebną dla odcinka kanału wlotowego i wylotowego oraz margines mikrosystemu otaczający mikrokanal. Ostatecznie ustalono, że wymiary zewnętrzne warstwy PDMS nie powinny przekraczać 80 mm na 70 mm.
2. Jako podstawę mikrosystemu wybrano szkiełko o wymiarach 90 mm na 70 mm
3. Liczba cykli reakcyjnych w zaprojektowanym mikrosystemie została ustalona na minimum 34 na podstawie zaleceń wskazanych przez producenta dla polimerazy HotStartTaq. Liczba cykli determinowała w ścisły sposób kształt mikrokanalu, który musiał być „pozawijany” w taki sposób, aby przepływające przez niego mieszanina reakcyjna znajdowała się w każdej ze stref temperaturowych określoną liczbę razy.
4. Szerokość mikrokanalów została ustalona na 520, 350 i 150  $\mu\text{m}$ . Wybór najmniejszej szerokości podyktowany był ograniczeniami związanymi z wykorzystywaną techniką fotolitografii przy użyciu filmu kapilarnego. Mniejsze szerokości mikrokanalu mogłyby

powodować uszkodzenia lub przesunięcia filmu kapilarnego podczas procesu tworzenia pieczętki.

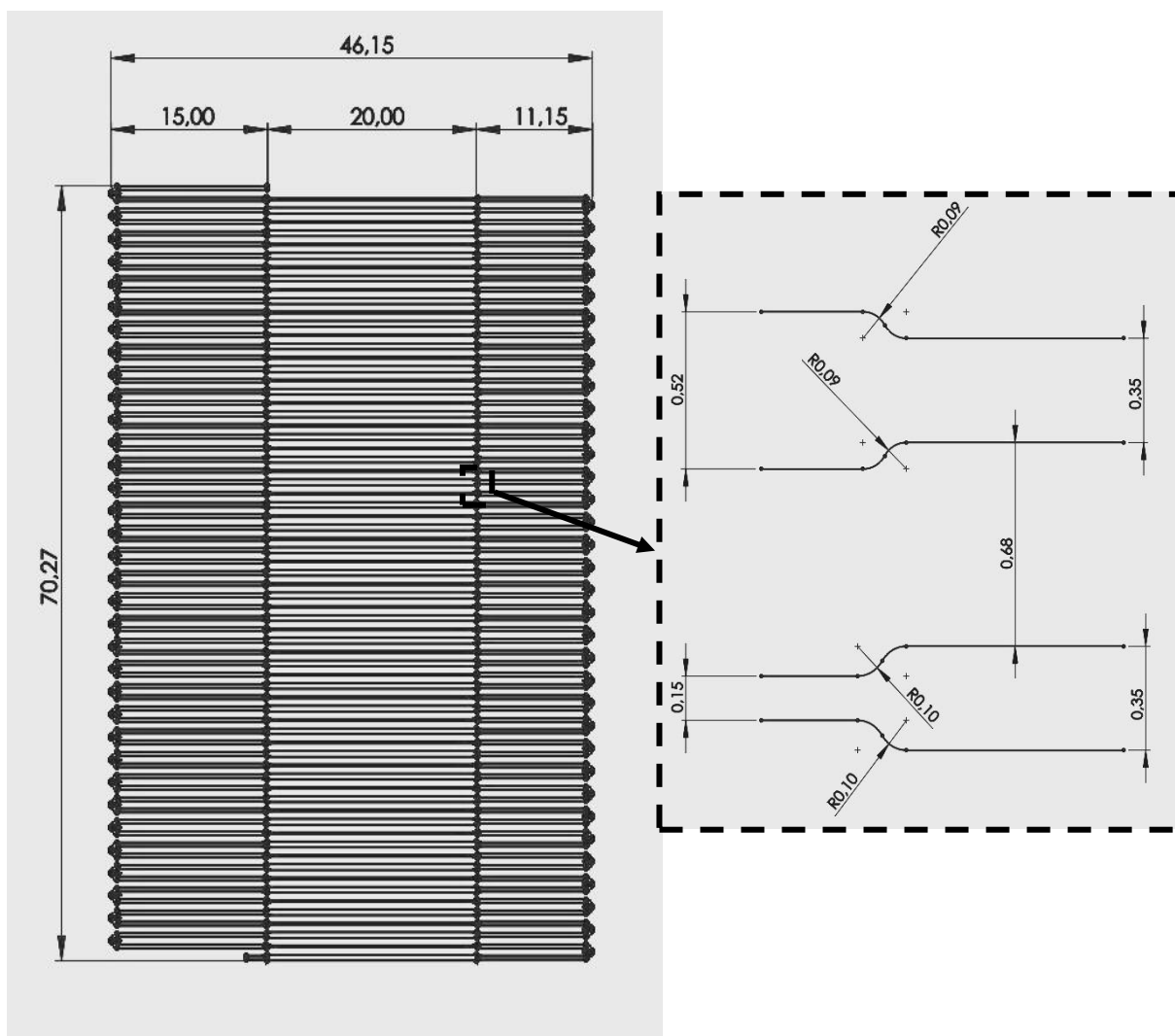
5. Odległości pomiędzy poszczególnymi odcinkami mikrokanалу zostały ustalone na 680  $\mu\text{m}$ . Taka wartość umożliwiała odpowiednio dokładne odmycie nieutwardzonego filmu kapilarnego z przestrzeni pomiędzy fragmentami mikrokanалу, a jednocześnie zapewniała na tyle trwałe połączenie PDMS ze szkłem, aby uniemożliwić niepożądane przepływy pomiędzy sąsiednimi mikrokanalami
6. Wysokość mikrokanалу została ustalona na 100  $\mu\text{m}$ . Wartość ta była podyktowana dostępnymi grubościami filmu kapilarnego, z którego wmywana była pieczętka (wybrano spośród filmów o grubości 200  $\mu\text{m}$ , 100  $\mu\text{m}$  i 50  $\mu\text{m}$ ). Przy wybranej wysokości oraz szerokości mikrokanалу, założono kwadratowy kształt jego przekroju.

Na podstawie zaprojektowanej geometrii przy pomocy oprogramowania obliczono objętość całego mikrokanалу wynoszącą nieco ponad 108  $\mu\text{L}$ . W przypadku mikrosystemu przepływowego o geometrii serpentynowej całkowita objętość nie stanowi kluczowego elementu, gdyż jedynie część mikrokanалу jest wypełniona roztworem w danym czasie. Na podstawie wskazań producenta polimerazy HotStartTaq ustalono czas przebywania mieszaniny reakcyjnej w poszczególnych strefach temperaturowych na 20 sekund w 94°C, 15 sekund w 55°C i 20 sekund w 72°C. Aby to osiągnąć ustalono prędkość przepływu cieczy na 3  $\mu\text{L}/\text{min}$ .

W prowadzonych badaniach założono dwie możliwości rozłożenia stref temperaturowych:

1. Strefy temperaturowe rozłożone zgodnie z kolejnymi etapami cyklu reakcji PCR: 94°C, 55°C i 72°C
2. Strefy temperaturowe rozłożone od najwyższej do najniższej: 94°C, 72°C, 55°C

Zarówno pierwsze jak i drugie podejście wymaga zaprojektowanie mikrokanalu, który cyklicznie będzie zmniejszał swoją szerokość w celu szybszego transportu mieszaniny reakcyjnej pomiędzy skrajnymi strefami temperaturowymi. Konfiguracja z gradientem stężeń pozwala jednak na prowadzenie bardziej efektywnego procesu grzania oraz uniknięcia strat ciepła przy strefie z najniższą temperaturą. Takie rozłożenie grzałek pozwala również zmniejszyć wzajemne oddziaływanie na siebie poszczególnych stref.



Rysunek 16: Schemat geometrii mikrosystemu PCR wraz z kluczowymi wymiarami. Mikrosystem opierał się o ciągły przepływ mieszaniny przez mikrokanal o geometrii serpentynej.

### *Kontrola wykonanych mikrostruktur*

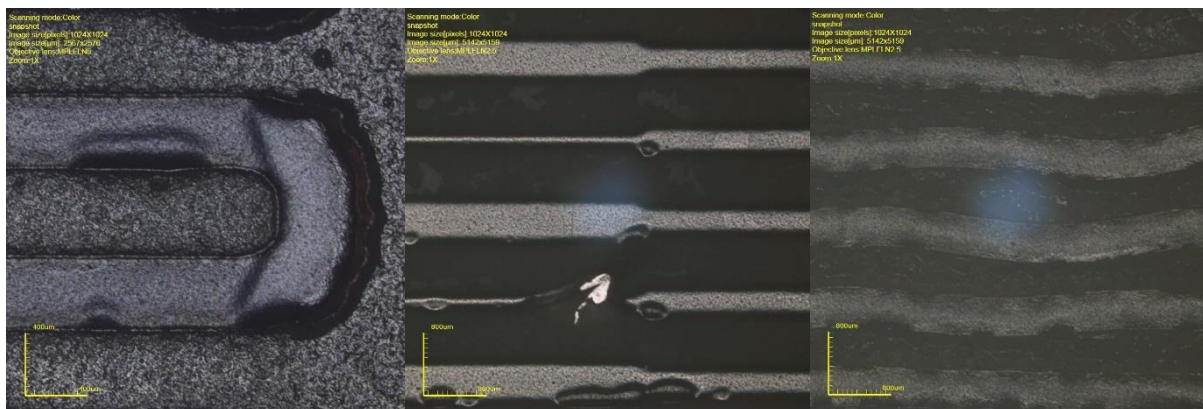
Wytworzenie hybrydowego mikrosystemu przepływowego PDMS/szkło było procesem wieloetapowym i czasochłonnym, dlatego niezbędna była kontrola powtarzalności architektury oraz rozmiarów wykonywanych mikrostruktur, gdyż te parametry wpływają bezpośrednio na generowane przepływy.

W tym celu wykorzystano konfokalny mikroskop laserowy LEXT 4000 (Olympus), który umożliwiał zarówno pomiary szerokości i długości jak i trójwymiarowe pomiary wysokości za pomocą odpowiedniego oprogramowania. Kontrola jakości opierała się na porównaniu wymiarów struktur wytworzonych na matrycy jak i odwzorowanych w PDMS. Mierzone wartości porównywane były z zakładanymi wymiarami zaprojektowanego

mikrosystemu. Dodatkowo w pracy wykorzystywano też mikroskop świetlny, który pozwolił na szybką, wizualną ocenę jakości wykonanych struktur (w szczególności przygotowanej matrycy).

Kontrola wykonanych struktur prowadzona była za pomocą mikroskopu konfokalnego LEXT 4000, który umożliwia obserwacje w świetle widzialnym, ale dzięki zastosowanej diodzie laserowej i bardzo precyzyjnym napędom umożliwia wykonanie trójwymiarowej rekonstrukcji zewnętrznej obserwowanego modelu i wykonanie precyzyjnych pomiarów geometrycznych w trzech osiach. Kontrola polegała na wizualnej identyfikacji zdeformowanych fragmentów, ale przede wszystkim na pomiarach szerokości, wysokości i odległości pomiędzy strukturami, które zostały wykonane na matrycy oraz odwzorowane w PDMS (warstwa elastomeru przed trwałym związaniem jej z płytą szklaną). Pomiary wykonywane były na wskazanych dwóch etapach wytwarzania mikrosystemu (matryca i warstwa PDMS), w celu ustalenia, który z nich ma większy wpływ na ewentualne rozbieżności z projektem.

Podczas obserwacji wykonanych struktur, zarówno na matrycy jak i warstwie PDMS, zauważono szereg zniekształceń, które zostały zaprezentowane na Rysunku 17. Owe zniekształcenia dotyczyły przesunięcia fragmentów mikrokanalu, niepożądanych połączeń między odcinkami mikrokanalów, ubytków i naddatków w ich strukturze.



Rysunek 17: Zdjęcia 2D wykonane za pomocą mikroskopu LEXT, obrazujące zniekształcenia struktur wykonanych na matrycy za pomocą techniki fotolitografii. A) Nieodmyte fragmenty fotorezystu; B) Nieodmyte fragmenty fotorezystu oraz połączenie fragmentów mikrokanalów; C) Przesunięcie (pofałdowanie) mikrokanalów

Pomiary szerokości fragmentów mikrokanalów, odległości pomiędzy nimi oraz ich wysokości zostały zebrane w Tabeli 3. Pomiary zostały wykonane dla trzech matryc i odpowiadającym im odwzorowanym strukturom w warstwie PDMS, z wykorzystaniem filmu kapilarnego o grubości 100 µm. Pomiar każdej ze struktur został wykonany w trzech niezależnych miejscach. Procentowa zmiana wymiarów została określona w stosunku do

poprzedzającego go etapu: wymiary struktur w PDMS do wymiarów struktur matrycy, te natomiast do wymiarów projektu. Wartości te zostały przedstawione w Tabeli 3.

Tabela 3: Wymiary struktur na poziomie projektu, matrycy wykonanej z filmu kapilarnego metodą fotolitografii oraz warstwy PDMS, obliczone na podstawie pomiarów wykonanych za pomocą mikroskopu laserowego mikroskopu konfokalnego LEXT.

	Wymiar według projektu [ $\mu\text{m}$ ]	Pomiar wymiaru matrycy [ $\mu\text{m}$ ]/zmiana (matryca:projekt) [%]		Pomiar wymiaru odwzorowanych struktur [ $\mu\text{m}$ ]/zmiana (PDMS:matryca) [%]	
<b>Wysokość mikrokanalu</b>	100	82 $\pm$ 21	18	94 $\pm$ 14	15
<b>Szerokość struktury 1</b>	520	592 $\pm$ 34	14	572 $\pm$ 23	3
<b>Szerokość struktury 2</b>	350	411 $\pm$ 29	17	378 $\pm$ 20	8
<b>Szerokość struktury 3</b>	150	185 $\pm$ 26	12	162 $\pm$ 22	12
<b>Odległość pomiędzy kanałami</b>	680	623 $\pm$ 47	8	659 $\pm$ 35	6

Na podstawie wykonanych zdjęć oraz wyników pomiarów zaprezentowanych w Tabeli 3, zaobserwowano, że największe zmiany w zaprojektowanych strukturach widoczne są na przygotowanych matrycach, a odkształcenia w warstwie PDMS są jedynie konsekwentnym powieleniem tych błędów. Podobne wnioski można wyciągnąć na podstawie pomiarów wykonanych mikroskopem LEXT 4000. Największe różnice w wymiarach zaprojektowanych mikrostruktur, zarówno jeżeli dotyczyło to ich szerokości jak i wysokości, obserwowano na etapie przygotowanej matrycy. Procentowa zmiana wymiarów projektowanych struktur mierzonych na wykonanej matrycy sięgała nawet 18%, podczas gdy wartość ta dla warstwy PDMS w stosunku do matrycy była nieco mniejsza i nie przekraczała 15%. Wykonanie matrycy metodą fotolitografii jest procesem czasochłonnym i wieloetapowym, stąd wynika jego podatność na różnego rodzaju błędy i niedoskonałości. Ponadto zaprojektowana mikrostruktura cechowała się niewielkimi szerokościami mikrokanalu i odległościami pomiędzy jego fragmentami, co mogło generować błędy podczas etapu wymywania nieutwardzonego filmu kapilarnego.

### Wykorzystanie mikrosystemu serpentynowego w celu prowadzenia reakcji PCR

Przygotowane mikrosystemy zostały wykorzystane do przeprowadzenia łańcuchowej reakcji polimerazy. Zestaw umożliwiający zajście reakcji składał się z opisanego systemu grzewczego, hybrydowego mikrosystemu przepływowego PDMS/szkło z podłączonymi wężykami o średnicy wewnętrznej wynoszącej 13  $\mu\text{m}$  służącymi do dostarczenia oraz odbioru mieszaniny reakcyjnej do i z mikrosystemu oraz pompy perystaltycznej, dzięki której możliwe było ustalenie odpowiedniego przepływu.

Mikrosystem został opracowany w celu przeprowadzenia amplifikacji fragmentu genu zjadliwego szczepu błonicy (*Corynebacterium diphtheriae*) o poniższej sekwencji:

5'- CAA TCA TCG TCA TAA TTT CCT TGT GTA CCA GAT TTT GGC TTT TGT ATA  
CCT TTT TGA ATG GAA TCT ACA TAA CCA GGT TTA GTC CCG TGG TAC GAA GAA  
AAG TTT TC -3'

Przygotowana została mieszanina reakcyjna zgodnie ze wskazaniem producenta wykorzystywanej polimerazy. Skład mieszaniny oraz sekwencje wykorzystywanych starterów zostały przedstawione w Tabeli 4 (Stężenie 1). Całkowita objętość mieszaniny wynosiła 40  $\mu\text{L}$ . Według założeń pracy, w mikrosystemie przeprowadzana powinna być asymetryczna reakcja PCR, czyli taka, w której nadmiar jednego ze starterów prowadzi do powstania w nadmiarze ssDNA. Ze względu na początkowy etap badań zdecydowano się jednak na prowadzenie standardowej reakcji PCR.

Tabela 4: Skład mieszanin reakcyjnych wykorzystywanych do prowadzenia reakcji PCR w mikrosystemie.

Składnik mieszaniny reakcyjnej	Stężenie 1	Stężenie 2
Starter F (5'- CAA TCA TCG TCA TAA TTT CCT TGT GTA CC -3')	2500 nM	5000 nM
Starter R (5'- GAA AAC TTT TCT TCG TAC CAC GGG ACT AA -3')	2500 nM	5000 nM
Polimeraza HotStartTaq	25 unit/ mL	0,2 unit/ $\mu\text{L}$
dNTP	200 $\mu\text{M}$	400 $\mu\text{M}$
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM	3 mM
DNA matrycowe	$\approx 0,023$ ng/ul	$\approx 0,023$ ng/ul

Eppendorf zawierający mieszaninę reakcyjną został umieszczony w suszarce laboratoryjnej na 15 minut w celu wstępnej denaturacji matrycowego DNA, ale przede wszystkim, aby aktywować polimerazę HotStart. Mikrosystem został umieszczony na systemie

grzewczym i pozostawiony w celu ustabilizowania się temperatury na 15 minut. Mieszaninę reakcyjną wprowadzono do mikrosystemu za pomocą pompy perystaltycznej z ustalonym przepływem o wartości 3  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Po przepłynięciu mieszaniny przez serpentynowy mikrokanal, zbierano produkt reakcji do osobnego eppendorfu. Opisany sposób prowadzenia reakcji dotyczył mikrosystemów o wysokości kanałów 100  $\mu\text{m}$  i 200  $\mu\text{m}$ . Czas trwania reakcji wynosił dla nich odpowiednio 30 i 60 minut.

Przeprowadzono również niezależnie reakcję PCR w termocyklerze jako kontrolę pozytywną. Skład oraz objętość mieszaniny reakcyjnej był identyczny. Warunki prowadzenia reakcji zostały przedstawione w Tabeli 5. Kontrola ta była niezbędna, aby potwierdzić działanie składników mieszaniny.

Tabela 5: Warunki prowadzenia reakcji PCR w termocyklerze (kontrola pozytywna)

<b>Etap reakcji</b>	<b>Temperatura etapu [°C]</b>	<b>Czas trwania etapu [min]</b>
Wstępna denaturacja	94	15
Denaturacja	94	1
Przyłączenie starterów	55	0,75
Wydłużenie nici	72	1
Końcowe wydłużenie nici	72	5

Produkt reakcji w mikroukładach oraz termocyklerze poddano procedurze rozdzielania elektroforetycznego opisanego w Części II, Rozdziale 8. Dzięki optycznej detekcji w żelu agarozowym zaobserwowano produkt reakcji PCR prowadzonej w termocyklerze w postaci prążka. Długość nici DNA oszacowano na około 110 pz, co można interpretować jako obecność oczekiwanego produktowi o długości 107 pz. Nie zaobserwowano za to prążków dla produktów reakcji prowadzonej w mikroukładach. Oznacza to, że reakcja w mikrosystemie nie zaszła, lub zaszła z bardzo małą wydajnością.

Jak zostało wspomniane w części literaturowej PDMS jest jednym z najczęściej wykorzystywanych materiałów konstrukcyjnych mikrosystemów typu Lab-on-a-chip. Przegląd artykułów dotyczących mikrosystemów służących do przeprowadzania reakcji PCR, które opierały się na tym elastomerze pozwoliły zidentyfikować szereg potencjalnych czynników powodujących inhibicję reakcję amplifikacji [102, 103]. Dotyczyły one zarówno wykorzystywanego materiału, jak i prowadzenia reakcji w mikroskali. Pierwszym z czynników mogących prowadzić do inhibicji reakcji jest adsorpcja DNA w mikrostrukturach PDMS.

Zjawisko to utrudnia przebieg reakcji PCR we wszystkich jej etapach, prowadząc do zmniejszenia efektywności lub całkowitej zatrzymania procesu reakcyjnego. Kolejnym niekorzystnym efektem, który może występować jest adsorpcja polimerazy w mikrokanale wykonanym z PDMS, uniemożliwiając działanie tego enzymu na etapie wydłużenia nici (elongacji). Ostatnim z wybranych czynników było zbyt małe stężenie składników mieszaniny biorących udział w reakcji (zarówno polimerazy, dNTP, starterów, jonów magnezu), biorąc pod uwagę mikroprzepływowy charakter jej przebiegu, w którym siły powierzchniowe mogą zmniejszać ich aktywność. W kolejnych badaniach starano się zidentyfikować zjawisko odpowiedzialne za inhibicję oraz znaleźć rozwiązanie umożliwiające prowadzenie reakcji.

Aby zweryfikować możliwość adsorpcji DNA przez PDMS, do mikrosystemu wprowadzono mieszaninę poreakcyjną PCR o potwierdzonej zawartości amplifikowanego produktu. Mikrosystem został wystawiony na działanie grzałek, analogicznie jak w przypadku przeprowadzania reakcji, a prędkość przepływu została ustalona na 1  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Mieszanina została zebrana po opuszczeniu mikrosystemu i poddana procesowi elektroforezy. Zaobserwowano prążek o intensywności i położeniu podobnym do mieszaniny wprowadzonej do mikrosystemu. Doświadczenie to nie pozwoliło jednoznacznie wykluczyć adsorpcji DNA na powierzchni PDMS, jednak pozwoliło stwierdzić, że zjawisko to, przy zastosowanych warunkach, nie zachodzi z dużą intensywnością. Doniesienia literaturowe wskazują, że PDMS może adsorbować małe hydrofilowe cząsteczki, w tym krótkie fragmenty DNA, dlatego badania powtórzono z wykorzystaniem starterów wykorzystywanych w reakcji PCR [102]. Ponownie, zarówno położenie jak i intensywność prążków obserwowanych w żelu po procesie elektroforezy było bardzo zbliżone dla obu porównywanych mieszanin. Warto jednak zaznaczyć, że nie wyklucza to możliwości adsorpcji przez PDMS stosowanych jako startery łańcuchów polinukleotydowych, dlatego zwrócono uwagę na procedury zabezpieczające, które zostały opisane w dalszej części rozdziału.

W celu sprawdzenia potencjalnej adsorpcji polimerazy przez PDMS, przeprowadzono reakcję w mikrosystemie według opisanych wcześniej procedur. Część zebranej mieszaniny poreakcyjnej została użyta jako substrat PCR prowadzonej w termocyklerze. Następnie produkt reakcji w mikrosystemie oraz termocyklerze zostały rozdzielone elektroforetycznie a zdjęcia żelu agarozowego poddane ocenie wizualnej. W przypadku obu sprawdzanych mieszanin nie zaobserwowano prążków odpowiadających DNA o długości 107 pz. Brak oczekiwanego produktu dla reakcji w termocyklerze był pierwszą wskazówką potwierdzającą hipotezę o możliwej adsorpcji polimerazy przez PDMS w zastosowanych warunkach. Do podobnych efektów mogła jednak prowadzić również dezaktywacja enzymu, który poprzez wystawienie



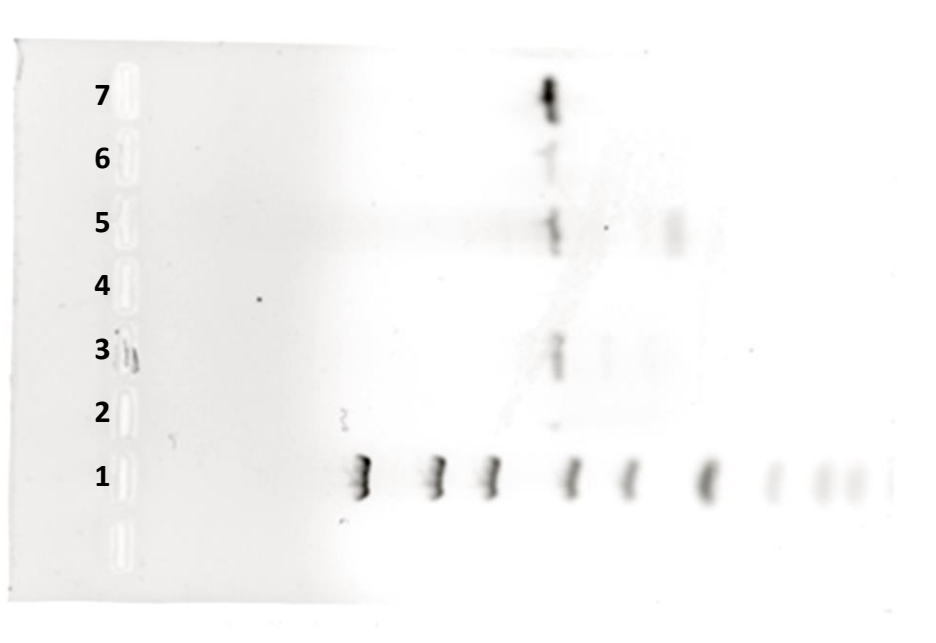
na działanie wysokich temperatur zmniejsza swoją aktywność [104]. Zdecydowano o powtórzeniu opisanego badania modyfikując jedynie etap preinkubacji, który pominięto. Uzyskane wyniki były identyczne z poprzednimi, co skłoniło do odrzucenia hipotezy o dezaktywacji polimerazy.

Opisane doświadczenie powtórzono po raz kolejny, przy czym mieszanina poreakcyjna zbierana z mikrosystemu została wzbogacona o polimerazę doprowadzając do stężenia enzymu na poziomie 0,2 jednostek/ $\mu$ l (przy założeniu, że cała polimeraza została zadsorbowana przez PDMS). Tak przygotowana mieszanina została wykorzystana do przeprowadzenia reakcji PCR w termocyklerze, a analiza żelu agarozowego po elektroforezie potwierdziła obecność oczekiwanego produktu. Obserwacja ta pozwoliła wyciągnąć wniosek o adsorpcji polimerazy w mikrosystemie przy zastosowanych warunkach.

Dzięki dostępnej literaturze tematu, wskazano możliwe sposoby zapobiegania zidentyfikowanego problemu [7, 45, 105]. Opierały się one na modyfikacjach mieszaniny reakcyjnej o dodatkowy składnik np. DMSO, Tween 20, BSA, lub na przepłukaniu mikrosystemu za pomocą odpowiednich czynników (np. BSA – albumina surowicy bydlęcej, PVP – poli(winylopirolidon), PEG – poli(tlenek etylenu)) przed rozpoczęciem reakcji. Ostatecznie zdecydowano się na modyfikację składu mieszaniny reakcyjnej oraz zastosowaniu BSA w celu przepłukiwania mikrosystemu. Nowy skład mieszaniny został przedstawiony w Tabeli 4 (stężenie 2). Działanie BSA opiera się na modyfikacji mikrokanałów poprzez adsorpcje na powierzchni PDMS, co z kolei utrudnia zajście podobnego zjawiska innym białkom, w tym wykorzystywanej polimerazie. Dodatkowo BSA przyczynia się do zmniejszenia hydrofobowych właściwości PDMS.

Opracowany mikrosystem przed umieszczeniem na układzie grzewczym i przeprowadzeniu reakcji przepłukiwano roztworem BSA o stężeniu 50 mg/ml przez 15 minut przy przepływie wynoszącym 10  $\mu$ l/min. Następnie mikrokanal przepłukano za pomocą wody wolnej od nukleaz, w celu usunięcia pozostałości roztworu BSA. W tak przygotowanym mikrosystemie prowadzono reakcję według wcześniej opisanych procedur (Mikro1). Ponownie część mieszaniny poreakcyjnej została przeznaczona do wykorzystania w reakcji PCR prowadzonej w termocyklerze (Makro1). Obserwowane prążki w żelu agarozowym wskazywały, że reakcja w termocyklerze z użyciem mieszaniny pochodzącej z mikrosystemu zaszła, lecz z mniejszą wydajnością niż próba kontrolna (kontrola – reakcja prowadzona wyłącznie w termocyklerze. Ponownie dla reakcji prowadzonej jedynie w mikrosystemie nie zaobserwowano prążków w żelu agarozowym świadczących o zajściu reakcji.

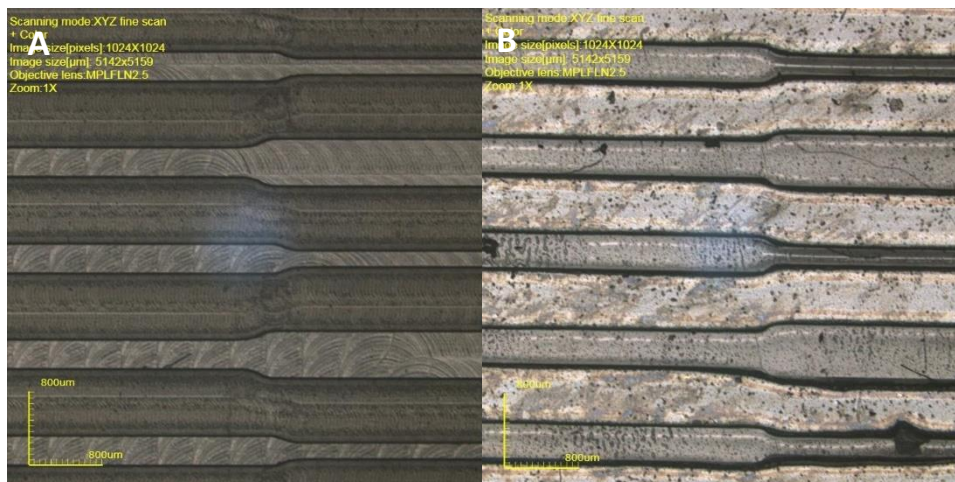
Równolegle przygotowano mikrosystem wypełniony roztworem BSA o stężeniu 50 mg/ml oraz uszczelnionymi wężykami doprowadzającymi, który został pozostawiony w temperaturę pokojowej na 24 godziny. Następnie mikrosystem przepłukano wodą wolną od nukleaz i przeprowadzono reakcję PCR zgodnie z wcześniej ustaloną procedurą (Mikro2). Ponownie część mieszaniny poreakcyjnej została wykorzystana do przeprowadzenia reakcji w termocyklerze (Makro2). Wizualna obserwacja prążków w żelu agarozowym pozwoliła stwierdzić zajście reakcji w termocyklerze z użyciem mieszaniny poreakcyjnej z wydajnością porównywalną do kontroli. Wyniki powyższego eksperymentu przedstawiono na Rysunku 18. Na tej podstawie wyciągnięto wniosek o pozytywnym wpływie inkubacji BSA w mikrosystemie na zapobieganie adsorpcji polimerazy przez struktury PDMS. W trakcie kolejnych badań prowadzonych z wykorzystaniem mikrosystemów PDMS/szkło, reakcję PCR poprzedzała opisana inkubacji z BSA. Ponadto został zaobserwowany niewielki prążek świadczący o amplifikacji DNA dla mieszaniny poreakcyjnej pochodzącej z mikrosystemu. Wynik ten był pierwszym przykładem zajścia reakcji w opracowanym mikrosystemie przy zastosowanych warunkach.



Rysunek 18: Zdjęcie żelu agarozowego po procesie elektroforezy z widocznymi prążkami DNA o określonych długościach nici. 1- drabinka molekularna; 2- brak próbki; 3- Maro1; 4- Mikro1; 5- Makro2; 6-Mikro2; 7- Reakcja prowadzona jedynie w termocyklerze (kontrola pozytywna)

### *Matryca wykonana techniką mikrofrezowania*

Prowadzone badania wymagały wykonania znaczącej liczby mikrosystemów PDMS/szkło. Matryce wytworzone metodą fotolitografii wymagały dużego nakładu pracy, przy czym ich jakość oraz powtarzalność pozostawiały pole do generowania błędów. Ponadto pieczętki wykonane tą metodą były w większości jednorazowego użytku. Z tego powodu wykonano matrycę w PMMA metodą mikrofrezowania. Frezowanie podobnie jak większość metod obróbki mechanicznej charakteryzuje się tym, że otrzymywane są struktury o znacznej chropowatości, jednak dzięki optymalizacji procesu (optymalizacja obrotów elektrowrzeciona, posuwu w osiach XY, prędkości zagłębiania w osi Z, zachodzenia, głębokości frezowania czy wreszcie średnicy i kształtu użytych narzędzi) udało się zminimalizować chropowatość do bardzo niskiego poziomu. Badania chropowatości płaskich fragmentów powierzchni, które były poddane procesowi mikrofrezowania wykonane zostały przy użyciu mikroskopu LEXT4000. Otrzymana matryca charakteryzowała się ona dużą precyzją wykonania oraz mogła być użyta do metody odlewu wielokrotnie, co pozwoliło na zwiększenie powtarzalności. Na Rysunku 19 zostały przedstawione fotografie wykonane za pomocą mikroskopu LEXT4000 przedstawiające strukturę nowej matrycy wykonanej metodą mikrofrezowania i porównano ją z matrycą wykonaną metodą fotolitografii. Zarówno w PMMA jak i PDMS widoczne są ślady pozostawione na skutek działania frezu, jednak nie wpływały one na przepływ roztworów w mikrosystemie. W Tabeli 6 porównano charakterystyczne wymiary mikrostruktur wykonanych w matrycy jak i odwzorowane w warstwie PDMS z założeniami projektu. Jak można zauważyć zmierzone wartości są zbliżone do tych w zakładanym projekcie. Ograniczeniem, które występuje w technice mikrofrezowania jest średnica narzędzia użytego do skrawania, jednak w



Rysunek 19: Zdjęcia 2D matryc o geometrii serpentynowej wykonanych dwiema metodami: A) - mikrofrezowanie; B) - fotolitografia

przypadku wykonanej matrycy dostępne frezy pozwoliły na jej wykonanie. Parametry mikrofrezowania zostały odpowiednio dobrane, tak aby umożliwić precyzyjne wykonanie struktur. Prędkość obrotu wrzeciona została ustalona na 12 000 RPM, zaś posuw frezu na 500 mm/min.

Tabela 6: Wymiary struktur na poziomie projektu, matrycy wykonanej z PMMA metodą mikrofrezowania oraz warstwy PDMS, obliczone na podstawie pomiarów wykonanych za pomocą mikroskopu laserowego mikroskopu konfokalnego LEXT

	Wymiar według projektu [ $\mu\text{m}$ ]	Pomiar wymiaru matrycy [ $\mu\text{m}$ ]/zmiana [%]		Pomiar wymiaru odwzorowanych struktur [ $\mu\text{m}$ ]/zmiana [%]	
<b>Wysokość mikrokanalu</b>	100	96 $\pm$ 16	4	90 $\pm$ 11	7
<b>Szerokość struktury 1</b>	520	535 $\pm$ 34	3	528 $\pm$ 46	1
<b>Szerokość struktury 2</b>	350	368 $\pm$ 29	5	349 $\pm$ 17	5
<b>Szerokość struktury 3</b>	150	159 $\pm$ 25	6	182 $\pm$ 30	14
<b>Odległość pomiędzy kanałami</b>	680	653 $\pm$ 38	4	631 $\pm$ 42	3

Podczas pracy z mikrosystemami hybrydowymi PDMS/szkło zidentyfikowano szereg problemów wpływających na przebieg reakcji PCR. Jednym z nich było zjawisko adsorpcji polimerazy na powierzchni PDMS, które udało się wyeliminować poprzez inkubację mikrosystemu z roztworem BSA. Innym ważnym problemem było nieprawidłowe dostosowanie temperatury do kolejnych etapów reakcji. Było to spowodowane zastosowaniem stosunkowo grubej warstwy uszczelniającej – płytki szklanej, stanowiącej izolację pomiędzy systemem grzewczym a mikrokanalem. Innym powodem było bliskie umieszczenie kolejnych stref temperaturowych w geometrii mikrosystemu. Mikrosystemy opierające się o jeden długi i pozwijany kanał (mikrosystemu tzw. serpentynowe) pozwalały ponadto na przeprowadzenie określonej, niezmienniej liczby cykli reakcyjnych. Stanowi to potencjalny problem, przy założeniu niskiej efektywności części cykli reakcyjnych. Czasochłonną procedurę wytwarzania matryc metodą fotolitografii zastąpiono wielorazową mikrofrezowaną pieczętką. Jednym z założeń pracy było opracowanie takich rozwiązań, które pozwoliłyby na szybkie, tanie oraz powtarzalne wytwarzanie mikrosystemów PCR. Mimo, że mikrosystemu PCR PDMS/szkło mogą być pomocne w pracy laboratoryjnej, to ich potencjał w wykorzystaniu na większą skalę

jest niewielki. Ponadto przepływ w opracowanym mikrosystemie był wywoływany za pomocą pompy perystaltycznej, której rozmiary wielokrotnie przekraczały sam mikrochip

Na podstawie prowadzonych badań wyciągnięto szereg wniosków dotyczących konstrukcji oraz sposobu prowadzenia reakcji w mikrosystemie. Zgodnie z doniesieniami literaturowymi zaobserwowano zjawisko adsorpcji polimerazy na powierzchni PDMS. Jako część procedury prowadzenia reakcji wprowadzono inkubację roztworu BSA wewnątrz mikrosystemu. Procedura ta wykorzystana była również w dalszych etapach badań. Zaobserwowano znaczące różnice w dokładności wykonania mikrostruktur w zależności od zastosowanej matrycy. Różnice te były dostrzegalne zarówno w kształcie odwzorowanych mikrokanałów jak i obliczeniach dokonanych na podstawie pomiarów mikroskopowych. Matryce wykonane techniką mikrofrezowania w PMMA charakteryzowały się dużo większą dokładnością w stosunku do projektu (3-6%) od tych wykonanych z filmu kapilarnego metodą miękkiej fotolitografii (8-18%).

### 3.2. Mikrosystemy cykliczne PDMS/szkło

Mikrosystemy PCR o strukturze serpentynowej wykazują pewne ograniczenia, które utrudniają ich zastosowanie. Jakakolwiek zmiana w reakcji amplifikacji np. zmiana liczby cykli, pociąga za sobą konieczność opracowania praktycznie nowego mikroukładu co z kolei wymaga przeprowadzenia nowych prac projektowych, opracowanie nowej matrycy by wreszcie na jej podstawie wykonać nowy układ. Z tego względu układy te charakteryzują się bardzo niską uniwersalnością i ich użycie ogranicza się tylko do przeprowadzenia w nich niektórych procedur reakcji PCR. Ponadto wymiary tego typu chipów są limitowane przez rozbudowaną sieć mikrostruktur (zazwyczaj 25-35 cykli reakcyjnych). Z tego powodu rozpoczęto pracę nad cyklicznym (nazywanym też cyrkulacyjnym) mikrosystemem PCR. Jak zostało przedstawione w części literaturowej mikrosystemy cykliczne są również podzielone na trzy strefy temperaturowe, a każda z nich odpowiada za jeden etap cyklu reakcyjnego PCR. Zasadnicza różnica polega na tym, że jedno przepłynięcie mieszaniny reakcyjnej przez chip odpowiada jednemu cyklowi reakcyjnemu. Dzięki temu można też dowolnie kontrolować ich liczbę, zmniejszyć wymiary chipu lub zwiększyć dystans pomiędzy poszczególnymi strefami temperaturowymi.

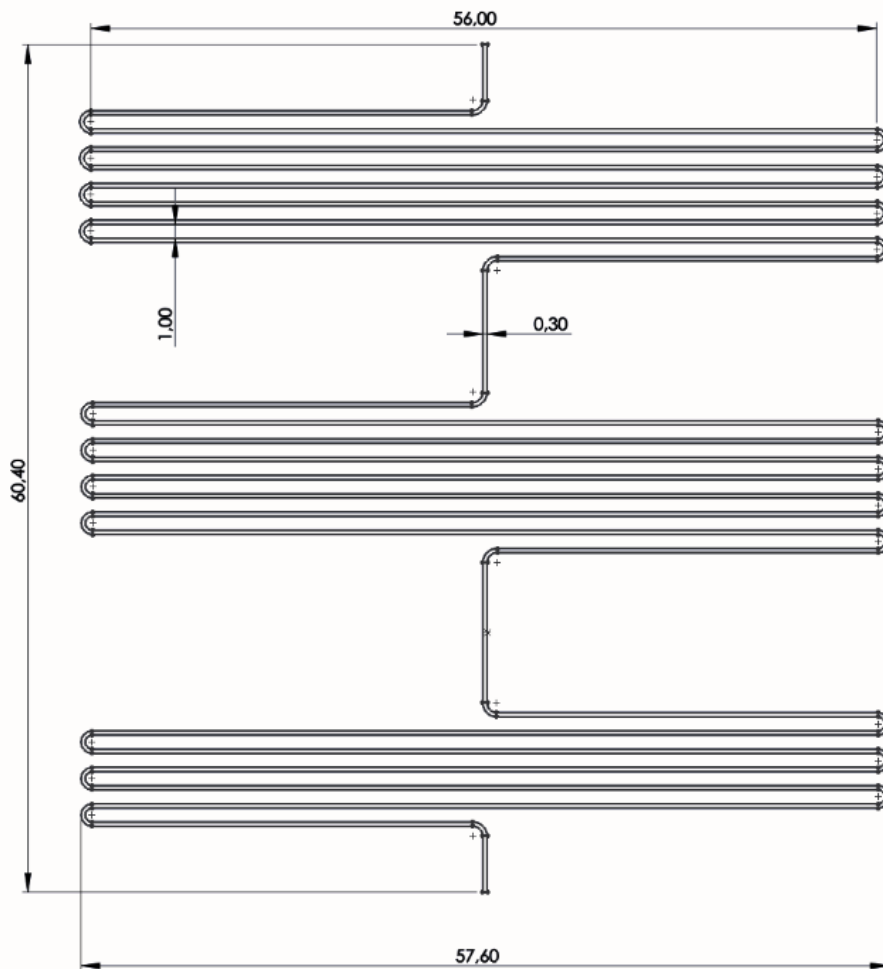
Przed przystąpieniem do prac projektowych opracowano założenia, które powinien spełniać projektowany mikrosystem:

1. Do kontroli temperatury w poszczególnych strefach zostanie wykorzystany ten sam układ grzałek (układ zasilania i kontroli temperatury), który był stosowany w przypadku

układu serpentynowego. Z tego względu jednym z punktów wyjścia do opracowania geometrii i rozmiarów mikroukładu były rozmiary oraz ułożenie grzałek. Ustalono, że wymiary warstwy z odwzorowanymi strukturami nie będą przekraczać 80 mm na 75 mm.

2. Kolejnym, ważnym czynnikiem, determinującym wymiary mikrosystemu był rozmiar dostępnych płytek szklanych, z których wykonana jest jedna warstwa. W odróżnieniu od materiału polimerowych (a szczególnie PDMS) szkło jest materiałem stosunkowo ciężkim do precyzyjnego cięcia w warunkach laboratoryjnych dlatego zdecydowano się bazować na płytkach o rozmiarach dostępnych komercyjnie.. Jako podstawę mikrosystemu wybrano płytkę szklaną o wymiarach 90 mm na 70 mm.
3. Ustalono jedną, stałą szerokość mikrokanalu dla każdej z projektowanych geometrii. Ze względu na dotychczasowe doświadczenia w sterowaniu przepływami w mikrokanale oraz ze względu na ograniczenia technologiczne podjęto decyzję, że dla mikrokanalu o takiej długości oraz o planowanej metodzie generowania przepływu najlepszy będzie kanał o średnicy 300  $\mu\text{m}$ .
4. Głębokość mikrokanalu ustalono na 100  $\mu\text{m}$ , ze względu na ograniczenia technologiczne wynikające z zastosowania technologii opartej o film kapilarny, który był wykorzystywany do wytworzenia matrycy.
5. Odległości pomiędzy kolejnymi fragmentami mikrokanalu w danej strefie temperaturowej ustalono na 1 mm, tak aby umożliwić dokładne usunięcie nieutwardzonego filmu kapilarnego bez uszkodzania mikrostruktur matrycy oraz zapewnić odpowiednią siłę wiązania poszczególnych warstw mikroukładu w wyniku procesu łączenia warstwy PDMS ze szkłem (bondowania), która zagwarantuje odpowiednią szczelność sąsiednich mikrokanalów.
6. Długość mikrokanalu została obliczona na podstawie całkowitej objętości mikrosystemu oraz planowanego przepływu. Objętość mikrosystemu wynosiła nieco ponad 39  $\mu\text{L}$ . Objętość martwa, na którą składała się przestrzeń w wężyku doprowadzającym, odprowadzającym, pompie oraz zaworze wynosiła około 15  $\mu\text{L}$ .
7. Na podstawie powyższych założeń, a szczególnie ograniczeń wynikających z rozmiarów zewnętrznych mikroukładu, geometrii oraz rozmiarów mikrokanalów, obliczono maksymalne odległości pomiędzy poszczególnymi strefami temperaturowymi.

Szczegółowe wymiary każdej z zaprojektowanej geometrii mikrostruktury zostały zaprezentowane na Rysunku 20. Mikrosystemy cykliczne zostały wykonane z dwóch warstw – PDMS oraz szkła. Warstwa PDMS z odwzorowaną mikrostrukturą została wykonana metodą odlewu przy użyciu matrycy wykonanej metodą miękkiej fotolitografii. Szczegółowe procedury wytwarzania oraz łączenia warstw zostały opisane w Części III, Rozdziale 3. Niezmienny pozostał również wykorzystywany system grzewczy. Kontrola wykonanych mikrostruktur odbywała się przy pomocy mikroskopu LEXT4000. Różnice w wymiarach wykonanych, a zaprojektowanych struktur mieściły się w przedziale 3-16%.



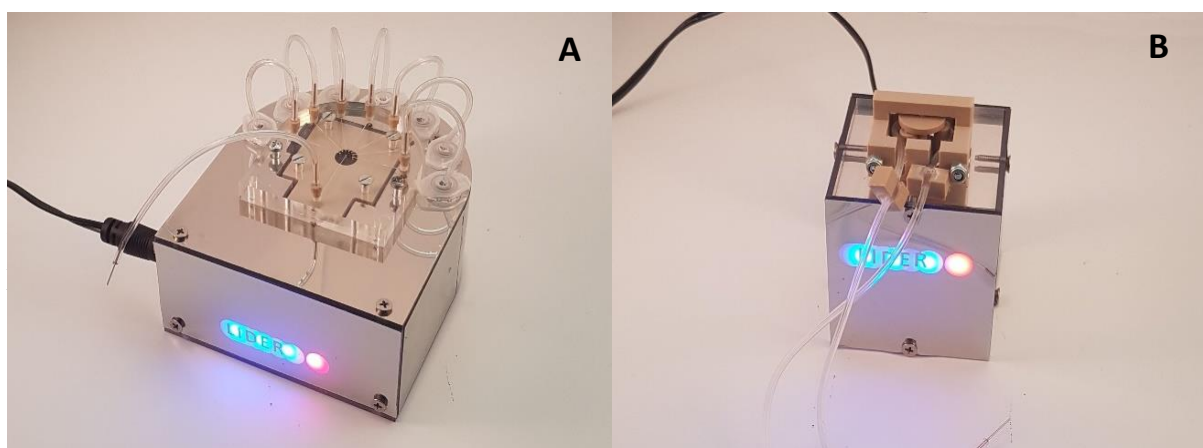
Rysunek 20: Schemat geometrii cyklicznego mikrosystemu PCR z zaznaczonymi kluczowymi wymiarami.

W opracowanym mikrosystemie sposób prowadzenia reakcji polega na wielokrotnym przepływie mieszaniny reakcyjnej przez mikrokanal. Wymaga to uzyskania cyklicznego wprowadzania mieszaniny do mikrosystemu. Aby to osiągnąć niezbędne jest wykorzystanie układu, który umożliwi odpowiednie sterowanie przepływem.

### *Zminiaturyzowany system generowania oraz kontroli przepływu*

Jednym z kluczowych elementów układów cyrkulacyjnych jest system wymuszający przepływ. W literaturze można odnaleźć wiele rozwiązań tego typu systemów np. z zastosowaniem cieczy ferromagnetycznych, które są poruszane przez magnes a tym samym powodują przepływ mieszaniny reakcyjnej znajdującej się przed czołem cieczy ferromagnetycznej [28]. Jednak w większości przypadków są to systemy mało uniwersalne, w których kontrolowanie przepływu jest dość utrudnione. Dodatkowo są stosowane w przypadku mieszanin reakcyjnych o dość wąskim zakresie objętości. Z tych względów, do projektowanego mikroukładu cyrkulacyjnego zdecydowano się nie skupiać na opracowaniu nowego mikrouządzenia wymuszającego przepływ tylko wykorzystano bardzo dobrze sprawdzające się rozwiązanie w postaci pompy perystaltycznej, która umożliwia kontrolowanie w bardzo szerokim zakresie przepływów i objętości mieszaniny reakcyjnej. W tym konkretnym przypadku wykorzystano pompę perystaltyczną opracowaną przez dr inż. Kamila Żukowskiego i dr hab. inż. Roberta Ziółkowskiego w ramach projektu Juventus.

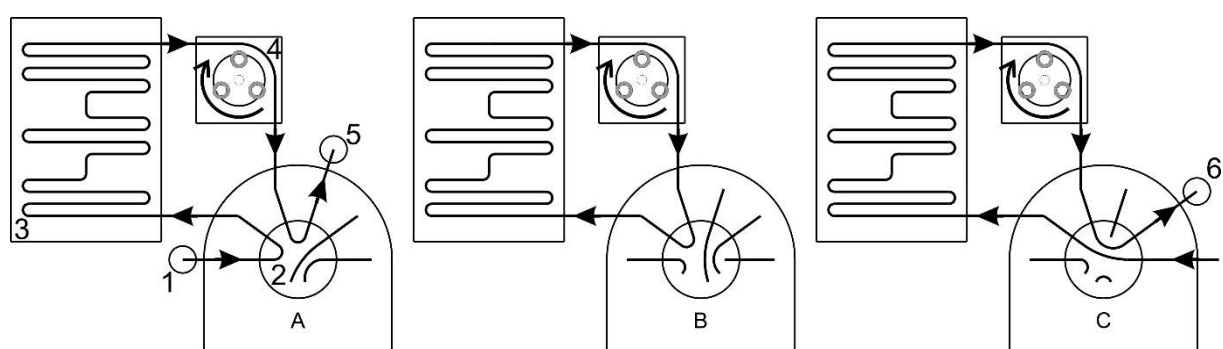
Konstrukcja mikropompy perystaltycznej opierała się na trzech rolkach umieszczonych na bębnie obrotowym, wokół którego owinięty został silikonowy wężyk. Każda z rolek poprzez dociskanie elastycznego wężyka, zmniejszała jego wewnętrzną średnicę, a ich ruch obrotowy powodował powstanie przepływu zgodny z kierunkiem obrotu. Ponadto zwężenia silikonowego wężyka zapobiegały zjawisku przepływu zwrotnego. Poszczególne elementy mikropompy perystaltycznej zostały wykonane techniką mikrofrezowania, co pozwoliło na zmniejszenie wymiarów urządzenia. Pozwoliła ona na uzyskanie stabilnego przepływu w zakresie od 4 do 150  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Zewnętrzny wygląd mikropompy został przedstawiony na Rysunku 21B.



Rysunek 21: Opracowany przez dr inż. Kamila Żukowskiego A) mikrozwór obrotowy; B) zminiaturyzowana pompa perystaltyczna

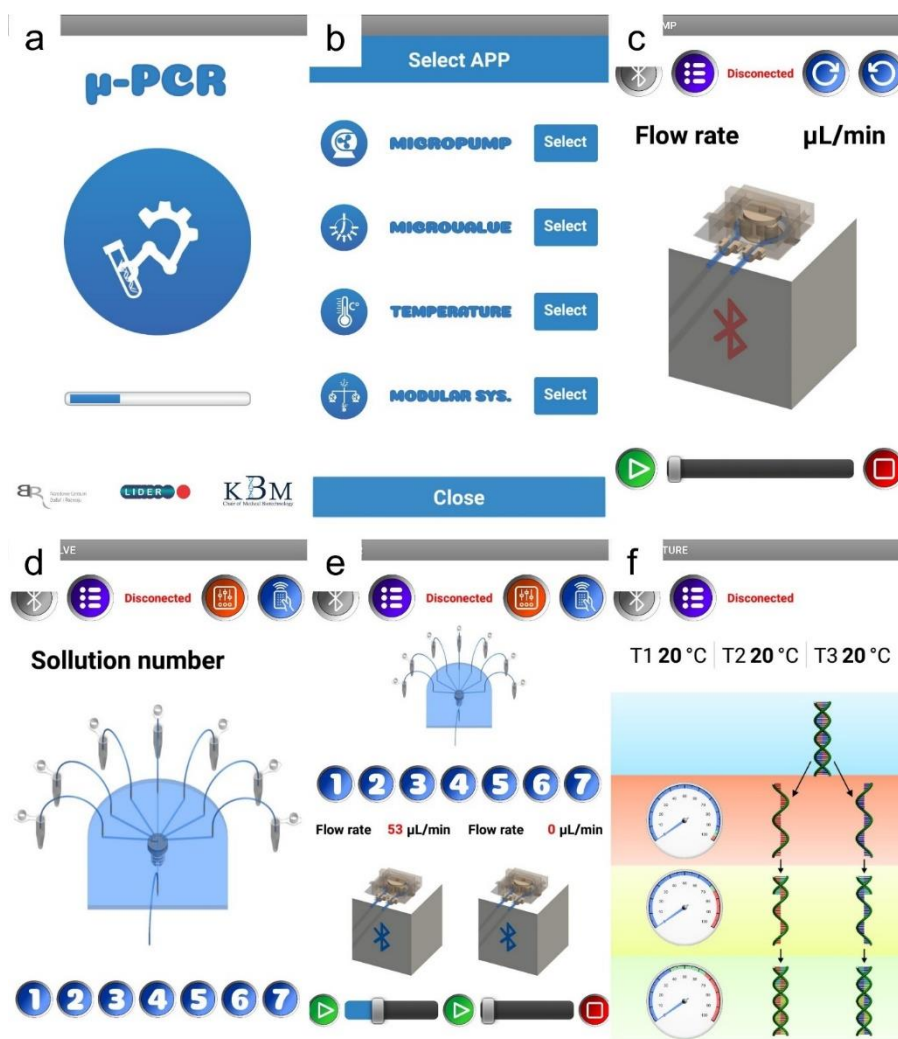


Mikrozawór w połączeniu z zminiaturyzowaną pompą perystaltyczną pozwolił na kontrolowanie kierunku przepływu mieszaniny reakcyjnej. Umożliwił również zautomatyzowane wprowadzenie mieszaniny do mikrosystemu, jej cyrkulację oraz wyprowadzenie bez konieczności ręcznej manipulacji wężykami. Mikrozawór składał się z chipu mikroprzepływowego, uszczelki oraz systemu elektronicznego. Chip mikroprzepływowy został wykonany metodą mikrofrezownia w dwóch warstwach PMMA o grubości 2 mm i 5 mm. W dolnej warstwie znajdował się system koncentrycznie ułożonych kanałów o szerokości 250  $\mu\text{m}$  i głębokości 250  $\mu\text{m}$ . Mikrokanały te zakończone były otworami doprowadzającymi o średnicy 500  $\mu\text{m}$ . W górnej warstwie natomiast znajdowały się otwory dolotowe, łączące się z zakończeniami kanałów warstwy dolnej. Obie płytki były ze sobą trwale połączone poprzez bondowanie rozpuszczalnikowe wspomagane promieniowaniem UV. Jako rozpuszczalnik został użyty etanol [106]. Głównym elementem mikrozaworu była uszczelka z kauczuku fluorowego Viton® z mikrokanalami wykonanymi metodą mikrofrezowania. Geometria mikrokanalów opierała się na czterech nieprzecinających się fragmentach o szerokości 400  $\mu\text{m}$  i głębokość 350  $\mu\text{m}$ . Uszczelka była umieszczona na obrotowym trzpieniu, który z kolei był połączony z wałem silnika krokowego. Wraz z obrotem wału silnika krokowego następował obrót uszczelki, a co za tym idzie przekonfigurowanie portów w mikrozaworze. Mikrozawór ten swoje działanie zawdzięcza precyzyjnemu dopasowaniu poszczególnych elementów, odpowiedniemu dociskowi oraz uszczelnieniom. Został on zaprezentowany na Rysunku 21A.



Rysunek 22: Schematyczne przedstawienie działania mikrozaworu oraz zminiaturyzowanej pompy podczas trzech trybów pracy: A) Wprowadzenie mieszaniny do mikrosystemu; B) Cyrkulacja mieszaniny w mikrosystemie; C) Wyprowadzenie mieszaniny z mikrosystemu

Zarówno mikropompa jak i mikrozwór były wykonane jako niezależne moduły, które mogły działać razem jak i osobno. Opracowana została również aplikacja mobilna przeznaczona na system Android, która umożliwia automatyczne sterowanie oboma modułami. Aplikacja ta pozwalała na wybór wartości i kierunku przepływu oraz sterowanie mikrozworem. Ta ostatnia funkcja była niezbędna, aby umożliwić pracę całego systemu w trzech trybach: wprowadzania, cyrkulacji oraz wyprowadzania mieszaniny reakcyjnej z mikrosystemu. Wspomniane tryby były zależne od konkretnego położenia obrotowej uszczelki, co zostało przedstawione na Rysunku 22. Rysunek 23 przedstawia przykładowe zrzuty ekranu wykorzystywanej aplikacji.



Rysunek 23: Zrzuty ekranu aplikacji przedstawiające jej poszczególne funkcjonalności: a) ekran startowy; b) ekran modułu; c) moduł sterowania mikropompą; d) moduł sterowania mikrozworem; e) moduł sterowania mikrozworem oraz pompą; f) moduł odczytu temperatury.

Warto zaznaczyć, że zarówno mikropompa jak i mikrozwór były urządzeniami wykorzystywanymi w prowadzonych badaniach wielokrotnie, dlatego należało zwrócić uwagę na możliwość ich kontaminacji. Powstałe zanieczyszczenia mogłyby prowadzić do wyników zarówno fałszywie negatywnych jak i pozytywnych. W przypadku mikropompy problem ten

został w prosty sposób rozwiązany poprzez każdorazową zmianę silikonowych wężyków przy wykonywanych eksperymentach. Takiej możliwości nie było jednak dla precyzyjnie wykonanych struktur mikrozaworu. Dlatego każde wykorzystanie tego elementu w prowadzeniu reakcji PCR poprzedzone było etapem oczyszczania, który polegał na przepuszczeniu przez mikrozawór 4M roztworu NaOH, wody dejonizowanej oraz wysoce czystej wody wolnej od nukleaz. Proces ten był wykonywany dla wszystkich trybów pracy mikrozaworu.

#### *Wykorzystanie mikrosystemu cyklicznego PDMS/szkło w celu prowadzenia reakcji PCR*

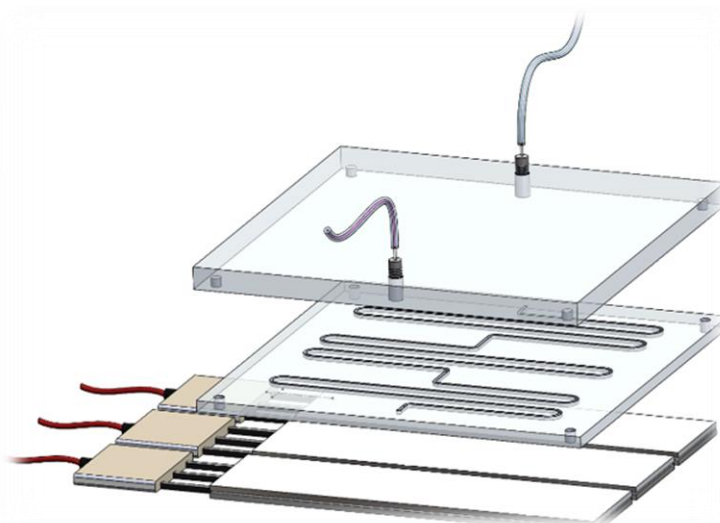
Wykonany cykliczny mikrosystem hybrydowy PDMS/szkło został wykorzystany do przeprowadzenia reakcji PCR. Skład mieszaniny reakcyjnej został przedstawiony w Tabeli 4, stężenie 2. Do wywołania przepływu w mikrosystemie została użyta zminiaturyzowana pompa opisana powyżej. W trakcie wykonywanych badań z wykorzystaniem mikrosystemu cyklicznego PDMS/szkło zaobserwowano często pojawiające się problemy techniczne polegające na rozszczelnieniu dwóch połączonych warstw, co skutkowało wyciekaniem mieszaniny reakcyjnej poza przestrzeń mikrokanalów. Przyczyną takiego zjawiska było najprawdopodobniej zbyt wysokie ciśnienie w mikrosystemie. Im dłuższy mikrokanal, tym większe są generowane opory przepływu. Aby wymusić przepływ na poziomie 80  $\mu\text{L}/\text{min}$  pompa musiała wytworzyć bardzo wysokie ciśnienie przekraczające maksymalne ciśnienie, które był w stanie wytrzymać mikroukład o zaprojektowanej geometrii wykonany z połączonych ze sobą warstw PDMS i szkła. Wysokie wartości przepływu były natomiast konieczne, aby móc przeprowadzić pojedynczy cykl reakcyjny w założonym czasie: 30 sekund, a całą reakcję w czasie 15 minut, zgodnie z celem pracy, która postulowała skrócenie czasu prowadzenia reakcji w stosunku do standardowo wykorzystywanych termocyklerów.

Na podstawie badań prowadzonych z wykorzystaniem cyklicznego mikrosystemu hybrydowego PDMS/szkło wyciągnięto szereg wniosków odnośnie tego typu układów. Zaprojektowana geometria mikrosystemu umożliwiała dokładne odmycie filmu kapilarnego na etapie przygotowania matrycy z filmu kapilarnego metodą miękkiej fotolitografii. W celu wymuszenia i kontrolowania przepływu wykorzystano zminiaturyzowaną pompę oraz mikrozawór obrotowy, co pozwalało na automatyczne wprowadzenie mieszaniny reakcyjnej do układu, jej cyrkulację oraz wyprowadzenie. Ze względu na cykliczny tryb prowadzenia reakcji (pełen cykl reakcyjny PCR odpowiadał jednokrotnemu przepływowi mieszaniny reakcyjnej przez mikrosystem) konieczne było generowanie stosunkowo wysokich przepływów. Zastosowane materiały (warstwa PDMS oraz płytka szklana) oraz sposób ich

połączenia nie zapewniał odpowiedniej szczelności w zastosowanych warunkach. Z tego powodu konieczne było wprowadzenie modyfikacji na doboru materiału konstrukcyjnego mikrosystemu.

#### 4. Mikrosystem cykliczny wykonany z PMMA

Na podstawie przeprowadzonych badań zdecydowano się na zmianę materiału konstrukcyjnego mikrosystemu. Wybrano PMMA ze względu na jego właściwości oraz doświadczenie w mikroobróbce tego materiału. PMMA jest materiałem biokompatybilnym, można poddawać go sterylizacji oraz charakteryzuje się wysoką temperaturą zeszklenia, co pozwala na wykorzystanie go w mikrosystemach PCR, które wymagają prowadzenia reakcji w podwyższonej temperaturze. Zdecydowano się na wykonanie mikrosystemu o geometrii przedstawionej w Części III, rozdziale 3. Składał się on z dwóch płytek PMMA, z których jedna o grubości 2 mm stanowiła jego podstawę oraz uszczelnienie, zaś w drugiej został wykonany system mikrokanałów oraz otwory wlotowy i wylotowy. Płytki zostały ze sobą trwale połączone poprzez łączenie (bondowanie) rozpuszczalnikowe z wykorzystaniem etanolu, wspomaganie promieniowaniem elektromagnetycznym z zakresu UV. Pod wpływem tych czynników dochodzi do reorganizacji oraz częściowej hydrolizy grup funkcyjnych na powierzchni PMMA. Po zetknięciu takich dwóch warstw dochodzi do powstania wiązań estrowych i ich połączenia. Ponadto działanie wskazanych rozpuszczalników powoduje zmniejszenie chropowatości materiału, a przez to zmniejszenie możliwości adsorpcji składników mieszaniny w mikrokanale. Aby zapewnić dodatkową szczelność w przesyle cieczy opracowano dodatkowo interfejs łączący wewnątrz mikrokanału ze światem zewnętrznym, który



Rysunek 24: Schemat mikrosystemu cyklicznego wykonanego z PMMA. Widoczne są dwie warstwy PMMA, nanoporty z silikonowymi wężykami oraz system grzałek.

umożliwiał sprawne wprowadzanie roztworów do mikrosystemu, ich przepływ między poszczególnymi modułami, a finalnie wyprowadzenie produktów reakcji poza mikrosystem. W tym celu wykonano gwintowanie otworów w górnej warstwie PMMA oraz odpowiadające im również gwintowane nanoporty. Zostały one zabezpieczone również gumową uszczelką z gumy Viton. Nanoporty zostały wykonane metodą mikrofrezowania z PEEK. Każdy z nich posiadał centrycznie ułożony otwór o średnicy 250  $\mu\text{m}$ , w którym umieszczono metalową kapilarę o średnicy wewnętrznej 100  $\mu\text{m}$  łączącą mikrosystem z silikonowymi wężykami. Schemat wykonany mikrosystem został przedstawiony na Rysunku 24.

Ze względu na cykliczny sposób prowadzenia reakcji w mikrosystemie zdecydowano się na dwa niezależne warianty ułożenia stref temperaturowych. Pierwszy wariant był zgodny z kolejnością następujących po sobie etapów reakcyjnych: 94°C, 55°C i 72°C. Drugi zaś polegał na ułożeniu stref zgodnie z gradientem temperaturowy: 55°C, 72°C, 94°C. W tym wariacie założono, że po etapie denaturacji mieszanina reakcyjna opuszczając mikrosystem i przepływając przez elementy mikropompy i mikrozaworu obniży swoją temperaturę, a ponownie wprowadzona do mikrosystemu będzie poddana dwóm kolejnym etapom cyklu. Parametry grzałki zostały ponownie zoptymalizowane na potrzeby obu wariantów w sposób opisany w Części 3, Rozdziale 2.

Na podstawie wcześniejszych doświadczeń oraz przeglądu literaturowego zdecydowano o przeprowadzeniu badań możliwej adsorpcji składników mieszaniny w mikrosystemie. Odbyły się one analogicznie do badań w mikrosystemie serpentynowym PDMS/szkło, opisanych w Części III, Rozdziale 3.1. Kolejno były to badania: adsorpcja DNA w mikrosystemie (próbka mikroD), adsorpcja polimerazy w mikrosystemie (próbka mikroPu – reakcja prowadzona w mikrosystemie; próbka makroPT – reakcja prowadzona w termocyklerze z wykorzystaniem mieszaniny poreakcyjnej z mikrosystemu; próbka makroP+T – reakcja prowadzona w termocyklerze z wykorzystaniem mieszaniny poreakcyjnej z mikrosystemu z dodatkiem polimerazy), blokujące adsorpcję działanie BSA (próbka mikroB – reakcja prowadzona w mikrosystemie; próbka makroB – reakcja prowadzona w termocyklerze z wykorzystaniem mieszaniny poreakcyjnej z mikrosystemu). Zdjęcie żelu agarozowego z widocznymi prążkami odpowiadającymi produktom reakcji zostało przedstawione na Rysunku 25. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono brak adsorpcji DNA przez mikrosystem (obecność prążka dla próbki mikroD) oraz brak adsorpcji polimerazy (obecność prążków o porównywalnej intensywności dla próbek makroPT i makro P+T). Przeprowadzono reakcję PCR w opisanym mikrosystemie przy użyciu mieszaniny reakcyjnej, której skład znajduje się w Tabeli 7 (Stężenie 2). Reakcje prowadzono w dwóch wariantach różniących się

rozmieszczeniem stref temperaturowych. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że reakcja w mikrosystemie nie zaszła lub zaszła z bardzo małą wydajnością.



Rysunek 25: Zdjęcie żelu agarozowego po procesie elektroforezy z widocznymi prążkami DNA o określonych długościach nici. 1- drabinka molekularna; 2- mikroPu; 3- mikroD; 4- mikroP; 5- makroP+T; 6-Mikro2; 7- makroB

Jedną z wytypowanych przyczyn niepowodzenia prowadzonych reakcji mógł być zbyt krótki czas przebywania mieszaniny reakcyjnej przy zastosowanych wysokich wartościach przepływu. Zdecydowano o przeprowadzeniu reakcji w mikrosystemie z ustaloną wartością przepływu na 40  $\mu\text{L}/\text{min}$ , co odpowiada całościowemu czasowi reakcji wynoszącemu 30 minut (próbka mikroT<sub>1</sub>30 – reakcja prowadzona przy ułożeniu grzałek zgodnie z kolejnością etapów reakcyjnych; próbka mikroT<sub>2</sub>30 – reakcja prowadzona przy ułożeniu grzałek zgodnie z gradientem temperaturowym). Zdecydowano również o zmianie składu mieszaniny reakcyjnej, której skład przedstawiono w Tabeli 7.

Tabela 7: Skład mieszanin reakcyjnych wykorzystywanych do prowadzenia reakcji PCR w mikrosystemie. X - producent zapewnia o optymalnym stężeniu polimerazy dla większości reakcji, bez podania konkretnej wartości. Stężenie 2 – asymetryczna reakcja PCR.

Składnik mieszaniny reakcyjnej	Stężenie 1	Stężenie 2
Starter F (5'- CAA TCA TCG TCA TAA TTT CCT TGT GTA CC -3')	5000 nM	1250 nM
Starter R (5'- GAA AAC TTT TCT TCG TAC CAC GGG ACT AA -3')	5000 nM	5000 nM
Polimeraza HotStartTaq	X	X
dNTP	200 $\mu\text{M}$	200 $\mu\text{M}$
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM	1,5 mM
DNA matrycowe	$\approx 0,023$ ng/ul	$\approx 0,023$ ng/ul

Najbardziej znaczącym składnikiem mieszaniny, którego stężenie uległo zmianie był zastosowany enzym, który umożliwia zajście reakcji. We wcześniejszych badaniach używano HotStartTaq DNA polymerase. W dalszych eksperymentach zmieniono ją na Phire HotStart DNA polymerase, która cechowała się krótszym czasem niezbędnym do wydłużenia nici (około 10 do 15 sekund na 1000 pz). W składzie mieszaniny zmieniono również proporcje stężenia starterów. Miało to związek z prowadzeniem asymetrycznej reakcji PCR, w której nadmiar jednego ze starterów prowadzi do powstania jednoniciowego DNA, które jest docelowym analitem wykrywanym przez opracowany biosensor. Przeprowadzono badania w celu sprawdzenia potencjalnej adsorpcji składników nowej mieszaniny reakcyjnej w mikrosystemie (próbka makroP2T – reakcja prowadzona w termocyklerze z wykorzystaniem mieszaniny poreakcyjnej z mikrosystemu; próbka makroP2+T – reakcja prowadzona w termocyklerze z wykorzystaniem mieszaniny poreakcyjnej z mikrosystemu z dodatkiem polimerazy). Ponownie nie stwierdzono adsorpcji składników mieszaniny w mikrosystemie. Przeprowadzono reakcje w mikrosystemie z zastosowaniem nowego składu mieszaniny dla dwóch wariantów rozmieszczenia stref temperaturowych, dla każdego z nich dla dwóch czasów reakcji 15 i 30 minut (próbka mikroT<sub>1</sub>15 – reakcja prowadzona przez 15 minut przy ułożeniu grzałek zgodnie z kolejnością etapów reakcyjnych; próbka mikroT<sub>1</sub>30 – reakcja prowadzona przez 30 minut przy ułożeniu grzałek zgodnie z kolejnością etapów reakcyjnych; próbka mikroT<sub>2</sub>15 – reakcja prowadzona przez 15 minut przy ułożeniu grzałek zgodnie z gradientem temperaturowym; próbka mikroT<sub>2</sub>30 – reakcja prowadzona przez 30 minut przy ułożeniu grzałek zgodnie z gradientem temperaturowym). Na podstawie uzyskanych zdjęć żelu agarozowego po procesie rozdzielania elektroforetycznego zaobserwowano prążek o niewielkiej intensywności odpowiadający długością amplifikowanemu fragmentowi DNA dla próbki mikroT<sub>1</sub>30. Taki wynik sugeruje zajście reakcji PCR w mikrosystemie, choć z niewielką wydajnością. W celu potwierdzenia obecności analitu w próbce, poddano ją detekcji na opracowanym biosensorze (Biosensor został opisany w Części III, Rozdziale 7). Badanie to nie spowodowało jednak spadku natężenia prądu rejestrowanego przez biosensor, co oznacza że nie zaszedł proces hybrydyzacji w warstwie receptorowej, lub stężenie cDNA jest poniżej granicy detekcji biosensora (wydaje się to jednak mało prawdopodobne ze względu na niską granicę detekcji – 20,8 nM i 0,5 nM odpowiednio dla 5 i 30 minut procesu hybrydyzacji) (Część III, Rozdział 7.1.).

Na podstawie uzyskanych wyników i obserwacji prowadzonych badań zidentyfikowano ograniczenia opracowanego mikrosystemu, które utrudniają lub uniemożliwiają wydajne zajście reakcji PCR. Zastosowanie PMMA jako materiału konstrukcyjnego, dobranego sposobu

łączenia warstw oraz użycie nanoportów pozwoliło na stworzenie mikrosystemu umożliwiającego przepływ roztworu przy wysokich parametrach przepływu (80  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) bez niepożądanych wycieków mieszaniny. Jednakże grubość warstwy uszczelniającej (2mm), pomimo dostosowania parametrów systemu grzewczego mogły mieć znaczny wpływ na przewodność ciepła, a co za tym idzie wartości temperatury realnie uzyskiwane z mikrokanale. Ponadto oba z zastosowanych wariantów ułożenia stref temperaturowych wpływały negatywnie na prowadzoną reakcję. W przypadku wariantu z grzałkami ułożonymi zgodnie z kolejnymi etapami cyklu reakcyjnego, wpływ strefy denaturacji na sąsiednią strefę przyłączenia starterów (annealing) był znaczący. W trakcie ustalania parametrów pracy systemu grzewczego nie możliwe było uzyskanie temperatury w strefie elongacji niższej niż 58°C nawet przy wyłączonej odpowiadającej jej grzałce. W przypadku wariantu z grzałkami ułożonymi zgodnie z gradientem możliwe było uzyskanie odpowiednich wartości temperatury, jednak przerwa pomiędzy etapem denaturacji a annealingu i znaczne obniżenie temperatury podczas przepływu przez elementy mikropompy i mikrozaworu prowadziły najprawdopodobniej do powtórnej hybrydyzacji pojedynczych nici DNA (ssDNA) uniemożliwiając przyłączenie starterów.

Warto zwrócić uwagę, że na tym etapie badań zdecydowano się na zastosowanie systemu w konfiguracji modułowej, w którym poszczególne moduły (mikrosystem, zminiaturyzowana pompa oraz mikrozwór) były połączone wężykami, przy czym tylko jeden moduł (mikroukład z mikrokanalami) znajdował się w strefach z regulowaną temperaturą. Mimo, że układ modułowy jest dużo prostszy do wykonania oraz potencjalnych zmian w poszczególnych elementach, to jednak jego najpoważniejszą wadą jest wyprowadzanie mieszaniny reakcyjnej poza strefy z regulowaną temperaturą pomiędzy poszczególnymi cyklami reakcji PCR. Powoduje to znaczne wydłużenie czasu pojedynczego cyklu oraz dochodzi do niekorzystnych zjawisk związanych z wymianą energii, która powoduje gwałtowne obniżenie temperatury roztworu po czym ponowne jego gwałtowne ogrzewanie.

Przeprowadzone badania pozwoliły wyciągnąć szereg wniosków dotyczących zastosowanych rozwiązań konstrukcyjnych oraz użytych materiałów. Wykorzystanie PMMA jako materiału konstrukcyjnego cyklicznego mikrosystemu PCR pozwoliło uniknąć niektórych problemów technicznych, które występowały w hybrydowych mikrosystemach PDMS/szkło. Zastosowana technika łączenia elementów z PMMA (bondowanie rozpuszczalnikowe wspomagane UV) oraz użycie nanoportów pozwoliła na generowanie wysokich przepływów. Nie było to możliwe w przypadku mikrosystemu PDMS/szkło, których warstwy łączono poprzez bondowanie z wykorzystaniem plazmy tlenowej.



W dalszym etapie badań postanowiono nie rezygnować z cyklicznego trybu prowadzenia reakcji. Na podstawie zdobytych doświadczeń w konstrukcji i działaniu mikrosystemu cyrkulacyjnego postanowiono zaprojektować mikrosystem z wykorzystaniem innych materiałów konstrukcyjnych oraz wykorzystywanych technik mikroobróbki. Zdecydowano się również na zmianę koncepcji konstrukcji mikrosystemu na zintegrowaną, czyli taką, która w jednym urządzeniu łączy ze sobą funkcje, wykonywane wcześniej przez poszczególne moduły. Aby możliwe było skonstruowanie takiego typu mikrosystemu konieczne było opracowanie także nowego systemu wymuszającego i kontrolującego przepływy. Zdecydowano się opracować zminiaturyzowaną pompę, która poprzez naprzemienne działanie ruchomych elementów będzie w stanie wywołać przepływ mieszaniny reakcyjnej w mikrosystemie. Jednak, aby wykonać tego typu element konieczne było uprzednie opracowanie zaworów zwrotnych, które ukierunkowują przepływ roztworów generowanych przez zminiaturyzowaną pompę.

## 5. Mikrozwór

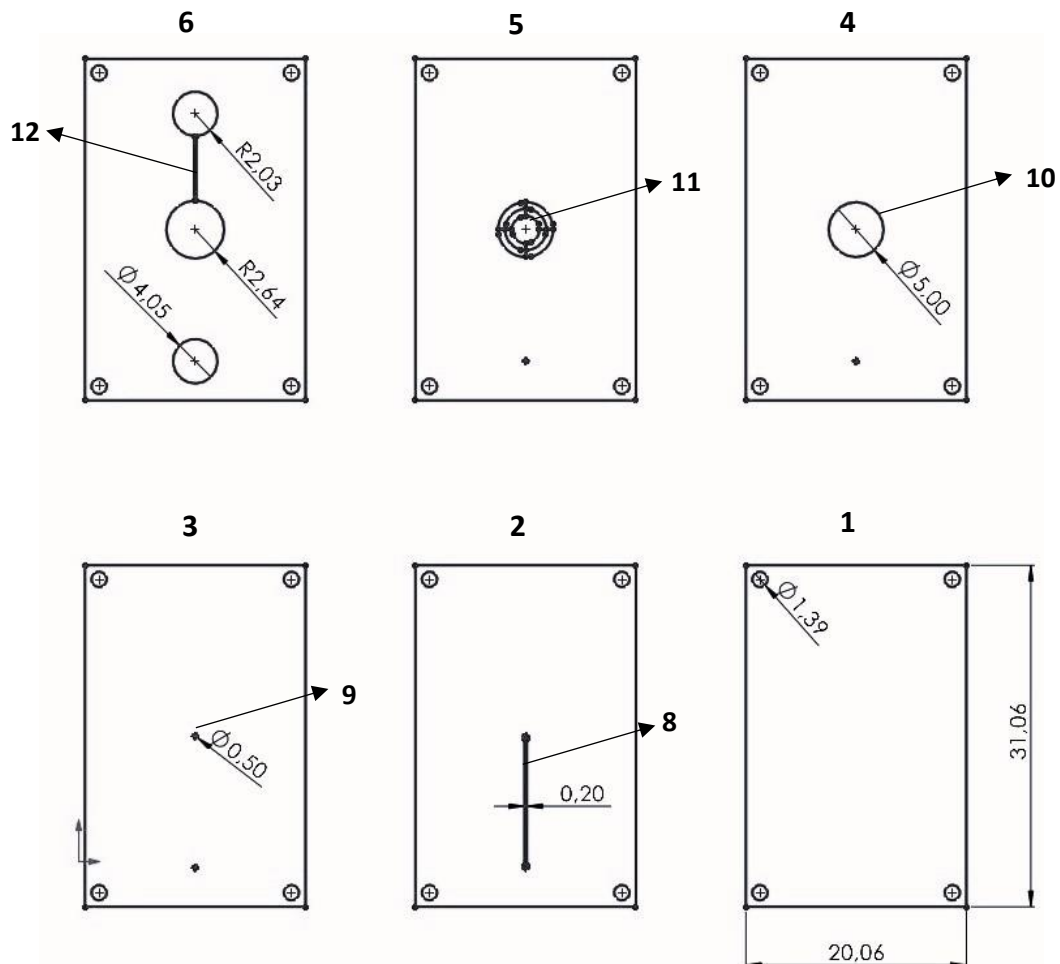
Przedstawiony w tym rozdziale mikrozwór stanowi ważny element wielowarstwowe mikrosystemu PCR, który został opisany w Części III, Rozdziale 6. Zawory zwrotne są istotnym elementem mikrosystemów, w których wymagane jest zapewnienie jednokierunkowego przepływu roztworu. Zapobiegają one również cofaniu się płynu w układzie, przez co umożliwia prowadzenie procesu w bardziej wydajny i kontrolowany sposób. Miniaturyzacja zaworów pozwala na ich integrację z innymi elementami mikroukładu oraz zmniejszenie objętości martwej roztworu. Są one również wykorzystywane jako części większych struktur np. zminiaturyzowanych pomp. Aby mikrozwory posiadały potencjał wykorzystania ich w jednorazowych urządzeniach typu point-of-care (POC) powinny być wykonane w sposób precyzyjny oraz szybki w dostępnych, niedrogich materiałach.

Z powyższych powodów pasywne mikrozwory zwrotne zostały wykonane w elastycznych foliach poliestrowych za pomocą techniki obróbki laserowej. Warto zaznaczyć, że zarówno zastosowane materiały – folie poliestrowe oraz nakładka PMMA, z których został wykonany mikrozwór, są tymi samymi materiałami, które zostały wykorzystane do wytworzenia mikroukładu PCR. Pozwala to na wytworzenie zaworów i mikroukładu w trakcie jednego procesu, co przyczynia się do skrócenia czasu i kosztów produkcji oraz lepszej integracji wszystkich elementów. Zawory te zostały najpierw wykonane jako oddzielne elementy, aby umożliwić przebadanie ich pod względem skuteczności kontrolowania

przepływu, określenia ciśnienia otwarcia zaworu oraz ciśnienia powodującego otwarcie (przeciekanie) zaworów w przepływie wstecznym. Prace nad pasywnymi zaworami zwrotnymi prowadzone były w celu ich możliwego zastosowania w mikroukładzie PCR.

### *Koncepcja mikrozaworu*

Zawory zostały wykonane z polimetakrylanu metylu, folii poliestrowych oraz kauczuku fluorowego. Wykorzystano folie w dwóch wariantach: 3M™ 9965 posiada poliestrowy rdzeń pokryty z dwóch stron klejem akrylowym; 3M™ 9984 posiada poliestrowy rdzeń pokryty warstwą nadającą jej właściwości hydrofilowe. Struktury w obu tych wariantach folii zostały wykonane przy użyciu techniki obróbki laserowej, za pomocą plotera z laserem CO<sub>2</sub>. Są to warstwy oznaczone od 1 do 6 na Rysunku 26.



Rysunek 26: Schemat wielowarstwowego mikrozaworu składających się z folii poliestrowych wycinanych za pomocą plotera laserowego oraz nakładki wykonanej metodą mikrofezowania

Najczęściej przy obróbce materiałów z wykorzystaniem tego typu urządzeń stosowana jest tuba gazowa generująca wiązkę lasera o długości fali 10,6  $\mu\text{m}$ . Promieniowanie to znajduje się jednak w zakresie absorpcji poliestru, z którego wykonane są rdzenie wykorzystywanych folii. Z tego powodu zastosowanie typowej długości fali promieniowania prowadzi często do

nadtopień poliestru w miejscach, które zostały poddane działaniu lasera spowodowane absorpcją promieniowania przez materiał. Zdecydowano o wykorzystaniu promieniowania laserowego o długości fali wynoszącej 9,3  $\mu\text{m}$ . Zmiana ta pozwoliła na zmniejszenie absorpcji promieniowania przez materiał oraz uzyskanie gładszych, pozbawionych nadtopień krawędzi w miejscach cięcia. W celu dobrania odpowiedniej szerokości wyciętych przestrzeni, a co za tym idzie optymalnej elastyczności, do wykonania sprężyny planarnej 11 zastosowano różne wartości mocy lasera. Kauczuk fluorowy Viton<sup>®</sup> został wykorzystany do wykonania zatyczek. W tym celu również zastosowano proces ablacji laserowej dostosowując zarówno grubość materiału jak i wycinając kółka o średnicy 1,5 mm.

Górna warstwa mikrosystemu została wykonana z polimetakrylanu metylu metodą mikrofrezowania. Poszczególne warstwy zostały ze sobą połączone za pomocą kleju akrylowego, który znajdował się po obu stronach folii 3M 9965<sup>™</sup>. Zatyczki kauczukowe zostały umieszczone pod centralną częścią sprężyny planarnej 11 w warstwie 5. Nie były one trwale połączone z pozostałymi elementami mikrozaworu, jednak ze względu na jej wysokość (120-500  $\mu\text{m}$ ), która przewyższała grubość otaczających je folii, były zaciśnięte pomiędzy warstwami 3 i 5. Powodowało to blokowanie otworu dolotowego 9 oraz wstępne odkształcenie sprężyny planarnej. Łączenie poszczególnych warstw przeprowadzono za pomocą specjalnego holdera, który posiadał wypustki odpowiadające otworom justującym znajdującym się w każdej z warstw. Holder ten został wykonany metodą mikrofrezowania. Warstwy były nakładane na siebie pojedynczo z dokładnym dopasowaniem dzięki wspomnianemu holderowi.

#### *Wykonanie mikrozaworu*

Projekt konstrukcji mikrozaworów został przygotowany przy użyciu oprogramowania SolidWorks, który został również wykorzystany do obliczenia przewidywanej objętości martwej. Zaprojektowany i wykonany mikrozawór ma budowę wielowarstwową, składającą się z folii oraz nakładki. Najniższa warstwa 1 stanowiąca podstawę mikroukładu jest wykonana z folii hydrofilowej 3M 9984. W warstwie 2 z folii dwustronnie klejącej 3M 9965 wycięty został mikrokanal o szerokości 200  $\mu\text{m}$ . Hydrofilowa warstwa 3 zamyka od góry kanał 8, z wyjątkiem fragmentów, w których zostały wycięte otwory 9 o średnicy 500  $\mu\text{m}$  umożliwiające przepływ roztworu pomiędzy warstwą 2 i 4. W warstwie 4 został wycięty dwa otwory, jeden o średnicy 500  $\mu\text{m}$  umożliwiający przepływ roztworu pomiędzy warstwami 3 i 5 oraz o średnicy 5 mm. Wycięcie otworu o większej średnicy zapobiega możliwemu przyklejeniu się sprężyny planarnej do folii dwustronnie klejącej oraz tworzy przestrzeń, w której umieszczony został centralnie kauczukowy krążek stanowiący zatyczkę zaworu. Warstwę 5 stanowiła folia

hydrofilowa, w której została wycięta sprężyna planarna 11 pod którą umieszczono zatyczkę oraz otwór umożliwiający przepływ mieszaninie pomiędzy warstwą 4 i 6. Ostatnią warstwą folii była dwustronnie klejąca 3M 9965, w której wycięto 3 otwory. Dwa z nich stanowiły połączenie z wierzchnią nakładką, trzeci zaś został umieszczony centralnie nad sprężyną planarną. Posiadał on średnicę nieco większą od struktury 11 wynoszącą 5,28 mm, tak aby zapobiec sklejeniu się elastycznych elementów sprężyny oraz zapewnić przestrzeń dla wypuklenia spowodowanego przez zatyczkę.

Górną warstwę mikrosystemu (nie została przedstawiona na rysunku) stanowiła nakładka z PMMA wykonana metodą mikrofrezowania). Warstwa ta została oczyszczona za pomocą benzyny ekstrakcyjnej, alkoholu izopropylowego oraz wody destylowanej przed połączeniem z pozostałymi warstwami układu. Na jednej stronie wyfrezowany został częściowy otwór o średnicy 5,28 mm oraz wysokości 0,2 mm, tak aby zapewnić przestrzeń dla odkształconej sprężyny planarnej. Na drugiej stronie nakładki zostały wyfrezowane króćce posiadające otwór przechodzący przez warstwę PMMA na wylot o średnicy 0,5 mm. Zostały one zaprojektowane w taki sposób, aby możliwe było ich połączenie z silikonowymi wężykami.

#### *Zasada działania mikrozaworu*

Kluczowy element mikrozaworu stanowi sprężyna planarna, zatyczka, mikrokanal doprowadzający ciecz oraz mikrokomora. Mikrozwór został wykonany zgodnie z wcześniej opisaną procedurą przy użyciu możliwie jak najmniejszej liczby warstw. W dalszym etapie badań, podczas integracji mikrozaworów z mikrosystemem, liczba warstw została zwiększona, jednak nie zmieniło to główne jego elementy oraz zasada działania pozostała taka sama.

Ciecz wprowadzana jest do mikrozaworu przez silikonowe wężyki połączone z króćcem nakładki 7 z PMMA. Przepływa ona przez kolejne otwory w foliach aż do warstwy 2. Następnie za mikrokanalem 8 ciecz napotyka na fizyczną barierę w postaci kauczukowej zatyczki, która jest dodatkowo dociskana do otworu wlotowego mikrokomory zaworu poprzez sprężynę planarną. Przy zastosowaniu odpowiednio wysokiego ciśnienia wywołanego przepływem następuje otwarcie zaworu poprzez wypchnięcie zatyczki oraz odkształcenie się elastycznych struktur sprężyny planarnej. Dalszy przepływ cieczy powoduje wypełnienie komory nad zaworem, tworzonej przez folie oraz PMMA. Przestrzeń ta stanowi objętość martwą mikrozaworu, jest jednak niezbędna by umożliwić odkształcenie się struktury 11, stanowiące podstawę działania mikrozaworu. Następnie ciecz przepływa przez mikrokanal 12 w warstwie 6, po czym opuszcza układ przez króciec połączony z silikonowym wężykiem.

Opracowana konstrukcja mikrozaworu sprawia, że jest on w pełni pasywny co oznacza, że do jego uruchomienia nie jest potrzebne dostarczenie energii zewnętrznej. Jest on również zaworem zwrotnym, czyli umożliwia przepływ cieczy tylko w jednym kierunku. W konstrukcji mikrozaworu wyróżnione zostały dwa główne elementy, które w znacznym stopniu mogą wpływać na ciśnienie otwarcia mikrozaworu: szerokość elastycznych elementów sprężyny planarnej oraz grubość kauczukowej zatyczki. Warstwowa struktura mikrozaworu pozwalała na łatwą modyfikację obu tych elementów na dowolnym etapie projektowania poprzez zmianę jedynie jednej warstwy folii lub kauczukowej zatyczki. Wykonane mikrozawory charakteryzują się ponadto niewielką objętością martwą (około 8,4  $\mu\text{L}$ ) oraz nadają się do produkcji masowej za pomocą obróbki laserowej.

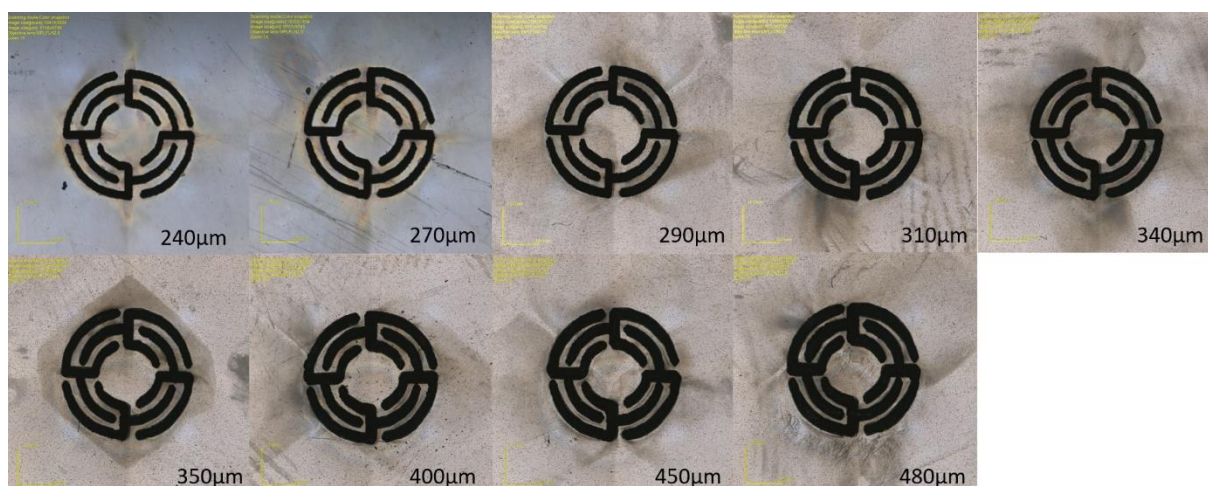
#### *Testy mikrozaworów*

Pomiar ciśnienia otwarcia mikrozaworu mierzono za pomocą czujnika ciśnienia oraz pompy strzykawkowej. W celu przeprowadzenia pomiarów w nakładce PMMA wyfrezowano dodatkowy element w postaci złączki, umożliwiający podłączenie do zaworu silikonowego wężyka. Wężyk ten z drugiej strony łączył się z dopasowanym do niego trójnikiem, do którego podłączone były dwa kolejne wężyki. Jeden z nich zakończony był czujnikiem ciśnienia sterowanym przez platformę Arduino, drugi zaś podłączony był do pompy strzykawkowej. Wężyki w tym układzie zostały wypełnione wodą destylowaną. Uruchomienie pompy strzykawkowej powodowało zwiększenie ciśnienia wywieranego na zawór oraz czujnik. Postępujący wzrost ciśnienia rejestrowany był aż do otwarcia zaworu, które umożliwiało przepływ cieczy oraz nagły spadek ciśnienia. Dalsze działanie pompy powodowało rejestrację przez czujnik okresowego wzrostu ciśnienia, po którym następował jego spadek. Wartość ciśnienia otwarcia zaworu została określona jako największe rejestrowane przez czujnik ciśnienie tuż przed nagłym jego spadkiem.

Szczelność zaworu została przetestowana z wykorzystaniem tych samych elementów i w analogiczny sposób. Jedyną różnicą było dostarczanie cieczy oraz pomiar ciśnienia z drugiej strony zaworu. Konstrukcja mikrozaworu wymusza jednokierunkowy przepływ przez układ, jednak duży wzrost ciśnienia powodował otwarcie zaworu w przepływie zwrotnym, które rejestrowanie było analogicznie do pomiarów ciśnienia otwarcia. Przedstawione wartości ciśnienia otwarcia zaworów przedstawiały dodatkowe potrzebne ciśnienie niezbędne do ich aktywacji, bez uwzględnienia ciśnienia atmosferycznego.

### *Wpływ szerokości struktur sprężyny planarnej na ciśnienie otwarcia mikrozaworu*

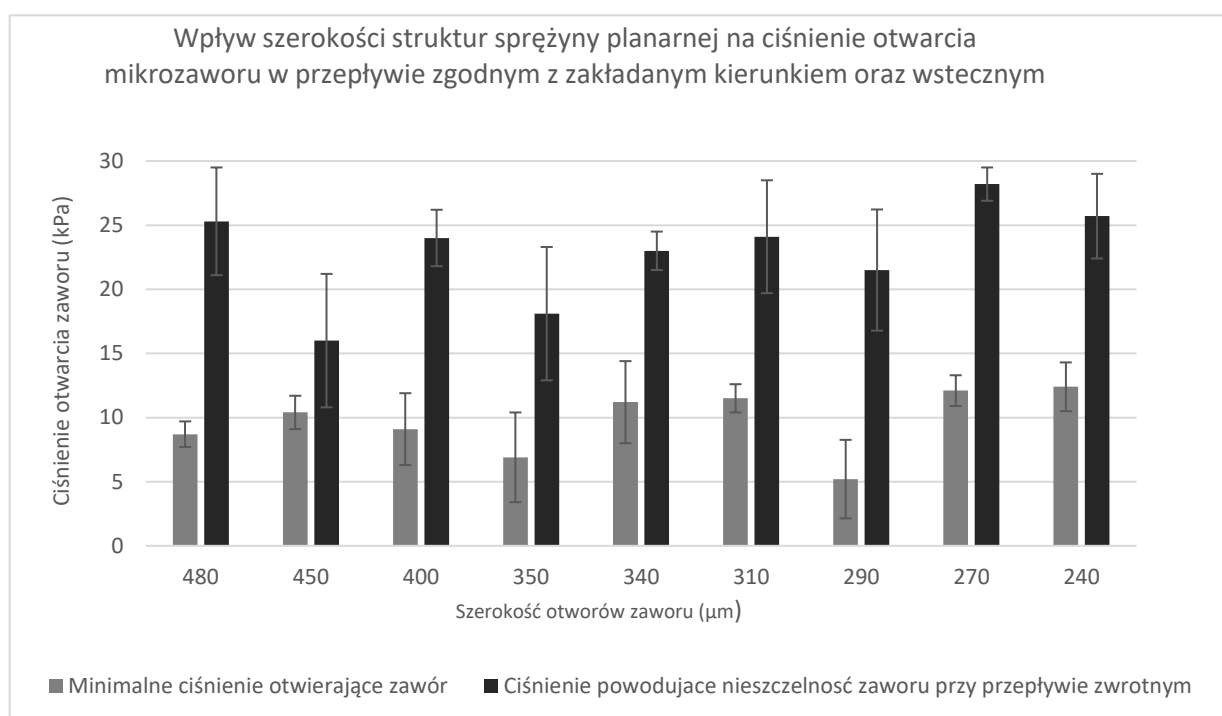
Sprężyna planarna podobnie jak pozostałe elementy mikrozaworu wykonane w foliach, powstała przy użyciu plotera laserowego. W przeciwieństwie do innych struktur, których kształt był określony poprzez precyzyjne wycinanie zaprojektowanych krawędzi, sprężyna planarna została wykonana poprzez działanie lasera na środkową linię cięcia. Oddziaływanie termiczne na folię skutkowało powstaniem ubytków w użytym materiale. Takie podejście do obróbki było wymuszone przez niewielkie odległości pomiędzy zaprojektowanymi liniami sprężyny planarnej. Zastosowanie standardowej metody cięcia laserem wzdłuż krawędzi mogło powodować przerywanie elastycznych elementów sprężyny, co uniemożliwiało jej wykorzystanie do wykonania sprężyn o małej szerokości. Zmiana mocy lasera oddziałującej na linię cięcia pozwoliła na uzyskanie struktur sprężyny planarnej o różnych szerokościach. Wymiary wykonanych w ten sposób elementów zostały zmierzone za pomocą laserowego mikroskopu konfokalnego Olympus OLS 4000 LEXT. Szerokość ubytków powstałych poprzez działanie lasera na folię hydrofilową 3M™ 9984 wynosiła od 240  $\mu\text{m}$  do 480  $\mu\text{m}$  (Rysunek 27).



Rysunek 27: Struktura sprężyny planarnej wykonana poprzez zastosowanie różnych parametrów cięcia. Sprężyny planarne charakteryzowały się różnymi wymiarami ubytków folii hydrofilowej w zakresie od 240 – 480  $\mu\text{m}$ .

Wykonane w ten sposób warstwy folii zostały wykorzystane do stworzenia dziewięciu zaworów testowych, które różniły się jedynie szerokością sprężyny planarnej. Zatyczka w wykonanych mikrozaworach miała grubość 350  $\mu\text{m}$ . Tak powstałe mikrozawory zostały przebadane zgodnie z opisaną wcześniej procedurą mającą określić ciśnienie otwarcia zaworu oraz ciśnienie powodujące nieszczelność zaworów w przepływie wstecznym. Ciśnienie otwarcia mikrozaworu i ciśnienie otwarcia w przepływie wstecznym zostały określone na podstawie pięciu kolejnych odczytów największych wartości ciśnienia przed nagłym jego spadkiem.

Wartości ciśnienia otwarcia poszczególnych mikrozaworów wynosiły od 5,2 do 12,4 kPa, zaś wartości ciśnienia otwarcia mikrozaworów w przepływie wstecznym (niepożądane rozszczelnienie zaworu) wynosiły od 16,0 do 28,2 kPa. Najmniejsza różnica pomiędzy tymi wartościami dla pojedynczego mikrozaworu wynosiła 5,6 kPa, największa zaś 16,6 kPa. Wartości dla poszczególnych zaworów zostały zaprezentowane na wykresie na Rysunku 28. We wszystkich przeprowadzonych testach wartość ciśnienia otwarcia zaworu przy zastosowaniu przepływu zgodnym z kierunkiem wyznaczonym przez strukturę mikrozaworów była mniejsza niż w przypadku przepływu w odwrotnym kierunku. Świadczy to o uprzywilejowanym kierunku przepływu, który wynika bezpośrednio z konstrukcji mikrozaworu. Nie został zaobserwowany wyraźny związek pomiędzy szerokością sprężyn planarnych wyciętych w foliach, a wartościami ciśnienia otwarcia w przepływie wstecznym.

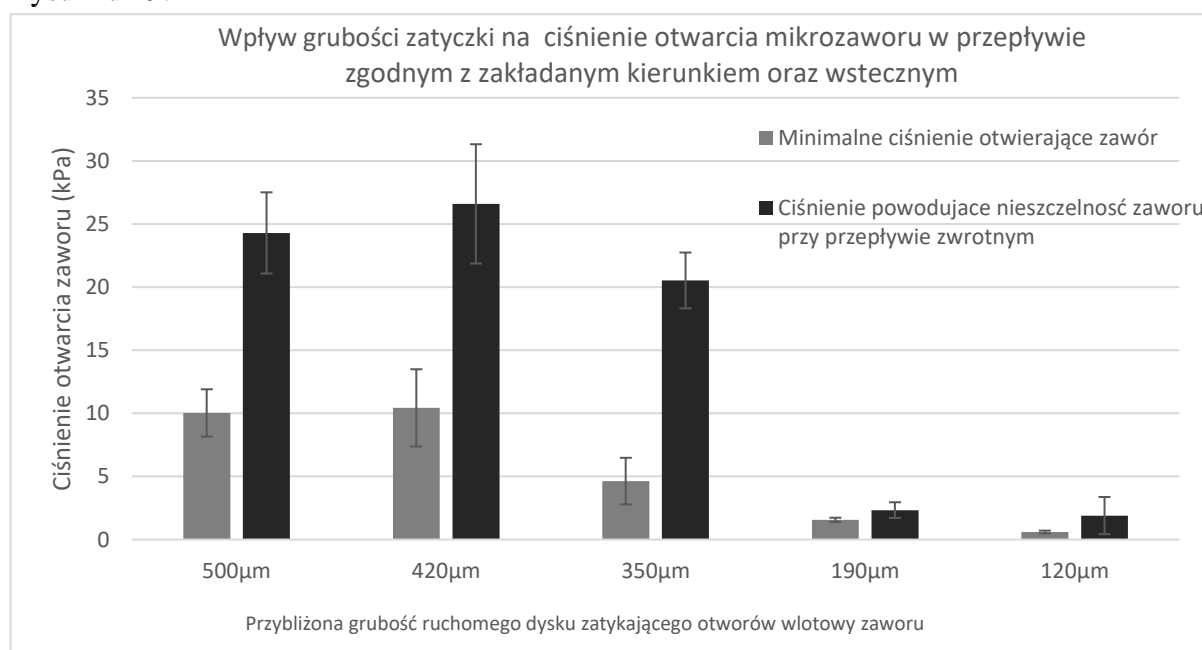


Rysunek 28: Wpływ szerokości ubytków spowodowanych cięciem lasera w sprężynie planarnej na ciśnienie otwarcia zaworu zarówno w przepływie zgodnym z kierunkiem oraz wstecznym.

W przypadku ciśnienia otwarcia zaworu przy przepływie w preferowanym kierunku również nie zaobserwowano wyraźnej zależności. Obserwowane były nieco niższe wartości otwarcia mikrozaworów o cienkich sprężynach planarnych, w porównaniu do grubszych. Dla dwóch zaworów o najcieńszych sprężynach ciśnienie otwarcia jest o 5,4 kPa niższe niż dla dwóch zaworów o najgrubszych sprężynach. Zależność ta nie wydaje się jednak kluczowa, biorąc pod uwagę znacznie większe różnice dla mikrozaworów różniących się grubością kauczukowej zatyczki.

### *Wpływ grubości zatyczki na ciśnienie otwarcia mikrozaworu*

Zatyczka, będąca jednym z kluczowych elementów opracowanego mikrozaworu, została wykonana w kauczuku fluorowym Viton®. Celem tej struktury jest wstępne odkształcenie sprężyny planarnej oraz blokowanie kanału dolotowego w warunkach przepływu wstecznego. Aby zbadać wpływ wysokości zatyczki na ciśnienie otwarcia zaworu oraz ciśnienie otwarcia w przepływie wstecznym wykonano szereg zatyczek różniących się między sobą wysokością. Zastosowano technikę ablacji laserowej, w celu termicznego usunięcia wierzchniej warstwy kauczuku fluorowego, a następnie wycięto w niej dyski o średnicy 2,5 mm. Wysokości uzyskanych w ten sposób zatyczek mierzono za pomocą laserowego mikroskopu konfokalnego Olympus OLS 4000 LEXT. Ustalone parametry pracy plotera laserowego pozwoliły na uzyskanie powtarzalnych wysokości wytwarzanych zatyczek (RSD 8,2%). Wykonane elementy zostały wykorzystane do stworzenia pięciu zaworów testowych, które różniły się jedynie wysokością zatyczki. Zastosowano w nich warstwę folii z sprężyną planarną o szerokości ubytków wykonanych za pomocą lasera wynoszącą 240 μm. Powstałe zawory zostały wykorzystane do badań mających określić ciśnienie otwarcia zaworu oraz ciśnienie powodujące nieszczelność zaworów w przepływie wstecznym zgodnie z opisaną wcześniej procedurą. Ciśnienie otwarcia mikrozaworu i ciśnienie otwarcia w przepływie wstecznym zostały określone na podstawie pięciu kolejnych odczytów największych wartości ciśnienia przed nagłym jego spadkiem. Odpowiadające im wartości zostały przedstawione na Rysunku 29.



Rysunek 29: Wpływ wysokości zatyczki na ciśnienie otwarcia zaworu w przepływie zgodnym z kierunkiem oraz wstecznym.



Wartości otwarcia mikrozaworów mieściły się w zakresie od 0,6 do 10,4 kPa, zaś wartości ciśnienia otwarcia mikrozaworów w przepływie wstecznym wynosiły od 1,9 do 26,6 kPa. Najmniejsza różnica dla pojedynczego mikrozaworu pomiędzy wartościami ciśnienia otwarcia a ciśnienia otwarcia w przepływie wstecznym wynosiła 0,8 kPa, największa zaś 16,2 kPa. Wartości ciśnienia otwarcia dla poszczególnych zaworów zostały przedstawione na Rysunku 29. We wszystkich przeprowadzonych testach wartość ciśnienia otwarcia zaworu przy zastosowaniu przepływu zgodnym z kierunkiem wyznaczonym przez strukturę mikrozaworów była mniejsza niż w przypadku przepływu w odwrotnym kierunku. Świadczy to o uprzywilejowanym kierunku przepływu, który wynika bezpośrednio z konstrukcji mikrozaworu. Zaobserwowano wyraźną różnicę ciśnienia otwarcia mikrozaworu, zarówno w przypadku przepływu w preferowanym kierunku jak i w przepływie wstecznym, w zależności od wysokości zastosowanej zatyczki. Mikrozawory posiadające zatyczki o większej wysokości (500  $\mu\text{m}$ , 420  $\mu\text{m}$ , 350  $\mu\text{m}$ ) wykazywały znacznie wyższe wartości ciśnienia otwarcia niż mikrozawory z zatyczkami o mniejszej wysokości (190  $\mu\text{m}$ , 120  $\mu\text{m}$ ).

Otrzymane wyniki wskazują, że zatyczki o niskiej wysokości nie pozwalają na odkształcenie sprężyny planarnej, a zatem nie istnieje również siła, która powodowałaby ich unieruchomienie nad kanałem wlotowym mikrozaworu. Zatyczki o większych wysokościach oddziałują wzajemnie z sprężyną planarną, która dociska je do kanału wlotowego, blokując przepływ wsteczny oraz przepływ w preferowanym kierunku aż do wygenerowania ciśnienia zbliżonego do ustalonego doświadczalnie ciśnienia otwarcia zaworu. Można stwierdzić że, mikrozawory posiadające zatyczki o grubościach 500  $\mu\text{m}$ , 420  $\mu\text{m}$  oraz 350  $\mu\text{m}$  mają potencjał do zastosowania w układach mikroprzepływowych. Wartości ciśnienia potrzebne do otwarcia zaworu są stosunkowo niewielkie i mogą zostać wygenerowane na wiele sposobów. Z drugiej strony wartości ciśnienia otwarcia zaworu w przepływie zwrotnym są o tyle większe od ciśnienia otwarcia w preferowanym przepływie, że pozwalają na prowadzenie mieszaniny w jednym, pożądanym kierunku.

Prowadzone badania doprowadziły do opracowania pasywnego mikrozaworu zwrotnego. Wykonany on został z nieoczystych materiałów (folie poliestrowe: 3M™ 9965 i 3M™ 9984) z wykorzystaniem jako techniki mikroobróbki ablacji laserowej. Zaprojektowana struktura wymuszała przepływ cieczy w jednym kierunku, dzięki czemu mikrozawór był w pełni pasywny, co potwierdziły przeprowadzone badania. Minimalne ciśnienie potrzebne do otwarcia mikrozaworu dla przepływu cieczy w zakładanym kierunku było mniejsze od minimalnego ciśnienia otwarcia zaworu w przepływie wstecznym. Takie wyniki uzyskano

niezależnie od zmiennych, które mogły mieć największy wpływ na działanie mikrozaworu, czyli od szerokości struktury sprężyny planarnej oraz od grubości zatyczki. Opracowany mikrozwór stanowił istotny element wielowarstwowego mikrosystemu PCR, dlatego został początkowo wykonany oraz testowany jako niezależny element.

## 6. Wielowarstwowy przepływowy mikroukład PCR z zintegrowanym systemem mikrozworów pasywnych

W ramach prowadzonych badań opracowany został szereg mikrosystemów, które zostały przedstawione w niniejszej pracy. Opisane zostały mikrosystemy hybrydowe PDMS/szkoło o geometrii serpentynowej oraz cyklicznej, a także mikrosystemy cykliczne wykonane z PMMA. Zdobyte doświadczenie oraz przeprowadzone badania pozwoliły określić kluczowe parametry, które powinny charakteryzować mikrosystem PCR.

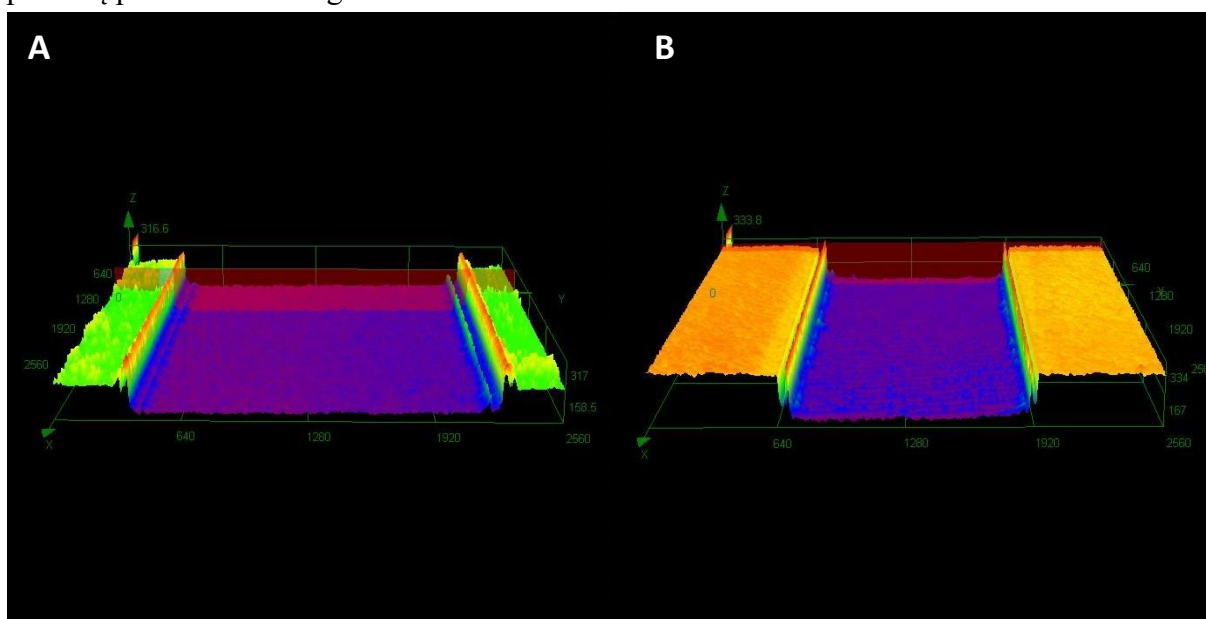
Materiał konstrukcyjny, poza oczywistymi parametrami takimi jak stabilność w szerokim zakresie temperaturowym oraz stabilność chemiczna, powinien charakteryzować się brakiem adsorpcji składników mieszaniny na jego powierzchni. Sposób łączenia poszczególnych elementów lub warstw mikrosystemu powinien zapewniać jego szczelność, tak aby ciśnienie wewnątrz mikrokanałów wywołane przez generowany przepływ nie prowadziło do niekontrolowanego wydostawania się mieszaniny reakcyjnej poza wyznaczone mikrostruktury. Warstwa mikrosystemu, która ma bezpośredni kontakt z systemem grzewczym powinna mieć jak najmniejszą grubość lub charakteryzować się wysoką przewodnością cieplną. Materiał konstrukcyjny oraz technika jego mikroobróbki powinna zapewniać wysoką jakość odwzorowanych struktur oraz ich powtarzalność.

Wymienione powyżej wymagania mogą zostać spełnione poprzez zastosowanie jako materiału konstrukcyjnego folii poliestrowych łączonych ze sobą poprzez cienkie warstwy kleju akrylowego. Tego rodzaju materiały są dostępne komercyjnie, także w wariantach specjalnie przeznaczonych do zastosowań diagnostycznych. Z tego powodu zdecydowano na wykonanie mikrosystemu PCR z wykorzystaniem tego materiału przy użyciu jako techniki obróbki ablacji laserowej.

### *Wykonanie mikrosystemu*

Mikrosystem został wykonany z folii poliestrowych 3M™ 9984 i 3M™ 9965, tych samych które zostały wykorzystane do konstrukcji mikrozworu. Podobnie jak w przypadku opracowanego mikrozworu, istotnym elementem było dostosowanie parametrów lasera, tak

aby uniknąć nadtopień krawędzi mikrostruktur. Na Rysunku 30 zostały przedstawione przykładowe zdjęcia porównujące jakość wykonanych struktur w foliach poliestrowych za pomocą plotera laserowego.

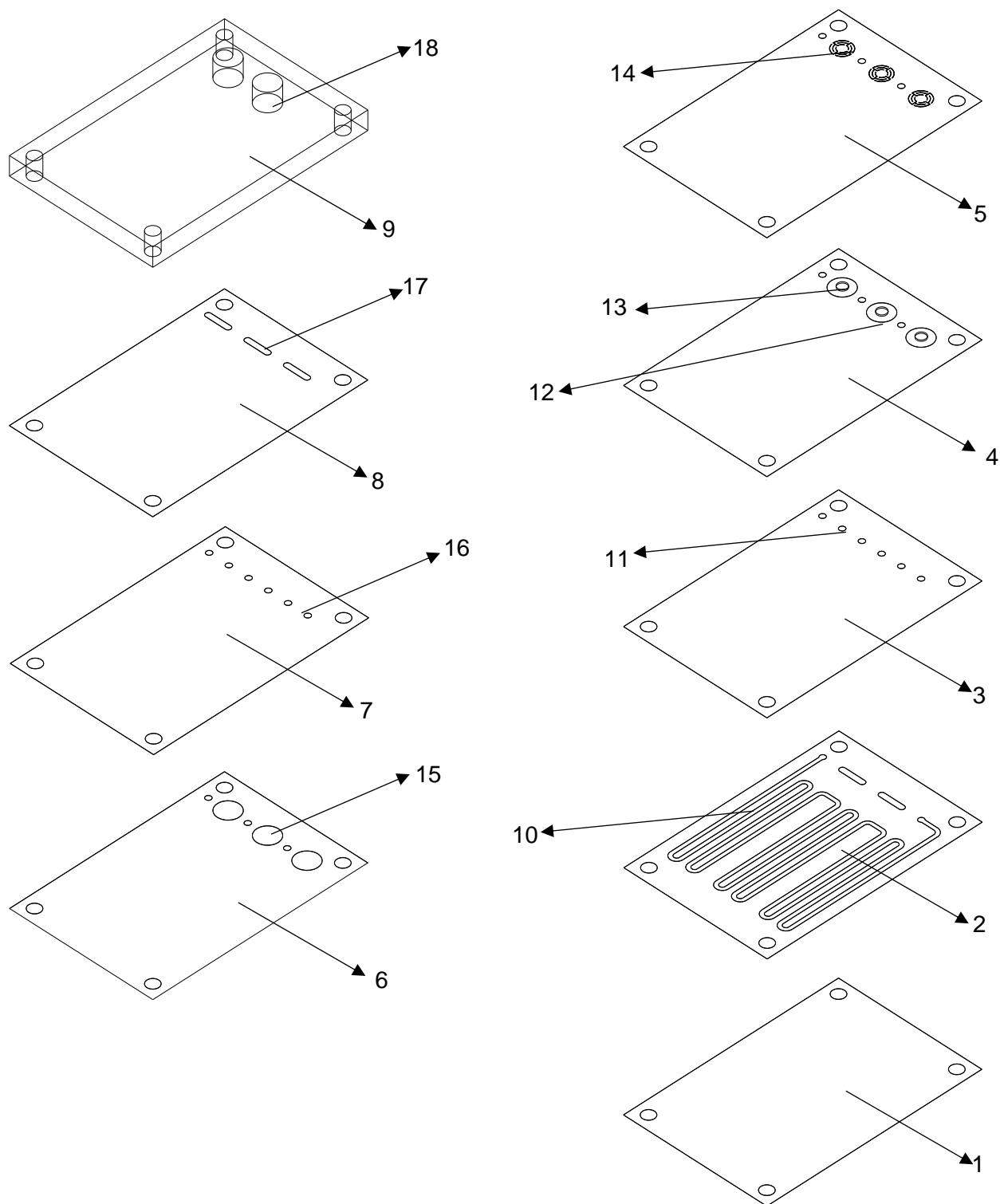


Rysunek 30: Zdjęcia 3D wykonane za pomocą mikroskopu LEXT 4000 przedstawiające krawędzie mikrokanałów wykonanych w foliach poliestrowych. A) Widoczne nadtopienia krawędzi; B) Brak widocznych nadtopień.

Warstwy naprzemiennie ułożonych folii hydrofilowych oraz dwustronnie klejącej zostały oznaczone na Rysunku 31 jako warstwy od 1 do 8. Nakładka, stanowiąca wierzchnią warstwę 9, została wyfrezowana w PMMA. Zatyczka z kauczuku fluorowego była wykonana metodą obróbki laserowej. Poszczególne warstwy mikrosystemu była ze sobą łączone przy pomocy specjalnie w tym celu wyfrezowanego holdera, który zapewniał dopasowanie do siebie odpowiednich struktur.

#### *Budowa mikrosystemu*

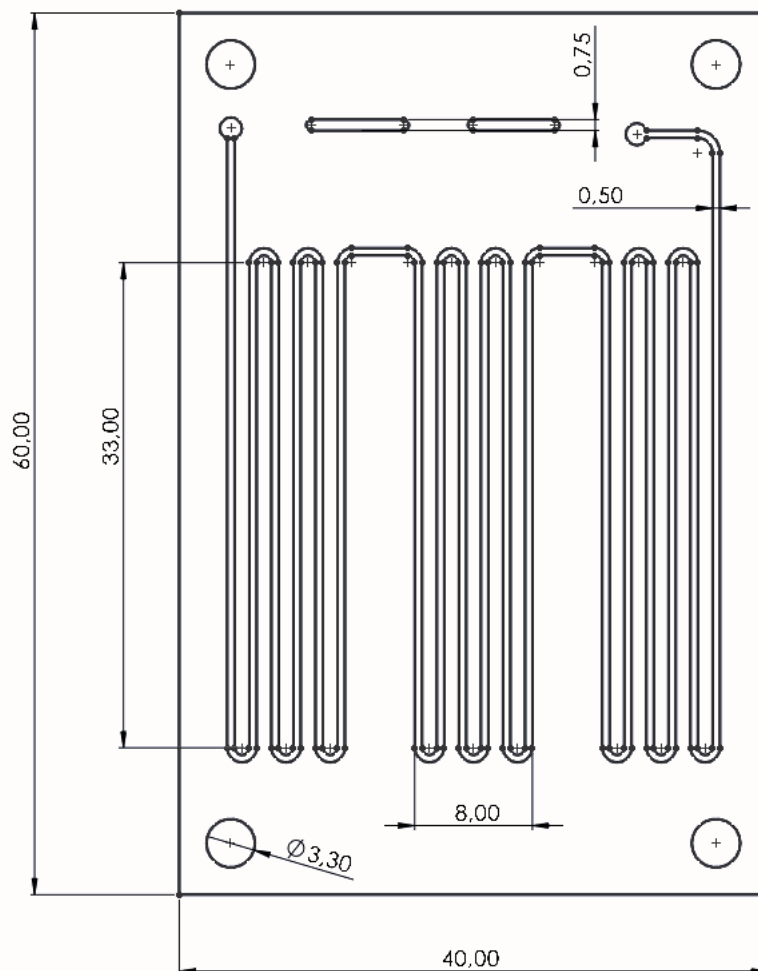
Opracowany mikrosystem ma budowę wielowarstwową, składającą się z folii oraz nakładki. Najniższa warstwa 1 stanowiąca podstawę mikrosystemu jest wykonana z folii hydrofilowej 3M 9984. Warstwa 1 stanowi również dno mikrokanalu 10, który został wykonany w warstwie 2 z folii dwustronnie klejącej 3M 9965. Kanał 10 o szerokości 500  $\mu\text{m}$  posiada serpentynową strukturę, która składa się z osiemnastu równoległych odcinków podzielonych na trzy strefy (sześć odcinków w każdej strefie). Dokładne wymiary struktur wykonanych w warstwie 2 zostały przedstawione na Rysunku 32. Hydrofilowa warstwa 3 zamyka od góry kanał 10, z wyjątkiem fragmentów, w których zostały wycięte otwory 11 o średnicy 1mm stanowiące kontynuacje mikrokanalu do kolejnych warstw. Warstwa hydrofilowa 3 posiada wycięte otwory, które są całkowicie zasłanianie przez zatyczki 13 oraz



Rysunek 31: Schemat budowy wielowarstwowego mikrosystemu PCR z wyróżnieniem poszczególnych warstw.

otwory umożliwiające przepływ roztworu poprzez warstwy. W warstwie 4 zostały wycięte otwory 12 o średnicy 5 mm położone koncentrycznie do otworów 11 z warstwy 3 oraz otwory stanowiące kontynuację mikrokanalów. W środkowych częściach otworów 12 umieszone są

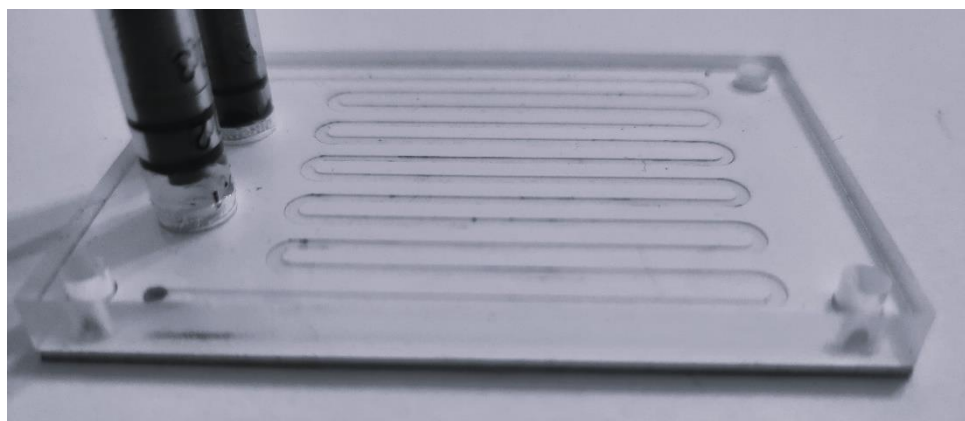
zatycki 13. W hydrofilowej warstwie 5 zostały wycięte otwory zapewniające kontynuację przepływu pomiędzy warstwami oraz sprężyną planarną 14. Pod centralnymi punktami sprężyny planarnej 14 umieszczone są zatycki z kauczuku fluorowego Viton® 13 o grubości 350  $\mu\text{m}$  i średnicy 1,5 mm. Dwustronnie klejąca warstwa 6 posiada otwory 15 o średnicy 5,24 mm, które są ułożone koncentrycznie do sprężyny planarnej 14. Hydrofilowa warstwa 7 posiada otwory 16, które umożliwiają przepływ roztworu poprzez warstwy. W dwustronnie klejącej warstwie 8 zostały wycięte kanały 17, które łączą ze sobą odpowiednie otwory z poprzednich warstw. Kanały te są ograniczone przez hydrofilową warstwę 7 oraz nakładkę 9 wykonaną z polimetakrylanu metylu, w której znajdują się dwa otwory 18 będące gniazdami dla ruchomych króćców tłoków.



Rysunek 32: Schemat przedstawiający geometrię warstwy 2 mikrosystemu PCR wykonanego w foliach poliestrowych. Przedstawiona warstwa została wykonana w folii dwustronnie klejącej. Zawiera ona kluczowe dla działania mikrosystemu kanały reakcyjne, w których prowadzona jest reakcja PCR.

### *Zasada działania mikrosystemu*

Mikrosystem działa na zasadzie wymuszonego przez zewnętrzne tłoki przepływu, który jest ukierunkowany poprzez pasywne zawory zwrotne. Roztwór w rezerwuarze 18 pod wpływem zewnętrznego ciśnienia przepływa przez odcinek mikrokanalu w warstwie 8, a następnie rozdziela się w dwóch kierunkach do niższych warstw układu. Na poziomie warstw 5, 4, 3 roztwór napotyka na barierę w postaci sprężyny planarnej 14 i zatyczki 13. Sprężyna planarna 14 powoduje dociskanie zatyczki 13 do otworu w warstwie 11, blokując przepływ. Jedyną możliwą drogą dla roztworu jest przepływ poprzez kolejne warstwy mikrosystemu rozpoczynając na warstwie 8 i kończąc na warstwie 2. W warstwie drugiej roztwór przepływa poprzez długi mikrokanal podzielony na 3 strefy, które mogą zostać ogrzane do temperatur niezbędnych do zajścia poszczególnych cykli reakcyjnych PCR. Ułatwieniem w zajściu reakcji i dostosowaniu temperatury jest bliskość roztworu do systemów grzewczych, gdyż są one rozdzielone poprzez warstwę 1 o grubości 100  $\mu\text{m}$ . Roztwór przepływa następnie poprzez kolejne warstwy z 2 do 8, napotykając na swojej drodze zawór, który może zostać otwarty przy użyciu odpowiedniego ciśnienia, a zapobiega cofaniu się cieczy. Roztwór następnie przepływa ponownie z warstwy 8 w do 2, a następnie z powrotem, po drodze napotykając na zawór, który może zostać otwarty przy odpowiednim ciśnieniu. Ruch tłoka w drugim otworze warstwy 9 powoduje wymuszenie przepływu z warstwy 2 do 8 również w jednym kierunku, ze względu na zastosowany zawór. Ostatecznie roztwór powraca do początkowego rezerwuaru. Przy zastosowaniu tak skonstruowanego mikroukładu i ruchu dwóch zewnętrznych tłoków, możliwa jest cyrkulacja roztworu w jednym kierunku. Struktura i rozłożenie mikrokanalów pozwala na zastosowanie mikrokanalu do przeprowadzenia łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR). Połączone warstwy mikrosystemu zostały przedstawione na zdjęciu na Rysunku 33.



Rysunek 33: Zdjęcie wielowarstwowego mikrosystemu PCR wykonanego w foliach poliestrowych oraz PMMA. Na zdjęciu widoczna są zewnętrzne tłoki, które zostały wykorzystane do generowania przepływu w

### *Generowanie przepływu w mikrosystemie*

Elementem wywołującym przepływ w mikrosystemie były dwa naprzemiennie podnoszące się oraz opadające tłoki. Zostały one wykonane na bazie strzykawek, do których zewnętrznej średnicy zostały dopasowane wymiary otworów 18 wyfrezowanych w nakładce PMMA. Bezpośredni kontakt z roztworem miała jedynie krańcowa część tłoka, która pełniła również funkcję gumowej uszczelki. Generowanie przepływu było możliwe dzięki zastosowaniu w mikrosystemie systemu mikrozaworów, które wymuszały jednokierunkowy ruch roztworu. Ruch tłoków wywoływany był przez prosty mechanizm bazujący na dwóch solenoidach, który wymaga udoskonalenia oraz pełnej automatyzacji. Niemniej jednak na podstawie wizualnej obserwacji cyrkulacji roztworu wodnego z barwnikiem w mikroukładzie, oszacowano wstępnie zakres generowanych przepływów na 20 – 200  $\mu\text{L}/\text{min}$  w zależności od częstotliwości pracy tłoków.

### *Wykorzystanie wielowarstwowego mikrosystemu z zintegrowanymi zaworami w celu prowadzenia reakcji PCR*

Opracowany mikrosystem wykorzystano do przeprowadzenia szeregu reakcji PCR. System grzałek ustawiono w kolejności odpowiadającej następujących po sobie etapach reakcji. Były one odizolowano od mikrokanalu jedynie poprzez pojedynczą warstwę folii o grubości 100  $\mu\text{m}$ , co pozwoliło na wydajną wymianę ciepła oraz uzyskanie pożądaných temperatur w poszczególnych strefach pomimo niezgodnego z gradientem ułożenia grzałek. Podobnie jak w przypadku poprzednich mikrosystemów zdecydowano się na przetestowanie go pod względem możliwej adsorpcji DNA lub polimerazy w mikrostrukturach. Na podstawie wyników otrzymanych za pomocą elektroforezy żelowej, nie zaobserwowano wspomnianych czynników inhibujących reakcję.

Mikrosystem wykorzystano do przeprowadzenia zarówno standardowej jak i asymetrycznej reakcji PCR z wykorzystaniem mieszaniny reakcyjnej różniącej się stężenia jednego ze starterów (Tabela 7, o odpowiednio Stężenie 1 i Stężenie 2). Przepływ roztworu w mikrosystemie ustalono na około 100  $\mu\text{L}/\text{min}$ , co odpowiadało przeprowadzeniu 30 cykli reakcyjnych w przeciągu 17,5 minut. Całkowita objętość mikrosystemu została obliczona na 59  $\mu\text{L}$  (w tym 39  $\mu\text{L}$  właściwego mikrosystemu oraz około 20  $\mu\text{L}$  objętości martwej). Mieszanina poreakcyjna reakcji aPCR prowadzonej z wykorzystaniem opracowanego mikrosystemu została wykorzystana w badaniach z wykorzystaniem opracowanego biosensora. Zajście reakcji oraz amplifikację określonego fragmentu potwierdziły zarówno badania z wykorzystaniem biosensora jak i obserwacja prążków w żelu po rozdzielaniu

elektroforetycznym. Potwierdziło to możliwość zastosowania wykonanego mikrosystemu do przeprowadzania reakcji PCR w czasie znacznie krótszym w porównaniu z tradycyjnym mikrosystemem (17,5 minuty vs. 1 godzina 40 minut).

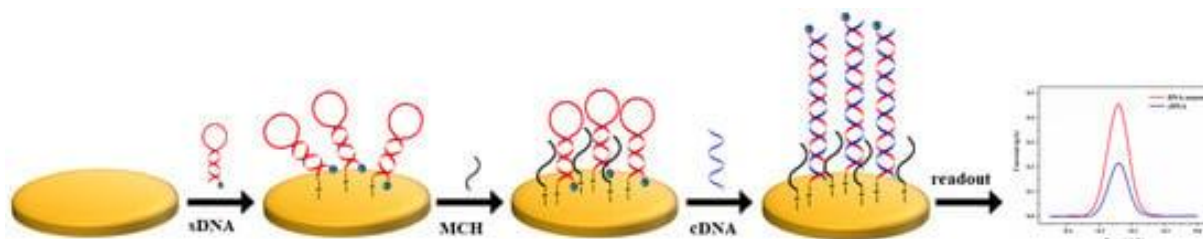
*Zalety wykorzystania folii poliestrowych jako materiału konstrukcyjnego mikrosystemów PCR*

Zapotrzebowanie na szybkie i tanie testy diagnostyczne oparte o reakcje PCR jest coraz większe. Zastosowanie mikrosystemów PCR pozwala na skrócenie czasu trwania reakcji oraz nie wymaga licznego personelu. Użyte w konstrukcji mikrosystemu folie są przystosowane do wykorzystania w wysokowydajnych liniach produkcyjnych typu *roll-to-roll*. Dodatkowo zastosowana technologia obróbki materiału w postaci wycinania struktur za pomocą plotera laserowego może być zintegrowana na liniach produkcyjnych typu *roll-to-roll*. Kluczową wartość przedstawionego rozwiązania stanowi całkowita integracja pasywnych zaworów zwrotnych z materiałem konstrukcyjnym mikroukładu. Zapewnia ona szczelność wykonanych konstrukcji oraz możliwość szybkiej i taniej produkcji. Wykonanie mikrozaworów w foliach poliestrowych jest możliwe dzięki ich elastycznym właściwościom. Ich zastosowanie jako materiału konstrukcyjnego w mikrosystemach PCR pozwala na zapewnienie bliskiego kontaktu elementów grzewczych z mikrokanalami, w których odbywa się reakcja (100  $\mu\text{m}$ ), co umożliwia wydajną wymianę ciepła. Wykorzystane folie charakteryzują się brakiem adsorpcji składników mieszaniny reakcyjnej na swojej powierzchni oraz pozwalają na szczelne połączenie poszczególnych warstw.



## 7. Biosensor

Do badań wybrano konstrukcję biosensora działającego według mechanizmu rozpoznawania molekularnego typu „hairpin”, opisanego w części literaturowej (Część I. Rozdział 2.2.). Bazuje ona na zastosowaniu jednoniciowego fragmentu łańcucha DNA (ssDNA), zmodyfikowanego na jednym końcu grupą tiolową, a na drugim cząsteczką znacznika redoks (nazywanym dalej sondą). Schemat tworzenia warstwy receptorowej biosensora oraz sposób uzyskiwania sygnału analitycznego został przedstawiony schematycznie na Rysunku 34 [107].



Rysunek 34: Schemat tworzenia warstwy receptorowej elektrochemicznego biosensora DNA typu „spinka do włosów” oraz zasada jego działania. Na powierzchni przetwornika (w tym przypadku elektrody złotej) unieruchamiane są sondy, a następnie wypełniacz (w tym przypadku MCH). Obecność w próbce cDNA prowadzi do rozplątania wewnętrznej struktury sondy i hybrydyzacji z analitem. Prowadzi to do oddalenia znacznika redoks od powierzchni elektrody, a co za tym idzie spadku rejestrowanego prądu. Źródło ilustracji - [107]

Na oczyszczonej powierzchni dyskowej elektrody pracującej nanoszony był roztwór zawierający sondę, która poprzez grupę tiolową wiązała się z powierzchnią złota, a następnie nakraplano roztwór zawierający wypełniacz, który pozwalał na uporządkowanie struktury warstwy receptorowej. Sekwencja nukleotydów sondy dobierana była tak, by w sposób specyficzny wiązała się z wykrywanym analitem. Każda sonda zaimmobilizowana na powierzchni elektrody złotej posiadała dowiązany kowalencyjnie znacznik elektrochemiczny (zastosowano błękit metylenowy). Struktura drugorzędowa sond, pod nieobecność w próbce komplementarnego fragmentu ssDNA, powodowała zbliżenie znacznika do elektrody, czego skutkiem były rejestrowane odpowiedzi prądowe. Hybrydyzacja, która zachodzi między jednoniciowym DNA i komplementarnym do niego fragmentem sondy, zwiększa odległość pomiędzy znacznikiem redoks a powierzchnią elektrody, co powoduje zmniejszenie natężenia prądu. Sygnał analityczny został zdefiniowany jako zmiana rejestrowanego sygnału elektrochemicznego, obliczonego na podstawie równania:

$$\text{Zmiana sygnału} = \frac{I_0 - I}{I_0} \cdot 100\% \quad (2)$$

Gdzie:  $I_0$  – natężenie prądu rejestrowanego przed etapem hybrydyzacji;  $I$  – natężenie prądu rejestrowanego po etapie hybrydyzacji.

W niniejszej pracy wykorzystywano trójelektrowy układ pomiarowy (Część II, Rozdział 7), w którym elektrodą pracującą była złota elektroda dyskowa. Badania rozpoczęto wyбором jednej z czterech sond (TOX 1-4), która będzie wchodzić w skład warstwy receptorowej (Rozdział 7.1). W badaniach wstępnych jako wypełniacz stosowano merkaptoheksanol (MCH), który w dalszej części pracy (Rozdział 7.6.) został porównany z dietyloditiokarbaminianem (DEDTC). W kolejnych rozdziałach pracy badano wpływ stężenia kationów magnezu w buforze hybrydazyjnym, temperatury pomiarów (Rozdział 7.2.) oraz dodatku do próbki DMSO (Rozdział 7.3.) na odpowiedź biosensora. Opracowane zostały również biosensory z wykorzystaniem zminiaturyzowanych przetworników trójelektrowych (Rozdział 7.5.). W Rozdziale 8 została przedstawiona koncepcja urządzenia służącego do wykrywania zjadliwego szczepu błonicy, które wykorzystuje opracowany i przedstawiony w Rozdziale 7 biosensor.

### 7.1. Wybór sekwencji nukleotydów w sondzie

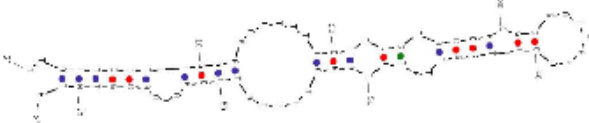
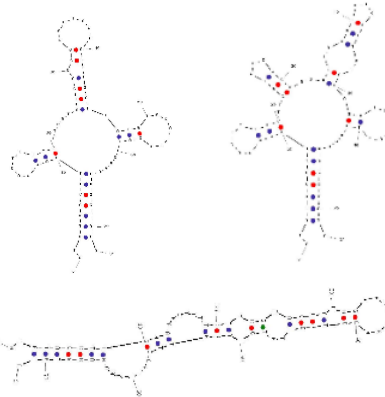
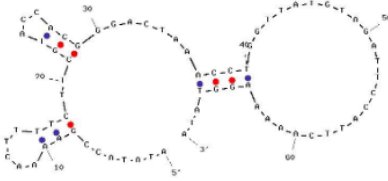
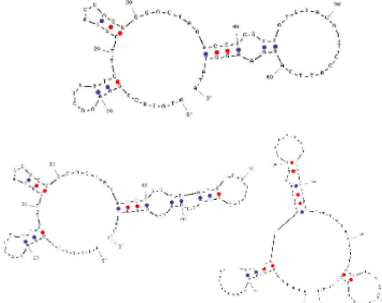
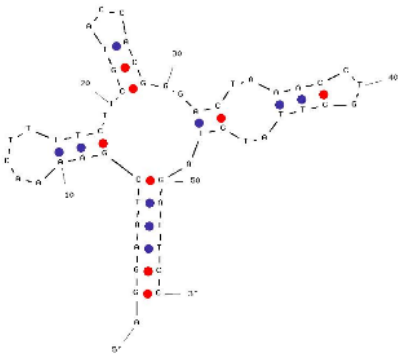
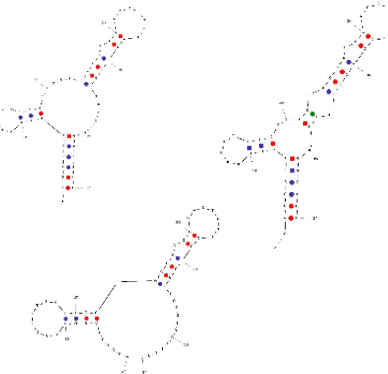
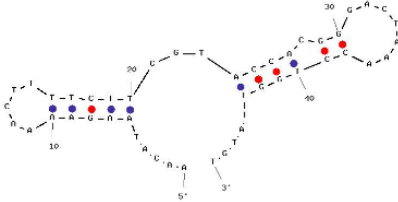
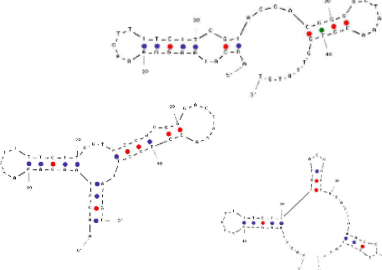
Aby dana sekwencja zadziałała jako sonda typu hairpin muszą zostać spełnione pewne podstawowe warunki. Sekwencja nukleotydów sondy powinna być dobrana w taki sposób, aby zawierała krótkie fragmenty wzajemnie komplementarne wewnątrz ssDNA. Dzięki temu możliwe jest tworzenie struktur drugorzędowych o charakterystycznym kształcie typu hairpin. Ponadto sekwencja nukleotydów sondy powinna być komplementarna do wykrywanego analitu, co umożliwi kluczowy proces hybrydacji sondy z wykrywanym fragmentem ssDNA.

Wybrane do badań sekwencje nukleotydów (TOX 1-4) oraz ich struktury drugorzędowe, wyznaczone na podstawie oprogramowania firmy Integrated DNA Technologies [108], są zamieszczone w Tabeli 8. W kolumnie pierwszej przedstawione zostały najbardziej prawdopodobne struktury dla każdej z sond, charakteryzujące się najniższą energią Gibbsa. W drugiej kolumnie umieszczone zostały trzy najbardziej prawdopodobne struktury drugorzędowe dla każdej sondy.

Kropki zaznaczone na rysunkach odpowiadają miejscom, w których sekwencje nukleotydowe są komplementarne do siebie wewnątrz jednego łańcucha, co umożliwia tworzenie struktury drugorzędowej typu spinka do włosów. Czerwone kropki odpowiadają

wiązaniu wodorowemu pomiędzy guaniną a cytozyną, zaś niebieskie kropki wiązaniu wodorowemu pomiędzy adeniną a tyminą.

Tabela 8: Zestawienie wybranych sekwencji sond TOX 1-4 oraz ich przewidywane struktury drugorzędowe.

Struktura drugorzędowa sondy o najniższej energii	Trzy inne najbardziej stabilne możliwe struktury drugorzędowe sondy
<p><b>TOX 1 / -6.58 [kcal·mol<sup>-1</sup>]</b>                      5' –thiol - A tataacct GAA AAC TTT TCT TCG TAC CAC GGG ACT                      AAA CCT GGT TAT GTA GAT TCC ATT CAA AAA GGT ATA –                      AttoMB2 - 3'</p>  <p><b>Długość trzonu: 7 pz</b>  <b>Długość pętli: 57 nukleotydów</b></p>	
<p><b>TOX 2 / -4.79 [kcal·mol<sup>-1</sup>]</b>                      5' –tiol - A tataacc GAA AAC TTT TCT TCG TAC CAC GGG ACT AAA                      CCT GGT TAT GTA GAT TCC ATT CAA AAA GGT ATA – Atto MB2                      -3'</p>  <p><b>Długość trzonu: 6 pz</b>  <b>Długość pętli: 57 nukleotydów</b></p>	
<p><b>TOX 3 / -5.58 [kcal·mol<sup>-1</sup>]</b>                      5' –tiol - A ggaatc GAA AAC                      TTT TCT TCG TAC CAC GGG                      ACT AAA CCT GGT TAT                      GTA GAT TCC – Atto MB2 -3'</p>  <p><b>Długość trzonu: 6 pz</b>  <b>Długość pętli: 42 nukleotydów</b></p>	
<p><b>TOX 4 / -6.45 [kcal·mol<sup>-1</sup>]</b>                      5' –tiol - A acataa GAA AAC TTT TCT TCG TAC CAC GGG ACT                      AAA CCT GGT TAT GT– Atto                      MB2 -3'</p>  <p><b>Długość trzonu: 6 pz</b>  <b>Długość pętli: 35 nukleotydów</b></p>	

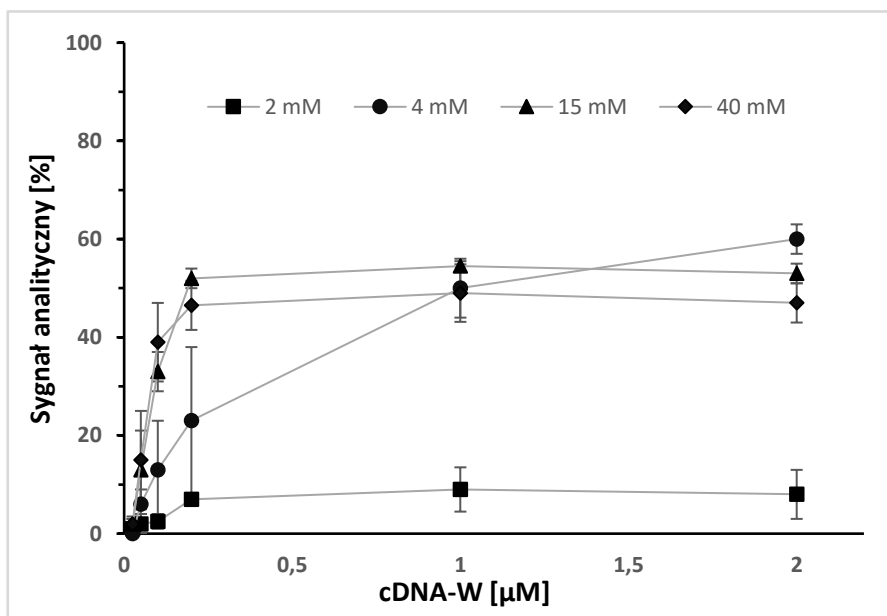
Spośród czterech sond, które wykorzystywane były w badaniach do konstrukcji biosensora wybrano początkowo sondę TOX1. Wybór ten podyktowany był najwyższą spośród badanych stabilnością struktury drugorzędowej sekwencji - jej energia swobodna Gibbsa wynosiła  $\Delta G$  -6,58 kcal·mol<sup>-1</sup>. Warstwy receptorowe sensorów były przygotowywane zgodnie z opisem przedstawionym w Części II, Rozdziale 7. Następnie biosensor, w celu uzyskania odpowiedniej struktury drugorzędowej, był kondycjonowany w buforze hybrydazyjnym do ustabilizowania sygnału prądowego (około 10 – 15 minut).

Pierwotnie w prowadzonych badaniach planowano wykorzystać roztwór hybrydazyjny zawierający 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 10 mM bufor Tris-HCl o pH 7. Ponieważ kationy magnezu odgrywają istotną rolę zarówno w reakcji PCR, jak i w pracy biosensora, dlatego istotnym zagadnieniem było dobranie odpowiedniego stężenia soli MgCl<sub>2</sub>. Pierwotnie zdecydowano, że stężenie MgCl<sub>2</sub> w buforze hybrydazyjnym powinno być takie samo jak to, które zostało użyte do przeprowadzenia reakcji PCR zgodnie z zaleceniami producenta, czyli 2 mM.

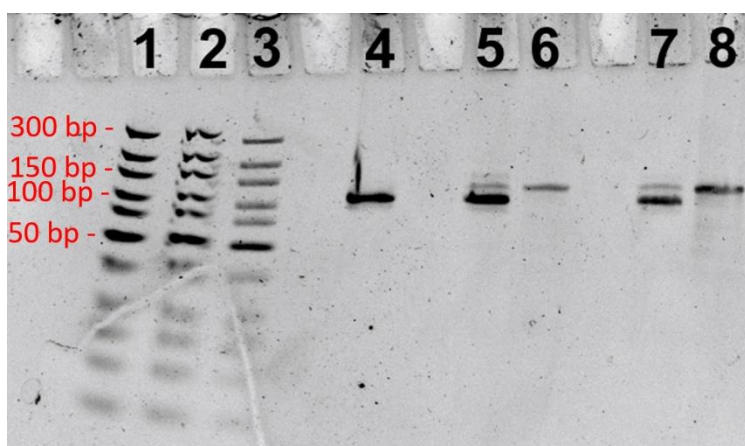
Dane literaturowe również wskazywały na istotną rolę kationu magnezu w procesie hybrydazyjacji nici DNA [109, 110], dlatego uznano za celowe dokładniejsze przebadanie wpływu stężenia jonów Mg<sup>2+</sup> na odpowiedź skonstruowanego biosensora. W początkowych badaniach wybrano cDNA-W, czyli wzorcowe cDNA oczyszczone metodą HPLC, aby uniknąć niespecyficznych oddziaływań sondy biosensora z białkami (polimerazą), które mogą pojawić się w bardziej skomplikowanej matrycy (cDNA-PT lub cDNA-PM). Pomiarzy zostały wykonane przy zastosowaniu roztworów hybrydazyjnych zawierających różne wybrane stężenia jonów Mg<sup>2+</sup>.

Rysunek 35 przedstawia odpowiedzi biosensorów na zmiany stężenia analitu w zakresie 0,1 – 2 μM cDNA-W dla 4 różnych stężeń jonów magnezu (2, 4, 15 i 40 mM) w roztworze hybrydazyjnym.

Z Rysunku 35 wynika, że dla roztworu zawierającego 2 mM Mg<sup>2+</sup> (■) została zaobserwowana jedynie niewielka zmiana wartości sygnału, podczas gdy podobne stężenie jonów magnezu w mieszaninie reakcyjnej PCR pozwoliło na skuteczne powielenie fragmentów genu, co zostało pokazane na Rysunku 36.



Rysunek 35: Wpływ stężenia jonów magnezu w roztworze hybrydacyjnego na zmianę sygnału elektrochemicznego; SWV,  $n \geq 4$ .



Rysunek 36: Rozdzielone za pomocą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym produkty klasycznej reakcji PCR (dołek 4), asymetrycznej metody PCR (dołki 5 i 7), oczyszczone metodą HPLC ssDNA fragmentu genu zjadliwego szczepu błonicy (dołki 6 i 8), standard molekularny GeneRuler Ult (dołki 1-3).

Powyższe zdjęcie żelu poliakrylamidowego z rozdzielonymi produktami zarówno standardowej PCR (dołek 4) jak i asymetrycznego PCR (dołek 5 i 7) potwierdza, że przy zastosowaniu mieszaniny reakcyjnej zawierającej 2 mM  $\text{Mg}^{2+}$  uzyskiwano pożądany produkt.

Natomiast zwiększenie stężenia kationów magnezu w buforze hybrydacyjnym (Rysunek 35) pozwoliło na wzmocnienie odpowiedzi prądowej biosensora w funkcji stężenia cDNA-W. Na tej podstawie można przypuszczać, że istnieje różnica w wydajności hybrydacji pomiędzy komplementarnymi niciami DNA w zależności od środowiska (fazy), w której ma ona miejsce. W przypadku reakcji PCR ma to miejsce w fazie ciekłej (w objętości roztworu), natomiast w przypadku biosensora proces hybrydacji zachodzi na granicy fazy

ciekłej (roztwór) i stałej (elektroda). Na proces hybrydyzacji pomiędzy niemi DNA wpływają także inne czynniki w zależności od środowiska, w którym do tego procesu dochodzi (hybrydyzacja w objętości roztworu, hybrydyzacja na powierzchni elektrody). Wśród tych czynników znaczącą rolę odgrywają przeszkody steryczne warstwy receptorowej unieruchomionej na powierzchni przetwornika. Kolejnym czynnikiem może być stabilność struktury drugorzędowej sondy typu hairpin (nazywana również „stem-loop”). Wreszcie czynnikiem, który może odgrywać ważną rolę jest odpychanie elektrostatyczne pomiędzy analitem, a warstwą receptorową biosensora. W nici DNA występują grupy fosforanowe w pojedynczej nici DNA, zaś w warstwie receptorowej znajdują się zarówno ujemnie naładowane grupy fosforanowe w strukturze sondy jak i spolaryzowane grupy -OH w 6-merkaptto-1-heksanolu (MCH). W takim przypadku zarówno analit jak i warstwa receptorowa są naładowane ujemnie, co prowadzi do ich wzajemnego odpychania elektrostatycznego, zaś kationy obecne w buforze hybrydyzacyjnym nie zapewniają wystarczającego ekranowania ładunku. Kation magnezu  $Mg^{2+}$ , wykorzystywany w mieszaninie reakcyjnej PCR, zapewnia skuteczniejszą stabilizację podwójnej nici DNA, w porównaniu do jonów jednowartościowych [109]. Z tego też powodu jego stężenie w buforze hybrydyzacyjnym zostało poddane optymalizacji.

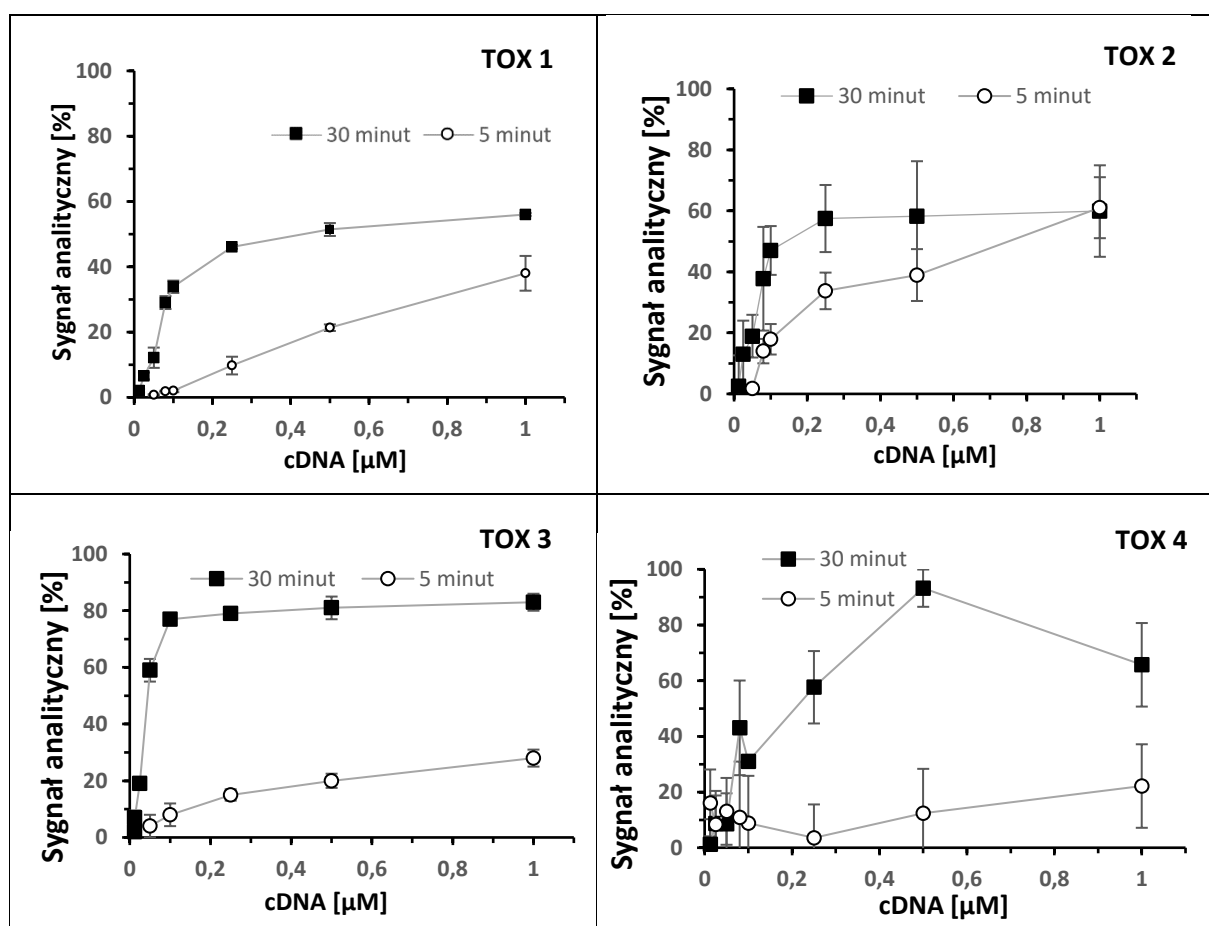
Zwiększenie stężenia jonów magnezu w buforze hybrydyzacyjnym spowodowało poprawę wydajności hybrydyzacji między DNA w warstwie receptorowej czujnika z cDNA-W, co zostało pokazane na Rysunku 35. Można na nim zaobserwować znaczne zwiększenie odpowiedzi sensora w wyniku podwyższenia stężenia  $Mg^{2+}$  do 15 mM w buforze hybrydyzacyjnym. Dalsze zwiększanie stężenia jonów magnezu nie wpłynęło zauważalnie na zmianę sygnału analitycznego przy zachowaniu zbliżonego przebiegu odpowiedzi sensora w funkcji cDNA-W.

Do dalszych badań porównujących działanie wszystkich czterech sekwencji nukleotydowych (TOX 1-4), jako potencjalnych sond biosensora, zastosowano 6-merkaptto-1-heksanolu jako wypełniacz, cDNA-W jako analit oraz wybrano bufor hybrydyzacyjny o stężeniu 15mM  $Mg^{2+}$ . Badania zostały przeprowadzone wykorzystując woltamperometrię fali prostokątnej (SWV) o częstotliwości 100 Hz jako technikę pomiarową. Badania prowadzone były w temperaturze pokojowej.

Skonstruowano cztery grupy biosensorów, a każda z nich zawierała w warstwie receptorowej inną sondę DNA. Każda z sond charakteryzowała się własną, określoną sekwencją nukleotydów, a zatem różniła się też kształtem i stabilnością tworzonych struktur drugorzędowych (Tabela 8). Sondy te składały się z trzonu o długości 6 par zasad (TOX 2,

TOX 3, TOX 4) i 7 par zasad (TOX 1) oraz pętli o długości 35 (TOX 4), 42 (TOX 3) i 57 (TOX 1, TOX 2) nukleotydów.

Aby wybrać odpowiednią sondę, zbadano zależność zmiany sygnału (spadku natężenia prądu po etapie hybrydyzacji w stosunku do natężenia prądu przed etapem hybrydyzacji) w zależności od stężenia analitu (cDNA oczyszczonego metodą HPLC). Badania wskazują, że czas hybrydyzacji jest istotnym czynnikiem wpływającym na wydajność tego procesu [111]. Dla każdej sondy proces hybrydyzacji z komplementarną nicią DNA przeprowadzono w ten sam sposób, w każdym przypadku w dwóch wariantach: czas hybrydyzacji wynosił 30 albo 5 minut. Dłuższy, 30-minutowy czas hybrydyzacji wybrano, aby uzyskać jak największy sygnał analityczny, natomiast krótszy 5-minutowy, ze względu na potencjalne zastosowanie biosensora do szybkich testów diagnostycznych. Wykresy przedstawiające zależność odpowiedzi prądowej biosensorów zawierających sondy TOX 1-4 w warstwie receptorowej w funkcji stężenia cDNA przedstawiono na Rysunku 37.



Rysunek 37: Zmiana sygnału rejestrowana przez biosensor z warstwą receptorową (TOX 1-4) w funkcji cDNA-W; SWV,  $n \geq 4$ ; inkubacja w roztworze hybrydyzacyjnym odpowiednio: 5 min i 30 min

Jak łatwo zauważyć odpowiedzi tych biosensorów zawierających poszczególne sondy różniły się między sobą, zarówno jeżeli chodzi o zależność liniową, czułość, intensywność

sygnału oraz odchylenia standardowe pomiarów. W przypadku sondy TOX4 nie uzyskano zadawalających wyników ( $R^2$  dla hybrydyzacji 5 min i 30 min wynosiły odpowiednio 0,36 i 0,52), a odchylenia standardowe sięgały kilkudziesięciu procent. W przypadku sondy TOX2, została zarejestrowana odpowiedź liniowa ( $R^2$  dla hybrydyzacji 5 min i 30 min wynosiły odpowiednio 0,98 i 0,97 dla stężeń  $\leq 0,1 \mu\text{M}$  cDNA), ale odchylenia standardowe miały również duże wartości.

Powodem otrzymania tego typu wyników jest prawdopodobnie brak charakterystycznej struktury sondy typu hairpin dla oligonukleotydów TOX4 i TOX2 (Tabela 8). Rejestrowane za pomocą biosensorów TOX2/MCH i TOX4/MCH sygnały charakteryzowały się dużym rozrzutem wyników (odchylenia standardowe dla TOX2 i TOX4 wynosiły odpowiednio nawet 18% i 22%), a w przypadku sondy TOX4 także brakiem zależności liniowej odpowiedzi sensora. Z tych powodów zarówno sondy na bazie TOX2 jak i TOX4 zostały odrzucone na etapie z dalszych badań nad projektowaniem warstwy receptorowej opracowywanego biosensora.

Jedynie w przypadku sekwencji TOX1 i TOX3 można zaobserwować wyraźny związek między zwiększającym się stężeniem cDNA, a sygnałem elektrochemicznym sensora. Sondy te charakteryzowały się odpowiednimi strukturami drugorzędowymi - najbardziej przypominały typową formę hairpin (Tabela 8). Biosensory zawierające jako sondy sekwencje TOX1 i TOX3 różniły się wielkością odpowiedzi prądowej w funkcji stężenia cDNA, która była większa w przypadku sondy TOX3. Z tego względu sonda TOX3 została wybrana jako przedmiot dalszych badań przedstawionych w niniejszej pracy.

#### *Parametry pracy biosensora z zastosowaniem sondy TOX3*

Uzyskane parametry pracy biosensora z warstwą receptorową zawierającą TOX3 i wypełniacz MCH (TOX3/MCH), dla 5 i 30 minut hybrydyzacji w buforze zawierającym odpowiednie stężenie cDNA-W były następujące:

- Dla 5 minut hybrydyzacji: zakres detekcji liniowej 0,2–2,0  $\mu\text{M}$ ; czułość 0,2  $\mu\text{M}^{-1}$ ; współczynnik regresji 0,980
- Dla 30 minut hybrydyzacji: zakres detekcji liniowej 13,5–60,0 nM; czułość 12,8  $\mu\text{M}^{-1}$ ; współczynnik regresji 0,965

Granice wykrywalności obliczono na podstawie równania:

$$LOD = \frac{3\sigma}{s} \quad (3)$$



Gdzie:  $\sigma$  jest odchyleniem standardowym skorygowanych sygnałów ślepej próby mierzonych dla biosensora elektrochemicznego;  $s$  jest nachyleniem krzywej kalibracji

Wynosiła ona:

- Dla 5 minut hybrydyzacji 20,8 nM
- Dla 30 minut hybrydyzacji 0,5 nM

Powyższe parametry (z wyjątkiem granicy wykrywalności) zostały określone dla zmiany sygnału biosensora, która mieściła się pomiędzy 10 a 90%, gdyż podczas analizy biologicznej za pomocą biosensora może dochodzić do desorpcji sondy z powierzchni elektrody [112].

## 7.2. Zastosowanie biosensora do badania próbek rzeczywistych

W dotychczasowych badaniach, mających na celu określenie pracy biosensora wykorzystywany był roztwór hybrydyzacyjny zawierający wzorcowy cDNA-W. Charakteryzował się on tym, że cDNA było oczyszczone przy pomocy HPLC, przez co nie zawierał on innych składników obecnych w mieszaninie poreakcyjnej PCR takich jak białka (polimeraza), DNA matrycowe, startery i dNTP. Pozwoliło to na uniknięcie niepożądanych oddziaływań warstwy receptorowej biosensora ze składnikami bardziej skomplikowanej matrycy, jaką jest mieszanina poreakcyjna aPCR.

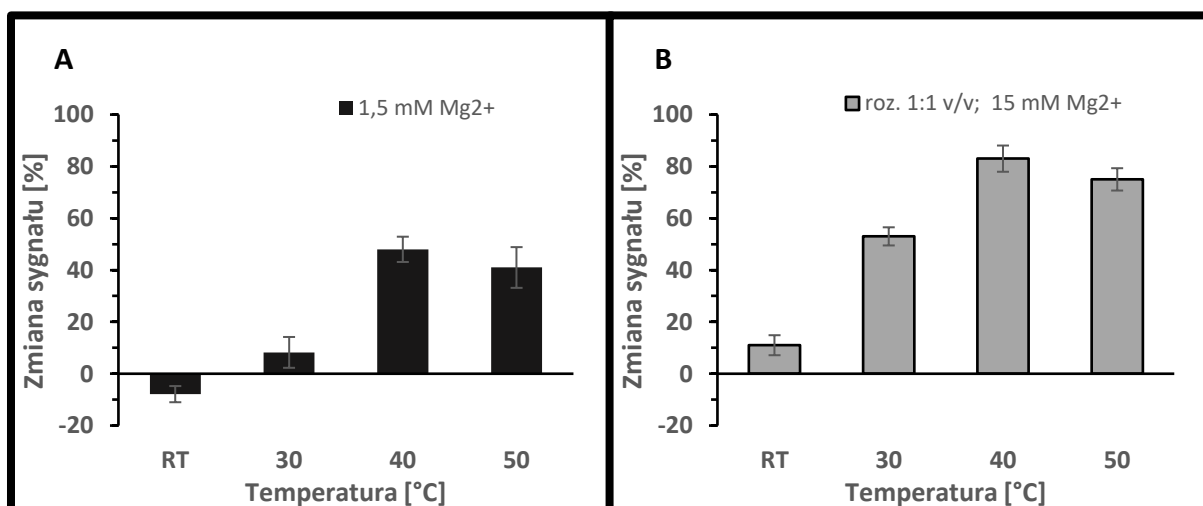
Prowadzonym badaniom przyświecała idea wykrywania analitu w próbce, która jest mieszaniną poreakcyjną aPCR. Z tego powodu kolejnym etapem były badania wykorzystujące opracowany biosensor, w którym zastosowano sekwencję TOX3 w warstwie receptorowej, do wykrywania zamplifikowanego w asymetrycznej reakcji PCR fragmentu genu zjadliwego szczepu maczugowca błonicy (cDNA-PT i cDNA-PM).

W niniejszych badaniach mieszanina poreakcyjna asymetrycznego PCR (aPCR) określana jest mianem próbki rzeczywistej. Próbka ta zawierała fragment jednoniciowego DNA o sekwencji nukleotydów komplementarnej do sondy molekularnej (cDNA). Ponadto próbka mogła zawierać w różnych stężeniach inne substraty reakcji: startery (krótkie fragmenty ssDNA komplementarne do skrajnych odcinków powielanego fragmentu DNA), polimerazę (enzym katalizujący syntezę DNA), dNTP (mieszanina deoksynukleotydów) oraz matrycowe DNA, którego fragment był amplifikowany. Jako próbkę rzeczywistą określano zarówno mieszaninę poreakcyjną reakcji prowadzonej w mikrosystemie (cDNA-PM), jak i w termocyklerze (cDNA-PT). Rozróżnienie na cDNA-PM i cDNA-PT zostało dokonane, aby w prosty sposób przekazać informację dotyczącą sposobu prowadzenia reakcji aPCR.

### Wykrywanie produktu reakcji aPCR prowadzonej w termocyklerze (cDNA-PT)

Przeprowadzone zostały badania mające na celu wykrywanie cDNA-PT będącego produktem aPCR (próbka rzeczywista, produkt reakcji prowadzonej w termocyklerze) z użyciem opracowanego biosensora. Mieszanina poreakcyjna aPCR zawierała 1,5 mM  $Mg^{2+}$ , a detekcja odbywała się w temperaturze pokojowej. Stężenie jonów  $Mg^{2+}$  było zgodne ze wskazaniami producenta odnośnie warunków prowadzenia reakcji PCR. Warto przypomnieć, że wszystkie dotychczas prezentowane wyniki detekcji cDNA-W z użyciem biosensorów odbywały się w temperaturze pokojowej. Zaobserwowanej zmianie sygnału odpowiada słupek oznaczony jako RT (pomiar w temperaturze pokojowej, w roztworze zawierającym 1,5 mM kationów magnezu  $Mg^{2+}$ ) na Rysunku 38 A.

Dla pomiarów wykonanych w temperaturze pokojowej oraz próbce zawierającej 1,5 mM  $Mg^{2+}$  zwraca uwagę ujemna wartość zmiany sygnału, co odpowiada wzrostowi wartości prądu I w porównaniu z  $I_0$ . Zgodnie z Równaniem 2, mechanizm detekcji powinien powodować spadek sygnału prądowego po etapie hybrydyzacji sondy z komplementarną nicią DNA lub pozostawać bez zmian w przypadku braku komplementarnej nici. Świadczyć to może o niespecyficznym oddziaływaniach warstwy receptorowej ze związkami obecnymi w próbce rzeczywistej, w szczególności z użytymi białkami (polimeraza). Według literatury, niespecyficzna adsorpcja białek na powierzchni elektrody może prowadzić do zmiany jej przewodnictwa (co jest spowodowane zmianą punktu izoelektrycznego na powierzchni elektrody) [113].



Rysunek 38: Porównanie wpływu temperatury oraz wzrostu stężenia jonów magnezu na zmianę sygnału biosensora w odpowiedzi na obecność cDNA-PT; A: jako roztwór, w którym prowadzono pomiary została wykorzystana mieszanina poreakcyjna aPCR (stężenie  $Mg^{2+}$  wynosiło 1,5 mM); B: jako roztwór, w którym prowadzono pomiary została wykorzystana mieszanina poreakcyjna aPCR zmodyfikowana poprzez zwiększenie stężenia jonów magnezu do 15 mM; SWV,  $n \geq 4$ ; hybrydyzacja 30 minut; cDNA  $\approx 0,5 \mu M$ .

Dostępne badania literaturowe [114], że oddziaływania te są silnie zależne od temperatury. Dlatego kolejnym krokiem było przeprowadzenie badań z użyciem opracowanego biosensora w podwyższonej temperaturze.

#### *Wpływ temperatury*

Na Rysunku 38 przedstawiono zależność zmiany sygnału biosensora od temperatury, w której wykonywany był pomiar. Niemodyfikowanej próbki rzeczywistej, o której teraz mowa, odpowiadają słupki koloru czarnego, które zostały przedstawione na wykresie A. Są to próbki zawierające stężenie  $Mg^{2+}$  na poziomie 1,5 mM. Podwyższenie temperatury pomiaru do 30°C spowodowało nieznaczny spadek odpowiedzi prądowej biosensora, co skutkowało zwiększeniem zmiany sygnału. Była to jednak niewielka zmiana procentowa ( $8,23\% \pm 5,95$ ). Wzrost temperatury pomiaru do 40°C umożliwił uzyskanie największej zmiany sygnału spośród kilku wybranych warunków. Dalsze podwyższanie temperatury spowodowało zmniejszenie sygnału analitycznego, co wynika prawdopodobnie z degradacji warstwy receptorowej lub desorpcji tioli z powierzchni elektrody. Badania te nie miały na celu optymalizacji temperatury oraz składu buforu pomiarowego, lecz określenie przybliżonych warunków, w których możliwe jest uzyskanie odpowiedzi biosensora na poziomie porównywalnym z tym uzyskanym przy wykrywaniu oczyszczonego cDNA. Z tego też powodu sprawdzonych zostało tylko kilka temperatur pomiaru.

#### *Wpływ stężenia jonów $Mg^{2+}$*

W Rozdziale 7.1. dotyczącym opracowanego biosensora przedstawiono argumenty wskazujące na rolę jaką odgrywają kationy  $Mg^{2+}$  w hybrydyzacji nici DNA. W prowadzonych badaniach ustalono, że spośród sprawdzonych stężeń  $Mg^{2+}$  w buforze hybrydyzacyjnym, 15 mM  $Mg^{2+}$  zapewnia największą czułość biosensora (Rysunek 35). Ze względu na to, że w próbce po PCR stężenie  $Mg^{2+}$  wynosiło 1,5 mM, konieczna była jej modyfikacja.

Proces modyfikacji próbki rzeczywistej jest o tyle niepożądany, że wymaga wprowadzenia dodatkowego etapu w całym procesie analitycznym. Niemniej jednak zdecydowano się na modyfikację próbki poprzez jej rozcieńczenie (zmniejszenie stężenia białek oddziałujących z warstwą receptorową) oraz zwiększenie stężenia kationów magnezu.

Przeprowadzono badania, w których mieszanina poreakcyjna aPCR została rozcieńczona 1:1 (v/v) za pomocą bufora hybrydyzacyjnego, w którym stężenie jonów magnezu było na poziomie 28,5 mM, tak aby w ostatecznym roztworze ich stężenie wynosiło

15 mM. Uzyskana w takich warunkach odpowiedź biosensora na próbkę zawierającą cDNA-PT w temperaturze w zakresie 20-25°C wynosiła jedynie 11,04 %  $\pm$  3,86. Natomiast podwyższenie temperatury pomiaru spowodował znaczący wzrost sygnału analitycznego biosensora (Rysunek 38-B). Największą zmianę sygnału (82,95 %  $\pm$  5,06) uzyskano dla temperatury 40°C, podobnie jak w przypadku niemodyfikowanej próbki rzeczywistej. Uzyskana w ten sposób odpowiedź biosensora była porównywalna, do tej uzyskiwanej w przypadku detekcji zakupionego, oczyszczonego cDNA w buforze hybrydyzacyjny (zmiana sygnału na poziomie około 80%).

Na etapie badań wstępnych (Rozdział 7.1.) pomiary prowadzone były w buforze hybrydyzacyjnym. Podczas badań nad opracowaniem warunków oznaczeń w próbkach rzeczywistych, pomiary prowadzone były bezpośrednio w mieszaninie poreakcyjnej PCR (próbka) (Rysunek 38-A) lub w próbce rozcieńczonej buforem hybrydyzacyjnym (zawierającym zwiększone stężenie kationów magnezu) w stosunku objętościowym 1:1 (Rysunek 38-B). Uzyskane wyniki wskazują na znaczną różnicę w odpowiedzi sensora w zależności od składu próbki. Składnikiem mieszaniny, który powoduje znaczne utrudnienie w rozpoznawaniu przez sondę cDNA prawdopodobnie są białka, które zostały użyte do przeprowadzenia reakcji PCR. Potwierdza to zwiększenie odpowiedzi biosensora (większa zmiana sygnału) przy podwyższonej temperaturze, gdy dochodzi do zmian w strukturach drugorzędowych zarówno DNA jak i białek oraz do zmiany oddziaływań między DNA a białkami.

Przeprowadzone badania wykazały konieczność modyfikacji mieszaniny poreakcyjnej PCR polegający na zwiększeniu stężenia jonów magnezu (do 15 mM  $Mg^{2+}$ ), co wpływa korzystnie na hybrydyzację sondy z cDNA, a także na zwiększeniu temperatury pomiarów (wybrana została wartość 40°C), co prowadziło do wyeliminowania oddziaływań pomiędzy DNA a białkami obecnymi w próbce.

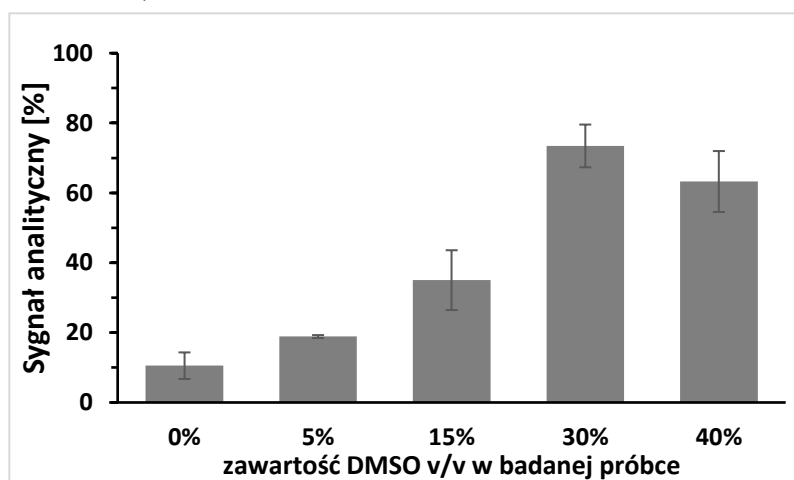
### 7.3. Wpływ DMSO na proces hybrydyzacji w matrycy zawierającej białka

Prowadzenie pomiarów w podwyższonej temperaturze jest szczególnie uciążliwym procesem, który dodatkowo komplikowałby zastosowanie biosensora jako elementu większego urządzenia diagnostycznego. Głównymi niekorzystnymi efektami, które zdiagnozowano w przypadku wykrywania cDNA w próbkach rzeczywistych, było niedostateczne ekranowanie ładunków uniemożliwiające wydajną hybrydyzację oraz niespecyficzne oddziaływanie białek z sondami lub całą powierzchnią elektrody. Podczas, gdy ten pierwszy został wyeliminowany

poprzez zwiększenie stężenia kationów magnezu, ten drugi starano się rozwiązać poprzez podniesienie temperatury. Postanowiono znaleźć inne metody eliminacji niekorzystnego wpływu białek na warstwę receptorową biosensora. W tym celu skorzystano z doniesień literaturowych potwierdzających destabilizację struktury białka w roztworach wodnych poprzez dodanie rozpuszczalników organicznych [115]. W badaniach został wykorzystany dimetylosulfotlenek (DMSO).

Próba (mieszanina poreakcyjna aPCR) była rozcieńczana w podobny sposób jak w przypadku próbek, dla których wyniki zostały zaprezentowane na Rysunku 38-B. Próbkę była rozcieńczana w stosunku objętościowym 1:1, lecz nie tylko za pomocą buforu hybrydyzacyjnego, ale również DMSO. Ze względu na różne zawartości DMSO, które były uzyskiwane dla poszczególnych próbek, bufor hybrydyzacyjny musiał być wzbogacany o wyższe zawartości soli magnezu w taki sposób, aby końcowe stężenie  $Mg^{2+}$  wynosiło 15 mM.

Przeprowadzono pomiary dla roztworów poreakcyjnych aPCR z dodatkiem DMSO w zakresie 5 – 40 % objętościowych. Oznaczenia prowadzono w temperaturze pokojowej. Jak zostało zaprezentowane na Rysunku 39, dodatek DMSO do próbki powodował zwiększenie zmiany sygnału. Największą zmianę sygnału zaobserwowano dla 30% zawartości DMSO w próbce ( $74,44\% \pm 6,12$ ;  $n \geq 4$ ).



Rysunek 39: Wpływ stężenia DMSO w badanej próbce na zmianę sygnału biosensora. Próbka rzeczywista (produkt aPCR – cDNA-PT), hybrydyzacja 30 minut, SWV,  $n \geq 4$ ;

Uzyskane wyniki wskazują, że dodatek rozpuszczalnika organicznego do badanej próbki, umożliwia zwiększenie zmiany uzyskiwanej odpowiedzi przy użyciu biosensora z warstwą receptorową TOX3/MCH. Jak podają źródła literaturowe [116, 117], wpływ DMSO na odpowiedź biosensora polega na jego oddziaływaniu z białkami. DMSO przy wyższych stężeniach prowadzi do rozwinięcia struktur przestrzennych białek, co zmniejsza ich powinowactwo do sond molekularnych DNA. Jak wykazały badania, zastosowanie dodatku

DMSO do próbki rzeczywistej umożliwia prowadzenie pomiarów w temperaturze pokojowej. Jest to istotne, gdyż eliminuje konieczność wprowadzenia etapu podgrzewania badanej próbki.

#### 7.4. Selektywność sensora na zjadliwy szczep maczugowca błonicy

W dalszym etapie badań sprawdzono możliwość zastosowania opracowanego biosensora w analizie próbek zawierających mieszaniny materiałów genetycznych różnych patogenów bakteryjnych. Wybrano grupę szczepów bakteryjnych, które mogą występować w górnych drogach oddechowych człowieka i być potencjalnymi patogenami. Lista wybranych do badań szczepów bakterii, z których zostało wyizolowane DNA wykorzystane w badaniach została przedstawiona w Tabeli 9. W grupie tej znajdował się zarówno zjadliwy szczep maczugowca błonicy (*Corynebacterium diphtheriae* NCTC 10648, tox<sup>+</sup>), którego fragment DNA jest wykrywany przez opracowany biosensor, jak i niezjadliwy szczep (*Corynebacterium diphtheriae* 5820/2019, tox<sup>-</sup>). Przygotowano również roztwory zawierające materiał genetyczny wyizolowanego z kilku szczepów bakteryjnych, tworząc ich mieszaniny (Mix 1-6), których zawartość została przedstawiona w Tabeli 10. W przypadku tych mieszanin jedynie dwie z nich (Mix-3 oraz Mix-4) zawierały DNA wyizolowane ze zjadliwego szczepu maczugowca błonicy.

Tabela 9: Zestawienie szczepów bakterii, których wyizolowane DNA wykorzystano jako matrycę DNA w reakcji PCR

Nazwa szczepu bakterii	Numer matrycy
<i>Corynebacterium diphtheria</i> NCTC 10648, gravis, tox <sup>+</sup>	1
<i>Corynebacterium diphtheria</i> 5820/2019 , tox <sup>-</sup>	2
<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i>	3
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	4
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	5
<i>Moraxella catarrhalis</i>	6
<i>Streptococcus pyogenes</i>	7
<i>Streptococcus salivarius</i>	8
<i>Escherichia coli</i>	9
<i>Staphylococcus aureus</i>	10
<i>Haemophilus influenzae</i>	11
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12

Tabela 10: Zestawienie składów mieszanin szczepów bakterii, których wyizolowane DNA wykorzystano jako matrycę DNA w reakcji PCR

Nazwy szczepów bakterii	Numer mieszaniny matryc
<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Moraxella catarrhalis</i> <i>Streptococcus pyogenes</i>	Mix-1
<i>Streptococcus salivarius</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Mix-2
<b><i>Corynebacterium diphtheriae</i> NCTC 10648, <i>gravis</i>, <i>tox</i><sup>+</sup></b> <i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Moraxella catarrhalis</i> <i>Streptococcus pyogenes</i>	Mix-3
<b><i>Corynebacterium diphtheriae</i> NCTC 10648, <i>gravis</i>, <i>tox</i><sup>+</sup></b> <i>Streptococcus salivarius</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Mix-4
<i>Corynebacterium diphtheriae</i> 5820/2019, <i>tox</i> <sup>-</sup> <i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Moraxella catarrhalis</i> <i>Streptococcus pyogenes</i>	Mix-5
<i>Corynebacterium diphtheriae</i> 5820/2019, <i>tox</i> <sup>-</sup> <i>Streptococcus salivarius</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Mix-6

	Matryca zawierająca DNA jednego szczepu bakterii
Standardowa reakcja PCR	
Asymetryczna reakcja PCR	
	Matryca zawierająca mieszaninę DNA kilku szczepów bakterii
Standardowa reakcja PCR	
Asymetryczna reakcja PCR	

Rysunek 40: Rozdzielone elektroforetycznie produkty standardowej i asymetrycznej reakcji PCR, w których jako matrycę DNA wykorzystano DNA wyizolowane z szczepów bakterii wymienionych w tabeli 2 oraz odpowiedź biosensora na produkty tych reakcji.

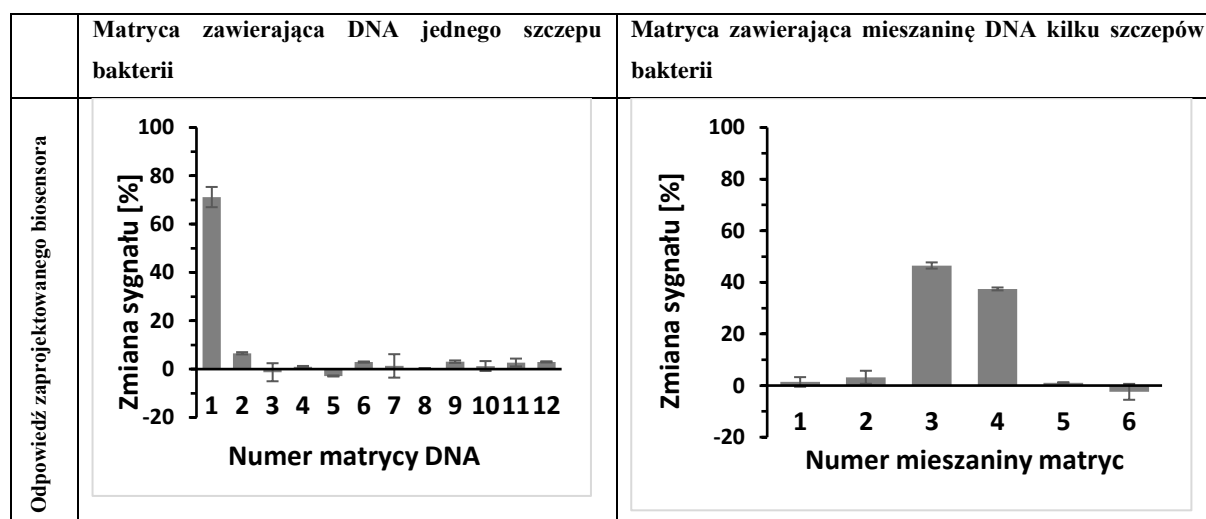


Przeprowadzono szereg reakcji PCR i aPCR, w których matrycowe DNA dla każdej z nich zawierało DNA pojedynczych szczepów bakterii – matryce 1-12 (Tabela 9) lub ich mieszanin – mix 1-6 (Tabela 10). DNA zjadliwego szczepu błonicy znajdowało się jedynie w matrycy nr 1 (dla pojedynczych wyizolowanych DNA patogenów) oraz w matrycach Mix-3 i Mix-4 (dla mieszanin DNA). Startery użyte w reakcji były specyficzne dla fragmentu DNA zjadliwego szczepu błonicy.

Mieszanina poreakcyjna była rozdzielana przy użyciu elektroforezy żelowej. Wyniki przedstawiono na Rysunku 40. Jedynie w ścieżce, w których znajdowała się mieszanina reakcyjna, w której obecne było matrycowe DNA zjadliwego szczepu maczugowca błonicy, widoczny był prążki, który potwierdzał amplifikację DNA. Świadczy to o selektywności reakcji PCR, której produktem jest fragment genu zjadliwego szczepu o długości 107 nukleotydów. Analogiczne wyniki zostały zaobserwowane dla mieszanin materiału genetycznego. Jedynie dla mieszanin Mix-3 i Mix-4 zostały zaobserwowane prążki świadczące o amplifikowaniu fragmentu genu.

Mieszaniny poreakcyjne aPCR zostały również wykorzystane do badań za pomocą opracowanego biosensora. Mieszaniny te zostały wzbogacone przez dodatek zarówno kationów magnezu, jak i DMSO tworząc odpowiednie warunki dla reakcji hybrydyzacji analitu z sondą warstwy receptorowej biosensora.

Odpowiedzi biosensora uzyskiwane dla poszczególnych mieszanin (Mix 1-6) zawierających materiał genetyczny patogenów zostały zaprezentowane na Rysunku 41.



Rysunek 41: Odpowiedź biosensora TOX3/MCH DNA na wykrywanie cDNA w mieszaninach poreakcyjnych (aPCR), które jako matrycowe DNA zawierały wyizolowane DNA patogenów (A) oraz mieszanin patogenów (B), czas hybrydyzacji 30 min, SWV, n ≥4

Otrzymane wyniki wskazują jednoznacznie, że jedynie w przypadku mieszanin poreakcyjnych aPCR, w których składzie był obecny powielony fragment cDNA

zaobserwowano istotną zmianę sygnału elektrochemicznego biosensora. Świadczy to o wysokiej selektywności opracowanego biosensora i potwierdza możliwość wykorzystania go do badania próbek rzeczywistych.

## 7.5. Miniaturyzacja biosensora

Jak zostało wspomniane w części literaturowej, przetworniki elektrochemiczne są często wykorzystywane w opracowywaniu nowych biosensorów między innymi ze względu na łatwość ich miniaturyzacji. Miniaturyzacja umożliwia stworzenie przenośnego systemu diagnostycznego, który może zostać wykorzystany w badaniach w terenie, w miejscu gdzie znajduje się potencjalna osoba zakażona (POC). Zmniejsza to czas całościowego procesu diagnostycznego, gdyż próbka pobrana od pacjenta, nie musi być transportowana do wyspecjalizowanych laboratoriów, a szybkie rozpoznanie choroby w przypadku błonicy jest niezwykle istotne dla zdrowia i życia pacjenta. Miniaturyzacja pozwala również na obniżenie kosztów urządzeń, poprzez ich masową produkcję, z wykorzystaniem innowacyjnych technik wytwarzania (np. elektrody wykonane metodą sitodruku).

W niniejszej pracy wykorzystano jednorazowe, komercyjnie dostępne przetworniki, które zastąpiły konwencjonalny system trójelektrodowy wykorzystywany w badaniach wstępnych. Biosensor opracowano na bazie takich przetworników z myślą o zastosowaniu w przenośnych urządzeniach diagnostycznych. Badano dwa warianty przetworników:

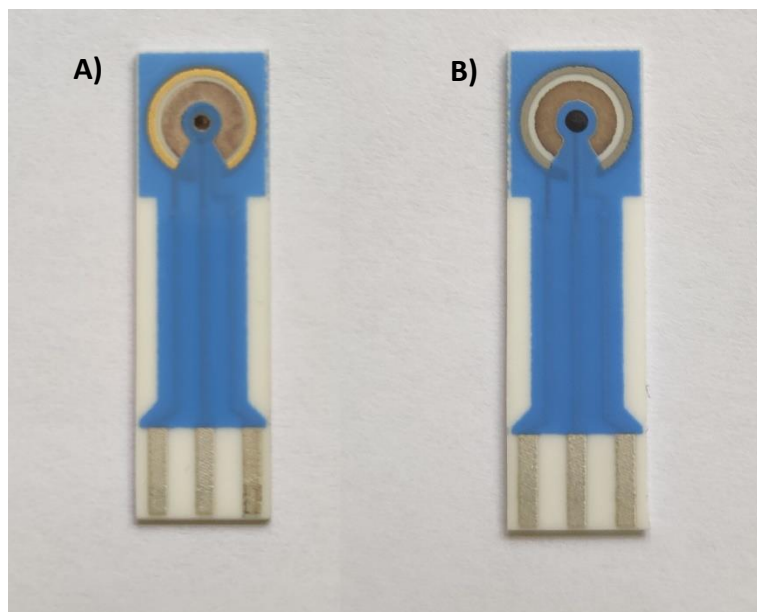
- bez polerowania (AC1.W1.R2) – złote elektrody pracujące zostały wykonane metodą sitodruku na podłożu ceramicznym (Rysunek 42-A);
- Polerowana (AC1P.W1.R2) – złota elektroda pracująca została wykonana metodą sitodruku, a następnie była polerowana. Charakteryzowała się jednorodną gładką powierzchnią o chropowatości poniżej 1  $\mu\text{m}$  (zgodnie z deklaracją producenta) (Rysunek 42-B).

Oba rodzaje przetworników posiadały elektrodę odniesienia Ag/AgCl oraz złotą elektrodę pomocniczą.

Przed przygotowaniem warstwy receptorowej sprawdzono kilka metod czyszczenia elektrod, w tym:

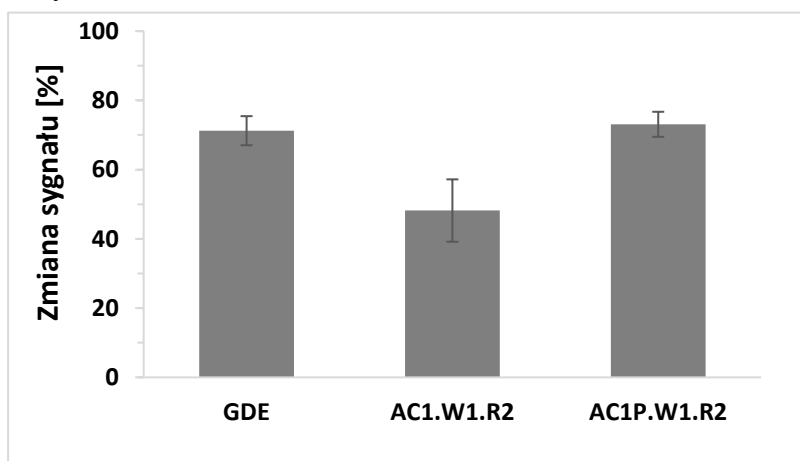
- kąpiel ultradźwiękową elektrod w mieszaninie wody i etanolu,
- czyszczenie elektrochemiczne w 0,5 M roztworze  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,
- inkubację w roztworze piranii przez 30 sekund.

Ostatecznie została wybrana, jako najbardziej skuteczna, procedura czyszczenia za pomocą roztworu piranii, po której elektrody były obficie spłukiwane wodą dejonizowaną.



Rysunek 42: Zdjęcie zminiaturyzowanych, trójelektrodowych przetworników elektrochemicznych wykonanych metodą sitodruku, A) - AC1.W1.R2, B) - AC1P.W1.R2.

Na tak przygotowany przetwornik nanoszono warstwę receptorową TOX3/MCH. Przygotowany biosensor wykorzystano do detekcji cDNA-PT pochodzącego z asymetrycznej reakcji PCR. Do próbki dodawano DMSO (30% v/v) oraz roztwór zawierający jony magnezu, tak aby uzyskać ich końcowe stężenie na poziomie 15 mM. W przypadku obu biosensorów zaobserwowano zmianę sygnału (Rysunek 43), umożliwiającą wykrycie cDNA. Zmiana sygnału dla przetwornika AC1.W1.R2 wynosiła  $49\pm 9\%$ , zaś dla przetwornika AC1P.W1.R2 wynosiła  $74\pm 4\%$  i była bardzo zbliżona do wyników otrzymanych dla standardowego układu trójelektrodowego ze złotą elektrodą dyskową ( $72\pm 4\%$ ) wykorzystywaną w poprzednich eksperymentach (Rysunek 43).



Rysunek 43: Porównanie odpowiedzi sensorów z warstwą receptorową TOX3/MCH dla różnych typów przetworników w obecności cDNA będącego produktem aPCR, czas hybrydyzacji 30 min, SWV,  $n \geq 4$

Różnice pomiędzy zmianą sygnałów dla dwóch badanych komercyjnych przetworników wynika prawdopodobnie z ich konstrukcji oraz chropowatości powierzchni złotej elektrody, co może w istotny sposób wpływać na jakość i skład unieruchomionych warstw tiolowych.

Wartości zmiany sygnału otrzymane dla biosensora stworzonego na komercyjnym przetworniku (AC1P.W1.R2) świadczą o przydatności tego typu sensorów do detekcji genów patogenów i mogą stanowić kompaktowy, jednorazowy element detekcyjny urządzeń typu lab-on-a-chip wykorzystywanych do badania występowania kwasów nukleinowych w próbce.

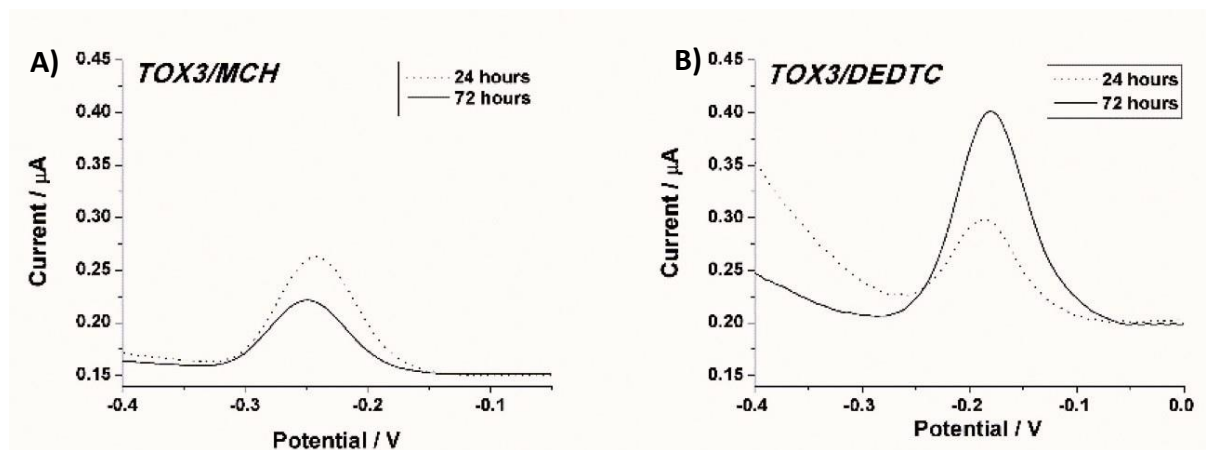
## 7.6. Dietyloditiokarbaminian jako czynnik blokujący warstwy receptorowej

Modyfikacji próbki rzeczywistej (mieszaniny poreakcyjnej aPCR) jest powiązania z wprowadzeniem dodatkowego etapu w procedurze analitycznej. W opisanych badaniach wstępnych, dotyczących opracowania biosensora, jako czynnik blokujący wykorzystywano merkaptoheksanol (MCH). W Części III, Rozdziale 7.1. podniesiony został wątek wpływu stężenia kationów magnezu na proces hybrydyzacji cDNA z sondą biosensora. Zauważono możliwość wpływu spolaryzowanych grup funkcyjnych MCH (-OH) na odpychające oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy warstwą receptorową biosensora a analitem. Aby zbadać faktyczny wpływ czynnika blokującego na wydajność procesu hybrydyzacji postanowiono rozszerzyć prowadzone badania o najnowsze wyniki prac dr hab. inż. R. Ziółkowskiego [118], dotyczące zastosowania dietyloditiokarbaminianu (DEDTC) jako potencjalnego wypełniacza w warstwie receptorowej.

W tym celu przygotowano sensory, które w warstwie receptorowej posiadały nowy czynnik blokujący w postaci DEDTC (biosensory TOX3/DEDTC). Cząsteczki dietyloditiokarbaminianu (DEDTC) nie posiadają ładunku, ale charakteryzują się obecnością struktur rezonansowych oraz bliskością poziomu Fermiego dla złota [118]. Taka zmiana czynnika blokującego powinna prowadzić do wzrostu przewodnictwa warstwy receptorowej. Jak wcześniej wspomniano, odpychające oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy cDNA a powierzchnią elektrody może być spowodowane zastosowaniem MCH jako czynnika blokującego. Zaobserwowano, że modyfikacja złota poprzez MCH powoduje wzrost rezystywności z 500  $\Omega$  do 1500  $\Omega$ , podczas, gdy zastosowanie DEDTC powoduje zmniejszenie rezystywności czystej złotej elektrody do 30  $\Omega$  [118].

Dane literaturowe wskazują na możliwość wymiany związanych kowalencyjnie z elektrodą złotą tioli przez dietylotiokarbaminiany [119]. Dlatego w prowadzonych badaniach

postanowiono zweryfikować czy DEDTC jest zdolny do zastąpienia tiolowanych cząsteczek sond na powierzchni złotej elektrody. Zachodzenie takiego podstawienia prowadzioby do niestabilności warstwy receptorowej biosensora. Wykonano serię dwóch typów biosensorów różniących się zastosowanym wypełniaczem w warstwie receptorowej: TOX3/MCH oraz TOX3/DEDTC i porównano odpowiedź prądową przygotowanych biosensorów. Immobilizacja czynnika blokującego była prowadzona w czasie 24 h i 72 h (Rysunek 44) dla obu typów biosensorów.



Rysunek 44: Wpływ rodzaju środka blokującego A) MCH B) DEDTC oraz czasu jego immobilizacji na wartość zarejestrowanego prądu; czas immobilizacji 24h i 72h, SWV

Podobnie jak w przypadku biosensora TOX3/MCH, zostały określone podstawowe parametry pracy biosensora TOX3/DEDTC w tym zależność w funkcji stężenia cDNA-W. Parametry te zostały określone dla czasu hybrydyzacji 30 minut (SWV,  $n \geq 4$ ). Dla 30 minutowej hybrydyzacji: zakres detekcji liniowej 40,2–80,5 nM; czułość  $3,8 \mu\text{M}^{-1}$ ; współczynnik regresji 0,988; granica wykrywalności 1,7 nM

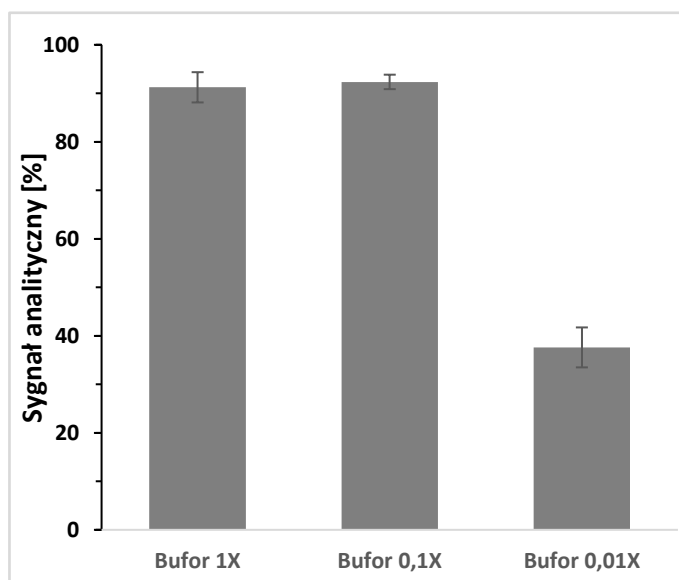
Zaobserwowano znaczące różnice w rejestrowanej wartości prądu dla sensorów w zależności od zastosowanego czynnika blokującego oraz jego czasu immobilizacji na elektrodzie. W przypadku zastosowania w warstwie receptorowej sondy TOX3 i MCH jako wypełniacza, wydłużenie czasu immobilizacji MCH na elektrodzie z 24 godzin do 72 godzin powodowało zmniejszenie rejestrowanej odpowiedzi prądowej o 40%. W przypadku zaś zastosowania sondy TOX3 i DEDTC w roli wypełniacza, podobne wydłużenie czasu skutkowało zwiększeniem odpowiedzi prądowej o prawie 150%, przy czym jakość rejestrowanych pików na voltamperogramie nie uległa pogorszeniu.

W przypadku sensora z warstwą receptorową TOX3/MCH spadek odpowiedzi prądowej można tłumaczyć utworzeniem gęstszej warstwy MCH, na co wskazują badania [118] dowodzące wzrostu całkowitej rezystywności elektrod i/lub możliwość zastąpienia sondy TOX3 na powierzchni elektrody przez cząsteczki wypełniacza. Duży wzrost sygnału w

przypadku sensora TOX3/DEDTC wskazuje na zwiększenie stabilności warstwy receptorowej, a także zwiększenie ogólnej przewodności warstwy receptorowej, za którą odpowiedzialny jest nowy czynnik blokujący DEDTC.

Wprowadzenie nowego wypełniacza DEDTC wymagało także sprawdzenia ustalonych wcześniej dla MCH warunków prowadzenia oznaczeń. W tym celu przeprowadzone zostały pomiary z wykorzystaniem biosensora TOX3/DEDTC w roztworach hybrydacyjnych zawierających 0,2  $\mu\text{M}$  cDNA-W, ale różniących się stężeniem tego buforu. Roztwór oznaczony jako 1X odpowiadał składem przyjętemu za najlepszy w przypadku biosensorów TOX3/MCH (15 mM  $\text{MgCl}_2$ , 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7), roztwory 0,1X i 0,01X oznaczają, odpowiednio, 10- i 100-krotne rozcieńczenie roztworu 1X roztworem o składzie: 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7 (bez jonów  $\text{Mg}^{2+}$ ). Uzyskane wyniki przedstawione są na Rysunku 45.

W przypadku biosensora z warstwą receptorową, w której wypełniaczem był DEDTC, sygnał analityczny uzyskany za pomocą biosensora był na poziomie 92-93% dla 0,2  $\mu\text{M}$  stężenia cDNA-W, przy zastosowaniu wyjściowego roztworu 1X, jak i przy dziesięciokrotnym jego rozcieńczeniu. Warto zauważyć, że dziesięciokrotnie rozcieńczony roztwór zawierał 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , co oznacza, że stężenie kationów magnezu odpowiadało stosowanemu w prowadzonej reakcji PCR (zgodnie z zaleceniami producenta). Natomiast stukrotne rozcieńczenie prowadziło do drastycznego obniżenia wartości sygnału analitycznego ( $36 \pm 4\%$ ).



Rysunek 45: Sygnał analityczny uzyskiwany przy zastosowaniu biosensora TOX3/DEDTC przy pomiarach prowadzonych w roztworze hybrydacyjnym o składzie 15 mM  $\text{MgCl}_2$ , 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7 (bufor 1X), 0,2  $\mu\text{M}$  cDNA-W, hybrydacja 30 minut, SWV,  $n \geq 4$ ;

Na podstawie przeprowadzonych badań można wnioskować, że zmiana wypełniacza w warstwie receptorowej z MCH na DEDTC jest korzystna, gdyż dzięki temu jedno z ograniczeń zastosowania biosensora do pomiarów bezpośrednio w mieszaninie poreakcyjnej aPCR (polegające na konieczności zwiększeniu stężenia  $Mg^{2+}$  do 15 mM w przypadku biosensora TOX3/MCH) może być wyeliminowane.

Jak wskazały próby zastosowania biosensorów TOX3/DEDTC do analiz próbek po PCR, pozostała konieczność wyeliminowania oddziaływań warstwy receptorowej z białkami obecnymi w próbce. Podobnie jak w przypadku biosensora TOX3/MCH postanowiono modyfikować próbkę poprzez dodatek DMSO. Badania próbek zawierających cDNA-PM z wykorzystaniem tego typu biosensora przedstawione zostały w Rozdziale 8.

## 8. Propozycja konstrukcji zintegrowanego urządzenia do wykrywania zjadliwego szczepu maczugowca błonicy

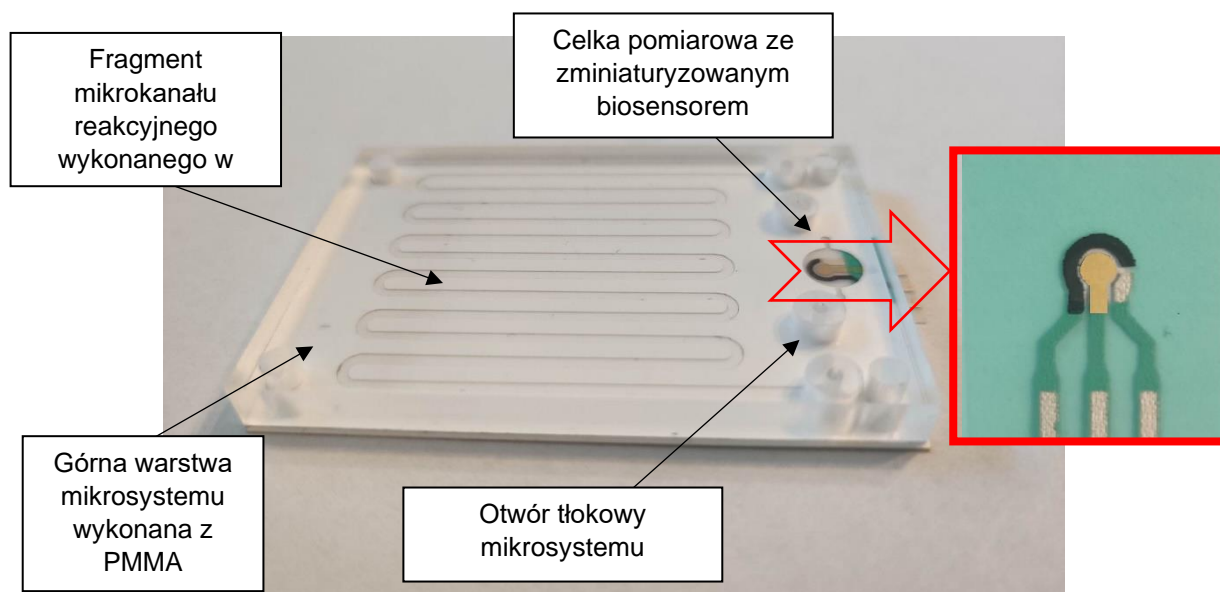
Opracowane w Rozdziale 7 warstwy receptorowe, zarówno TOX3/MCH, jak i TOX3/DEDTC, zostały wykorzystane do stworzenia biosensorów przez zastosowanie zminiaturyzowanych przetworników, które były kompatybilne z opracowanym mikrosystemem PCR. Pozwoliło to na przeprowadzenie badań mających na celu wykrywanie jednoniciowego DNA w próbce przez biosensor, który został zintegrowany z mikrosystemem PCR.

Wykorzystane do stworzenia biosensora przetworniki zostały wykonane oraz udostępnione przez Dział Elektroniki Drukowanej, Tekstroniki i Montażu z Centrum Zaawansowanych Materiałów i Technologii CEZAMAT Politechniki Warszawskiej. Były to trójelektrodowe przetworniki elektrochemiczne wykonane na podłożach z elastycznych folii polimerowych. Kontakty przewodzące, elektrody pomocnicze oraz elektrody odniesienia wykonane były w technologii sitodruku, natomiast złote elektrody pracujące wykonane były w technologii cienkowarstwowej poprzez osadzanie fizyczne z fazy gazowej. Proces przygotowania warstwy receptorowej biosensora pozostał niezmienny w stosunku do wcześniej prowadzonych badań.

Jako podstawa do badań został wykorzystany mikrosystem opisany w Rozdziale 6, który został poddany następującym modyfikacjom:

- wprowadzono dodatkową warstwę z przetwornikami wykonanymi na foliach,
- utworzenie dodatkowej przestrzeni, nazywanej celką pomiarową, w której znajdowały się elektrody układu pomiarowego.

Mikrosystem zintegrowany z biosensorem został pokazany na Rysunku 46.



Rysunek 46: Zdjęcie wielowarstwowego mikrosystemu PCR zintegrowanego z zminiaturyzowanym biosensorem DNA. Na zdjęciu zostały zaznaczone wybrane elementy zintegrowanego systemu, ze szczególnym uwzględnieniem zminiaturyzowanego przetwornika.

Integracja mikrosystemu PCR z systemem pomiarowym wymagała zastosowania odpowiedniej, kompatybilnej technologii, w której wykonano przetworniki biosensora. W tym celu zaprojektowano i wykonano przetworniki na elastycznych foliach polimerowych. Pozwoliło to na docinanie ich kształtu za pomocą lasera oraz łączenie z pozostałymi warstwami mikroukładu w jednym procesie technologicznym. W mikrosystemach zintegrowanych badane były dwa typy biosensorów: TOX3/MCH jak i TOX3/DEDTC.

Pierwszym etapem procesu wykrywania zjadliwego szczepu błonicy było przeprowadzenie reakcji aPCR. Wszystkie reakcje prowadzone były w ten sam sposób, skład mieszaniny reakcyjnej był identyczny do tego przedstawionego w Tabeli 7, Stężenie 2 (s. 88). Pomimo, że mikroukład został zmodyfikowany w taki sposób, aby zawierał doprowadzenia mikrokanalów do celki pomiarowej, to mieszanina reakcyjna nie była wprowadzana do niej bezpośrednio po przeprowadzeniu reakcji. Wynikało to z konieczności modyfikacji próbki poprzez odpowiednie rozcieńczenie, dodatek DMSO, czy też zwiększenie stężenia kationów magnezu (tylko w przypadku TOX3/MCH). Prowadzenie etapu modyfikacji próbki wewnątrz mikrosystemu wymagałoby wprowadzenia dodatkowych elementów, które nie były tematem niniejszej pracy.

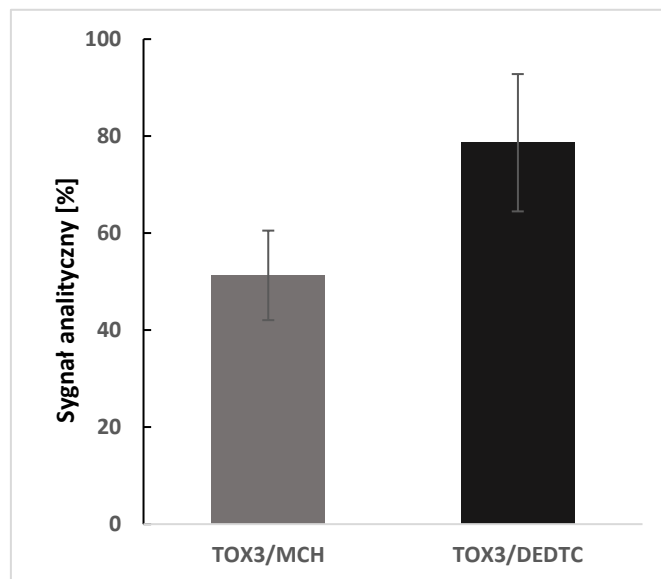
W prowadzonych badaniach po zakończeniu reakcji PCR mieszanina była wprowadzana z mikrosystemu do naczynka, modyfikowana poprzez dodatek odpowiednich



roztworów, a następnie wprowadzana do celki pomiarowej, w której znajdował się zminiaturyzowany biosensor.

W przypadku pomiarów, które odbywały się za pomocą biosensora TOX3/MCH konieczna była modyfikacja mieszaniny poreakcyjnej, w celu uzyskania stężenie  $Mg^{2+}$  na poziomie 15 mM oraz DMSO na poziomie 30% objętościowych. W przypadku pomiarów, które odbywały się za pomocą biosensora TOX3/DEDTC, próbkę modyfikowano tak, by końcowe stężenie jonów magnezu wynosiło 1,5 mM, a DMSO 30% objętościowych. Taka modyfikacja próbki była konieczna, na co wskazywały wyniki przedstawione we wcześniejszych rozdziałach (Rozdział 7.2. i 7.3.).

Proces hybrydyzacji analitu z sondą trwał 30 minut i odbywał się w specjalnie zaprojektowanej celce pomiarowej wewnątrz mikrosystemu. Pomiarów wykonano dla sześciu przygotowanych biosensorów każdego typu. Warto zaznaczyć, że sposób w jaki prowadzono pomiary różnił się od wcześniej prowadzonych eksperymentów. W tym przypadku modyfikowane próbki były wprowadzane do celki pomiarowej, w której miała styczność z biosensorem w ograniczonej przestrzeni. Wcześniejsze pomiary wykorzystujące jako przetwornik złotą elektrodę dyskową i/lub zminiaturyzowane elektrody wykonane metodą sitodruku bazowały na zanurzeniu ich w roztworze próbki.



Rysunek 47: Sygnal analityczny rejestrowany przez biosensory zawierające różne wypełniacze (MCH albo DEDTC), znajdujące się w celce pomiarowej zintegrowanego mikrosystemu. Próbka otrzymana w reakcji PCR w tym mikrosystemie; SWV, hybrydyzacja 30 minut, n=6

Zaobserwowano spadek natężenia rejestrowanego prądu (Rysunek 47) na poziomie  $51,29\% \pm 9,78$  (n=6) w przypadku biosensora TOX3/MCH oraz  $78,64\% \pm 13,17$  (n=6) dla biosensora TOX3/DEDTC. Zmiana sygnału rejestrowana przez biosensor przed oraz po procesie hybrydyzacji w próbce zawierającej mieszaninę poreakcyjną aPCR świadczy o

wykryciu w badanej próbce cDNA będącego analitem. Różnice pomiędzy dwoma zastosowanymi typami biosensora mogą wynikać z różnych powodów, między innymi z większej całkowitej rezystywności warstwy receptorowej wykorzystującej jako wypełniacz MCH w porównaniu do DEDTC [110]. Przeprowadzone badanie jako główny cel miało jednak określić możliwość zastosowania opracowanych biosensorów w celu detekcji analitu, co zostało potwierdzone zarówno dla TOX3/MCH jak i TOX3/DEDTC.

Na podstawie przeprowadzonych badań można stwierdzić, że opracowane biosensory spełniły swoją rolę jako element detekcyjny opracowanego urządzenia. Amplifikowany w tej reakcji cDNA-PM został wykryty zarówno przez biosensor TOX3/MCH jak i TOX3/DEDTC. Pomimo różnic w odpowiedzi biosensorów zawierających różny czynnik blokujący oraz różnic w procesie modyfikacji próbki, oba warianty umożliwiły wykrycie cDNA obecnego w próbce. W założeniu prowadzonych badań, ostateczne zastosowanie biosensora sprowadzać się ma do prostej odpowiedzi, która potwierdza lub zaprzecza obecności fragmentu genu zjadliwego szczepu błonicy w próbce bez konieczności podawania jej stężenia. Ta podstawowa funkcjonalność biosensora jako systemu detekcji została potwierdzona.

Wyniki przeprowadzonych badań dowiodły słuszności koncepcji (ang. *proof of concept*) proponowanej w pracy konstrukcji urządzenia służącego do szybkiej detekcji zjadliwego szczepu maczugowca błonicy. Opracowany mikrosystem umożliwia przeprowadzenie reakcji aPCR oraz dokonanie detekcji analitu w celce pomiarowej. Zastosowane materiały pozwoliły na wykonanie mikrosystemu PCR, który w prosty sposób można zintegrować z biosensorem DNA. Integrację umożliwiło zastosowanie nowoczesnej technologii, bazującej na wykorzystaniu elastycznych foli polimerowych, do wytwarzania zarówno zminiaturyzowanych systemów PCR, jak i biosensorów.

Docelowe urządzenie powinno w sposób w pełni zautomatyzowany przeprowadzać etapy procesu diagnostycznego związane z przygotowaniem próbki analitycznej. W tym celu konieczne są dalsze prace nad wprowadzeniem do mikrosystemu elementów (tj., dodatkowe zbiorniki wewnątrz mikrosystemu oraz zawory aktywne) umożliwiających sterowanie przepływem w taki sposób, aby po etapie reakcji aPCR mieszanina była odpowiednio zmodyfikowana wewnątrz urządzenia, a następnie automatycznie wprowadzana do celki pomiarowej. Docelowe urządzenie powinno wykorzystywać również zminiaturyzowane stacje pomiarowe oraz systemy zasilania układu grzałek. Takie działania pozwolą na stworzenie przenośnego prototypu, który w sposób w pełni zautomatyzowany pozwoli na przeprowadzenie procesu wykrywania zjadliwego szczepu maczugowca błonicy od etapu wprowadzenia próbki pobranej od pacjenta do otrzymania wyniku. Niemniej jednak, w przedstawionych badaniach

opracowane zostały kluczowe elementy urządzenia umożliwiające przeprowadzenie dwóch najważniejszych etapów, jakimi są amplifikacja DNA w mikrosystemie oraz detekcja przy użyciu biosensora.

## Podsumowanie i wnioski

W pracy doktorskiej „Opracowanie przenośnego zminiaturyzowanego urządzenia diagnostycznego z elektrochemicznym czujnikiem DNA” przedstawiono problematykę, która dotyczyła opracowywania urządzeń typu Lab on a Chip służących do przeprowadzania reakcji PCR oraz wykorzystania elektrochemicznych biosensorów w celu wykrywania określonych fragmentów DNA. Tematyka pracy obejmuje opracowanie, wytworzenie i optymalizację mikrosystemów przepływowych służących do amplifikacji DNA oraz opracowanie biosensora DNA umożliwiającego wykrywanie analitu powielonego w mikrosystemie PCR.

Główny nacisk w części literaturowej został położony na opisanie systemów Lab-on-a-Chip ze szczególnym uwzględnieniem mikrosystemów służących do prowadzenia reakcji PCR. Opisane zostały materiały konstrukcyjne mikrosystemów oraz techniki ich obróbki. Przedstawiono podział mikrosystemów PCR ze względu na sposób prowadzenia reakcji oraz przedstawiono sposoby dostarczania energii do mikrosystemów. Zwrócono również uwagę na elementy wywołujące i kontrolujące przepływ w mikrosystemach oraz elementy wspomagające mieszanie. Przedstawione zostały również biosensory elektrochemiczne DNA, sposób ich działania oraz metody immobilizacji, ze szczególnym uwzględnieniem biosensorów typu spinka do włosów. W części literaturowej pracy poruszono temat zagrożeń związanych z niekontrolowanym rozprzestrzenianiem się chorób zakaźnych, ze szczególnym uwzględnieniem błonicy, która stanowiła modelowy układ dla prowadzonych badań.

W niniejszej pracy zostały zaprezentowane różnego rodzaju mikrosystemy służące do przeprowadzania reakcji PCR, które zostały opracowane w ramach prowadzonych badań. Rozpoczęto od skonstruowania hybrydowego mikrosystemu PDMS/szkło o geometrii serpentynowej. W tym celu zastosowano metodę miękkiej fotolitografii w celu uzyskania matrycy i wytworzenia mikrostruktur w warstwie PDMS mikrosystemu, która była następnie trwale łączona ze szkłem. Na dalszym etapie badań skupiono się na mikrosystemach cyklicznych, czyli takich, w których mieszanina reakcyjna wielokrotnie przepływa przez mikrosystem. Wytworzono hybrydowe mikrosystemy PDMS/szkło, a jako matrycę wykorzystano pieczętkę uzyskaną zarówno metodą miękkiej fotolitografii jak i mikrofrezowania. Zidentyfikowano potencjalne czynniki mogące mieć wpływ na wydajność prowadzonej reakcji oraz wprowadzono procedury mające na celu im zapobiegać. Skonstruowano również mikrosystem cykliczny z PMMA, który charakteryzował się większą wytrzymałością na wewnętrzne ciśnienie wywoływane przepływem. Posiadał on również

specjalnie opracowany interface umożliwiający łatwy sposób wprowadzania oraz wyprowadzania mieszaniny z mikroukładu.

W niniejszej pracy zaprojektowano i wykonano innowacyjny mikrosystem PCR wykonany z wielu warstw folii poliestrowych nakładanych na siebie. Zastosowany materiał był poddawany obróbce za pomocą plotera laserowego, dzięki czemu mikrostruktury były wykonywane z wysoką precyzją i powtarzalnością. Wielowarstwowa konstrukcja umożliwiła wykonanie mikrosystemu posiadającego struktury trójwymiarowe, składające się z nakładanych na siebie elementów 2D. Zastosowany materiał umożliwia wykonanie bardzo wielu mikrosystemów w krótkim czasie, dlatego może być docelowo wykorzystany w masowej produkcji urządzeń diagnostycznych. Niezwykle istotna była możliwość wykonania w materiale wielu struktur w trakcie jednego procesu. Umożliwiało to integrację kilku elementów w jednym urządzeniu. Z użyciem tej technologii został zaprojektowany oraz wykonany mikrosystem cykliczny PCR, posiadający zintegrowany układ mikrozaworów odpowiedzialnych za kontrolę przepływu cieczy.

Tabela 11: Porównanie biosensorów związanych z diagnostyką błonicy. W zestawieniu znalazły się biosensory opisane w literaturze oraz opracowane w niniejszej pracy. \* - czas hybrydyzacji = 30 minut, \*\* - czas hybrydyzacji = 5 minut

Warstwa receptorowa	Przetwornik	Wykrywany analit	Dolna granica wykrywalności	Zakres prostoliniowości	[ref]
anti-diphtheria IgG	Nanocząstki złota/LSPR	toksyna błonicy (DT)	10 ng/mL	X	[98]
biEP/BSA	Elektrochemiczny/SWV	anti-DTx IgG	$5 \times 10^{-6}$ IU	$10^{-5}$ – $10^{-1}$ IU/mL	[99]
TOX3/DEDTC	Elektrochemiczny/SWV	cDNA	1,7 nM*	40,2–80,5 nM*	Ta praca
TOX3/MCH			20,8 nM**	0,16–2,0 $\mu$ M**	
			0,5 nM*	13,5–60,0 nM*	

W dysertacji przedstawiono prace dotyczące opracowania elektrochemicznego genetycznego biosensora DNA, o analitycznie użytecznych parametrach pracy, do wykrywania fragmentu genu zjadliwego szczepu błonicy. W celu przetestowano cztery sondy molekularne DNA (TOX 1-4). Porównano dwa wypełniacze stosowane w warstwie receptorowej (MCH i DEDTC). Przebadano również wpływ składu buforu hybrydyzacyjnego oraz warunków pomiarowych na uzyskiwany sygnał analityczny. Opracowane biosensory przebadano pod względem selektywności na wykrywany analit. Zaproponowano także rozwiązania prowadzące do miniaturyzacji biosensora oraz wykazano jego efektywne działanie w celu wykrywania analitu w próbkach rzeczywistych pochodzących z opracowanego mikrosystemu PCR. Opracowany elektrochemiczny biosensor DNA, który został użyty do wykrywania fragmentu genu zjadliwego szczepu błonicy w próbkach wcześniej poddanych procedurze PCR.

W Tabeli 11 zostały porównane biosensory, które mogą posłużyć do diagnostyki błonicy. Przykłady literaturowe bazują na wykorzystywanych w warstwie receptorowej przeciwciałach (immunosensory), natomiast przedstawione w pracy biosensory posiadały w warstwie receptorowej sondy DNA (genosensory). Ze względu na różnice w zasadzie działania przedstawionych w Tabeli 11 biosensorów, parametry ich pracy odnoszą się do różnego rodzaju analitu.

Wielowarstwowy mikrosystem PCR wykonany w foliach poliestrowych został zintegrowany z biosensorem opracowanym na elastycznym podłożu. Została zaprezentowana koncepcja zminiaturyzowanego urządzenia służącego do wykrywania zjadliwego szczepu maczugowca błonicy. Potwierdzona została możliwość wykorzystania opracowanych elementów do amplifikacji fragmentu genu, który był analitem (mikrosystem PCR), a następnie jego wykrywania (biosensor), gdzie cała procedura analityczna trwała poniżej jednej godziny.

### *Wnioski*

Przedstawione w niniejszej pracy wyniki badań prowadzą do następujących wniosków:

- do wytworzenia mikrosystemów PCR można z powodzeniem wykorzystać folie poliestrowe, które są poddawane obróbce poprzez ablację laserową. Umożliwia to precyzyjne i powtarzalne wykonanie mikrostruktur 2D, poprzez wykorzystanie maszyn sterowanych numerycznie (ploter laserowy). Natomiast kolejny etap, polegający na sklejeniu folii prowadzi do układów o architekturze 3D;
- zastosowane materiały oraz technologie stanowią nowatorskie podejście do wytwarzania mikrosystemów. Pozwala ono na wytworzenie wielu mikrosystemów w krótkim czasie oraz niskim kosztem. Umożliwia również łatwą integrację poszczególnych elementów urządzenia, które są wytwarzane w trakcie jednego procesu obróbki;
- zintegrowany mikrosystem PCR, wykonany w technologii trwałego łączenia kolejnych warstw, został z powodzeniem wykorzystany do przeprowadzania amplifikacji DNA w czasie  $< 20$  minut, a więc 5-krotnie krótszym w porównaniu z klasycznym PCR;
- opracowane biosensory, działające według mechanizm rozpoznania molekularnego, których warstwa receptorowa zawiera sondy posiadające sekwencje nukleotydów (TOX-3) komplementarnych do fragmentu genu zjadliwego szczepu błonicy posiadają analitycznie użyteczne parametry pracy;
- wykorzystanie opracowanego elektrochemicznego biosensora DNA do analizy mieszaniny poreakcyjnej PCR wymaga modyfikacji jej składu przed wykonaniem oznaczenia ze względu na obecność różnego typu białek;

- aby zapewnić odpowiednie działanie biosensora, konieczna jest modyfikacja próbki pod kątem stężenia kationów magnezu i/lub zastosowanie rozpuszczalnika organicznego (DMSO);
- zastosowanie DEDTC, jako czynnika blokującego nieposiadającego silnie spolaryzowanych końcowych grup funkcyjnych, zwiększa wydajność hybrydyzacji w porównaniu do MCH;
- opracowany zintegrowany mikrosystem PCR wraz ze zminiaturyzowanym biosensorem umożliwia szybką amplifikację oraz wykrywanie cDNA, przez co może być wykorzystany jako urządzenie typu POC służące do diagnostyki zjadliwego szczepu maczugowca błonicy jako alternatywa do obecnie stosowanych procedur laboratoryjnych;

## Bibliografia

- [1] O. Pashchenko, T. Shelby, T. Banerjee, i S. Santra, „A Comparison of Optical, Electrochemical, Magnetic, and Colorimetric Point-of-Care Biosensors for Infectious Disease Diagnosis”, *ACS Infect Dis*, t. 4, nr 8, s. 1162–1178, sie. 2018, doi: 10.1021/acsinfecdis.8b00023.
- [2] F. Mi *i in.*, „Recent advancements in microfluidic chip biosensor detection of foodborne pathogenic bacteria: a review”, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, t. 414, nr 9. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, s. 2883–2902, 1 kwiecień 2022. doi: 10.1007/s00216-021-03872-w.
- [3] A. Jagannath, H. Cong, J. Hassan, G. Gonzalez, M. D. Gilchrist, i N. Zhang, „Pathogen detection on microfluidic platforms: Recent advances, challenges, and prospects”, *Biosensors and Bioelectronics: X*, t. 10. Elsevier Ltd, 1 maj 2022. doi: 10.1016/j.biosx.2022.100134.
- [4] J. Yang *i in.*, „High sensitivity PCR assay in plastic micro reactors”, *Lab Chip*, t. 2, nr 4, s. 179, 2002, doi: 10.1039/b208405h.
- [5] Y. Ouyang *i in.*, „A disposable laser print-cut-laminate polyester microchip for multiplexed PCR via infra-red-mediated thermal control”, *Anal Chim Acta*, t. 901, s. 59–67, grudz. 2015, doi: 10.1016/j.aca.2015.09.042.
- [6] J. J. Chen, M. H. Liao, K. T. Li, i C. M. Shen, „One-heater flow-through polymerase chain reaction device by heat pipes cooling”, *Biomicrofluidics*, t. 9, nr 1, s. 014107, sty. 2015, doi: 10.1063/1.4906505.
- [7] J. A. Kim *i in.*, „Fabrication and characterization of a PDMS–glass hybrid continuous-flow PCR chip”, *Biochem Eng J*, t. 29, nr 1–2, s. 91–97, kwi. 2006, doi: 10.1016/j.bej.2005.02.032.
- [8] Y. Schaerli *i in.*, „Continuous-Flow Polymerase Chain Reaction of Single-Copy DNA in Microfluidic Microdroplets”, *Anal Chem*, t. 81, nr 1, s. 302–306, sty. 2009, doi: 10.1021/ac802038c.
- [9] A. R. Wheeler i P. Ross, „Introduction to *Lab on a Chip* Reviews issue”, *Lab Chip*, t. 23, nr 5, s. 816–817, 2023, doi: 10.1039/D3LC90019C.
- [10] S. Colin, Red., *Microfluidics*. Wiley, 2013. doi: 10.1002/9781118599839.
- [11] H. Tachibana, M. Saito, K. Tsuji, K. Yamanaka, L. Q. Hoa, i E. Tamiya, „Self-propelled continuous-flow PCR in capillary-driven microfluidic device: Microfluidic behavior and DNA amplification”, *Sens Actuators B Chem*, t. 206, s. 303–310, sty. 2015, doi: 10.1016/j.snb.2014.09.004.
- [12] S. C. Terry, J. H. Jerman, i J. B. Angell, „A gas chromatographic air analyzer fabricated on a silicon wafer”, *IEEE Trans Electron Devices*, t. 26, nr 12, s. 1880–1886, grudz. 1979, doi: 10.1109/T-ED.1979.19791.



- [13] W. Shi *i in.*, „Integrated silicon microfluidic chip for picoliter-scale analyte segmentation and microscale printing for mass spectrometry imaging”, *Lab Chip*, t. 23, nr 1, s. 72–80, 2023, doi: 10.1039/D2LC00688J.
- [14] Y. Feng *i in.*, „A Stand-Alone Microfluidic Chip for Long-Term Cell Culture”, *Micromachines (Basel)*, t. 14, nr 1, s. 207, sty. 2023, doi: 10.3390/mi14010207.
- [15] F. Hua *i in.*, „Polymer Imprint Lithography with Molecular-Scale Resolution”, *Nano Lett*, t. 4, nr 12, s. 2467–2471, grudz. 2004, doi: 10.1021/nl048355u.
- [16] R. Pelton, „Bioactive paper provides a low-cost platform for diagnostics”, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, t. 28, nr 8, s. 925–942, wrz. 2009, doi: 10.1016/j.trac.2009.05.005.
- [17] E. A. Waddell, „Laser Ablation as a Fabrication Technique for Microfluidic Devices”, w *Microfluidic Techniques*, New Jersey: Humana Press, s. 27–38. doi: 10.1385/1-59259-997-4:27.
- [18] C. Tzivelekis, P. Sgardelis, K. Waldron, R. Whalley, D. Huo, i K. Dalgarno, „Fabrication routes via projection stereolithography for 3D-printing of microfluidic geometries for nucleic acid amplification”, *PLoS One*, t. 15, nr 10, s. e0240237, paź. 2020, doi: 10.1371/journal.pone.0240237.
- [19] K. W. Oh i C. H. Ahn, „A review of microvalves”, *Journal of Micromechanics and Microengineering*, t. 16, nr 5, s. R13–R39, maj 2006, doi: 10.1088/0960-1317/16/5/R01.
- [20] Zhang i Zhang, „Microfluidic Passive Flow Regulatory Device with an Integrated Check Valve for Enhanced Flow Control”, *Micromachines (Basel)*, t. 10, nr 10, s. 653, wrz. 2019, doi: 10.3390/mi10100653.
- [21] J. Qian, M. Chen, X. Liu, i Z. Jin, „A numerical investigation of the flow of nanofluids through a micro Tesla valve”, *Journal of Zhejiang University-SCIENCE A*, t. 20, nr 1, s. 50–60, sty. 2019, doi: 10.1631/jzus.A1800431.
- [22] M. Nafea, A. Nawabjan, i M. S. Mohamed Ali, „A wirelessly-controlled piezoelectric microvalve for regulated drug delivery”, *Sens Actuators A Phys*, t. 279, s. 191–203, sie. 2018, doi: 10.1016/j.sna.2018.06.020.
- [23] <https://www.bartels-mikrotechnik.de/en/micropumps/> - dostęp: 05.10.2022
- [24] J. D. Tice, A. V. Desai, T. A. Bassett, C. A. Apblett, i P. J. A. Kenis, „Control of pressure-driven components in integrated microfluidic devices using an on-chip electrostatic microvalve”, *RSC Adv.*, t. 4, nr 93, s. 51593–51602, 2014, doi: 10.1039/C4RA10341F.
- [25] P. Datta, M. Sathe, L. Namburi, E. J. Podlaha, S. Acharya, i M. C. Murphy, „Microfabricated recurve bimetallic actuator”, S. W. Janson, Red., sty. 2003, s. 83. doi: 10.1117/12.472869.
- [26] C. Megnin, B. Moradi, J. Zuern, H. Ossmer, M. Gueltig, i M. Kohl, „Shape memory alloy based controllable multi-port microvalve”, *Microsystem Technologies*, t. 26, nr 3, s. 793–800, mar. 2020, doi: 10.1007/s00542-019-04614-w.

- [27] F. Obst *i in.*, „Hydrogel Microvalves as Control Elements for Parallelized Enzymatic Cascade Reactions in Microfluidics”, *Micromachines (Basel)*, t. 11, nr 2, s. 167, luty 2020, doi: 10.3390/mi11020167.
- [28] A. S. Vinogradova, V. A. Turkov, i V. A. Naletova, „Modeling of ferrofluid-based microvalves in the magnetic field created by a current-carrying wire”, *J Magn Magn Mater*, t. 470, s. 18–21, sty. 2019, doi: 10.1016/j.jmmm.2017.11.090.
- [29] X. Zhou, M. Gao, i L. Gui, „A Liquid-Metal Based Spiral Magnetohydrodynamic Micropump”, *Micromachines (Basel)*, t. 8, nr 12, s. 365, grudz. 2017, doi: 10.3390/mi8120365.
- [30] M. R. H. Nobari, S. Movahed, V. Nourian, i S. Kazemi, „A numerical investigation of a novel micro-pump based on the induced charged electrokinetic phenomenon in the presence of a conducting circular obstacle”, *J Electrostat*, t. 83, s. 97–107, paź. 2016, doi: 10.1016/j.elstat.2016.08.007.
- [31] I. V Uvarov, S. S. Lemekhov, A. E. Melenev, i V. B. Svetovoy, „A micropump driven by electrochemically produced short-lived bubbles”, *J Phys Conf Ser*, t. 757, s. 012008, paź. 2016, doi: 10.1088/1742-6596/757/1/012008.
- [32] N.-T. Nguyen, „Mixing in Microscale”, w *Microfluidic Technologies for Miniaturized Analysis Systems*, Boston, MA: Springer US, 2007, s. 117–155. doi: 10.1007/978-0-387-68424-6\_3.
- [33] M. La *i in.*, „A centrifugal force-based serpentine micromixer (CSM) on a plastic lab-on-a-disk for biochemical assays”, *Microfluid Nanofluidics*, t. 15, nr 1, s. 87–98, lip. 2013, doi: 10.1007/s10404-012-1127-z.
- [34] X. Chen i T. Li, „A novel design for passive micro-mixers based on topology optimization method”, *Biomed Microdevices*, t. 18, nr 4, s. 57, sie. 2016, doi: 10.1007/s10544-016-0082-y.
- [35] H. Ammar, A. Ould el Moctar, B. Garnier, i H. Peerhossaini, „Flow Pulsation and Geometry Effects on Mixing of Two Miscible Fluids in Microchannels”, *J Fluids Eng*, t. 136, nr 12, grudz. 2014, doi: 10.1115/1.4027550.
- [36] M. M. Wen i C. N. Kim, „Mixing features in an electromagnetic rectangular micromixer for electrolyte solutions”, *Journal of Hydrodynamics*, t. 29, nr 4, s. 668–678, sie. 2017, doi: 10.1016/S1001-6058(16)60778-3.
- [37] N.-T. Nguyen, „Mixing in Microscale”, w *Microfluidic Technologies for Miniaturized Analysis Systems*, Boston, MA: Springer US, 2007, s. 117–155. doi: 10.1007/978-0-387-68424-6\_3.
- [38] D.-S. Lee, O. R. Choi, i Y. Seo, „A microheater on polyimide substrate for hand-held realtime microfluidic polymerase chain reaction amplification”, *Micro and Nano Systems Letters*, t. 7, nr 1, s. 18, grudz. 2019, doi: 10.1186/s40486-019-0098-1.
- [39] J. J. Chen, M. H. Liao, K. T. Li, i C. M. Shen, „One-heater flow-through polymerase chain reaction device by heat pipes cooling”, *Biomicrofluidics*, t. 9, nr 1, s. 014107, sty. 2015, doi: 10.1063/1.4906505.

- [40] S. Jeong *i in.*, „Portable low-power thermal cycler with dual thin-film Pt heaters for a polymeric PCR chip”, *Biomed Microdevices*, t. 20, nr 1, s. 14, mar. 2018, doi: 10.1007/s10544-018-0257-9.
- [41] J. H. Son *i in.*, „Rapid Optical Cavity PCR”, *Adv Healthc Mater*, t. 5, nr 1, s. 167–174, sty. 2016, doi: 10.1002/adhm.201500708.
- [42] A. M. Schrell i M. G. Roper, „Frequency-encoded laser-induced fluorescence for multiplexed detection in infrared-mediated quantitative PCR”, *Analyst*, t. 139, nr 11, s. 2695–2701, 2014, doi: 10.1039/C3AN02334F.
- [43] H. J. Huang *i in.*, „Light Energy Conversion Surface with Gold Dendritic Nanoforests/Si Chip for Plasmonic Polymerase Chain Reaction”, *Sensors*, t. 20, nr 5, s. 1293, luty 2020, doi: 10.3390/s20051293.
- [44] D. J. Marchiarullo, A. H. Sklavounos, K. Oh, B. L. Poe, N. S. Barker, i J. P. Landers, „Low-power microwave-mediated heating for microchip-based PCR”, *Lab Chip*, t. 13, nr 17, s. 3417, 2013, doi: 10.1039/c3lc50461a.
- [45] A. Gokaltun, M. L. Yarmush, A. Asatekin, i O. B. Usta, „Recent advances in nonbiofouling PDMS surface modification strategies applicable to microfluidic technology”, *Technology (Singap World Sci)*, t. 05, nr 01, s. 1–12, mar. 2017, doi: 10.1142/S2339547817300013.
- [46] H. Tachibana, M. Saito, K. Tsuji, K. Yamanaka, L. Q. Hoa, i E. Tamiya, „Self-propelled continuous-flow PCR in capillary-driven microfluidic device: Microfluidic behavior and DNA amplification”, *Sens Actuators B Chem*, t. 206, s. 303–310, sty. 2015, doi: 10.1016/j.snb.2014.09.004.
- [47] Q. Cao *i in.*, „Microfluidic Chip for Molecular Amplification of Influenza A RNA in Human Respiratory Specimens”, *PLoS One*, t. 7, nr 3, s. e33176, mar. 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0033176.
- [48] A. G. Sciancalepore, A. Polini, E. Mele, S. Girardo, R. Cingolani, i D. Pisignano, „Rapid nested-PCR for tyrosinase gene detection on chip”, *Biosens Bioelectron*, t. 26, nr 5, s. 2711–2715, sty. 2011, doi: 10.1016/j.bios.2010.09.008.
- [49] F. Mathieu-Daude, „DNA rehybridization during PCR: the «Cot effect» and its consequences”, *Nucleic Acids Res*, t. 24, nr 11, s. 2080–2086, cze. 1996, doi: 10.1093/nar/24.11.2080.
- [50] X. Wang, H. J. Lim, i A. Son, „Characterization of denaturation and renaturation of DNA for DNA hybridization”, *Environ Health Toxicol*, t. 29, s. e2014007, wrz. 2014, doi: 10.5620/eh.2014.29.e2014007.
- [51] L. Jiang, M. Mancuso, Z. Lu, G. Akar, E. Cesarman, i D. Erickson, „Solar thermal polymerase chain reaction for smartphone-assisted molecular diagnostics”, *Sci Rep*, t. 4, nr 1, s. 4137, luty 2014, doi: 10.1038/srep04137.
- [52] Y. Schaerli *i in.*, „Continuous-Flow Polymerase Chain Reaction of Single-Copy DNA in Microfluidic Microdroplets”, *Anal Chem*, t. 81, nr 1, s. 302–306, sty. 2009, doi: 10.1021/ac802038c.

- [53] H. Tanaka *i in.*, „Hands-Off Preparation of Monodisperse Emulsion Droplets Using a Poly(dimethylsiloxane) Microfluidic Chip for Droplet Digital PCR”, *Anal Chem*, t. 87, nr 8, s. 4134–4143, kwi. 2015, doi: 10.1021/ac503169h.
- [54] S. O. Sundberg, C. T. Wittwer, L. Zhou, R. Palais, Z. Dwight, i B. K. Gale, „Quasi-digital PCR: Enrichment and quantification of rare DNA variants”, *Biomed Microdevices*, t. 16, nr 4, s. 639–644, sie. 2014, doi: 10.1007/s10544-014-9866-0.
- [55] F. Tian *i in.*, „A fully automated centrifugal microfluidic system for sample-to-answer viral nucleic acid testing”, *Sci China Chem*, t. 63, nr 10, s. 1498–1506, paź. 2020, doi: 10.1007/s11426-020-9800-6.
- [56] J. Luo *i in.*, „A real-time microfluidic multiplex electrochemical loop-mediated isothermal amplification chip for differentiating bacteria”, *Biosens Bioelectron*, t. 60, s. 84–91, paź. 2014, doi: 10.1016/j.bios.2014.03.073.
- [57] N. Tarchichi, F. Chollet, i J.-F. Manceau, „New regime of droplet generation in a T-shape microfluidic junction”, *Microfluid Nanofluidics*, t. 14, nr 1–2, s. 45–51, sty. 2013, doi: 10.1007/s10404-012-1021-8.
- [58] M. Zhang *i in.*, „A newly developed paper embedded microchip based on LAMP for rapid multiple detections of foodborne pathogens”, *BMC Microbiol*, t. 21, nr 1, s. 197, grudz. 2021, doi: 10.1186/s12866-021-02223-0.
- [59] X. Fang, Y. Liu, J. Kong, i X. Jiang, „Loop-Mediated Isothermal Amplification Integrated on Microfluidic Chips for Point-of-Care Quantitative Detection of Pathogens”, *Anal Chem*, t. 82, nr 7, s. 3002–3006, kwi. 2010, doi: 10.1021/ac1000652.
- [60] L. Zhang *i in.*, „Integrated Microcapillary for Sample-to-Answer Nucleic Acid Pretreatment, Amplification, and Detection”, *Anal Chem*, t. 86, nr 20, s. 10461–10466, paź. 2014, doi: 10.1021/ac503072a.
- [61] K. Hsieh, B. S. Ferguson, M. Eisenstein, K. W. Plaxco, i H. T. Soh, „Integrated Electrochemical Microsystems for Genetic Detection of Pathogens at the Point of Care”, *Acc Chem Res*, t. 48, nr 4, s. 911–920, kwi. 2015, doi: 10.1021/ar500456w.
- [62] S. Sheu, C. Huang, i J. Chen, „Portable Molecular Diagnostics Device for Identification of Asini Corii Colla by Loop-Mediated Isothermal Amplification”, *Inventions*, t. 6, nr 3, s. 51, lip. 2021, doi: 10.3390/inventions6030051.
- [63] <https://www.abbott.com/corpnewsroom/diagnostics-testing/how-id-now-tackles-covid-19.html> - dostę: 05.10.2022
- [64] J. H. Myung i S. Hong, „Microfluidic devices to enrich and isolate circulating tumor cells”, *Lab Chip*, t. 15, nr 24, s. 4500–4511, 2015, doi: 10.1039/C5LC00947B.
- [65] S.-M. Yang, S. Lv, W. Zhang, i Y. Cui, „Microfluidic Point-of-Care (POC) Devices in Early Diagnosis: A Review of Opportunities and Challenges”, *Sensors*, t. 22, nr 4, s. 1620, luty 2022, doi: 10.3390/s22041620.
- [66] Z. Li *i in.*, „A rapid microfluidic platform with real-time fluorescence detection system for molecular diagnosis”, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, t. 33, nr 1, s. 223–230, sty. 2019, doi: 10.1080/13102818.2018.1561211.

- [67] S. K. Jha *i in.*, „An integrated PCR microfluidic chip incorporating aseptic electrochemical cell lysis and capillary electrophoresis amperometric DNA detection for rapid and quantitative genetic analysis”, *Lab Chip*, t. 12, nr 21, s. 4455, 2012, doi: 10.1039/c2lc40727b.
- [68] Y. M. Park *i in.*, „Integrated pumpless microfluidic chip for the detection of foodborne pathogens by polymerase chain reaction and electrochemical analysis”, *Sens Actuators B Chem*, t. 329, s. 129130, luty 2021, doi: 10.1016/j.snb.2020.129130.
- [69] <https://www.biofiredx.com/products/the-filmarray-panels/filmarray-respiratory-panel-ez/> - dostęp: 05.10.2022
- [70] <https://www.visbymeical.com/covid-19-test/> - dostęp: 05.10.2022
- [71] Ü. Anik, „Electrochemical medical biosensors for POC applications”, w *Medical Biosensors for Point of Care (POC) Applications*, Elsevier, 2017, s. 275–292. doi: 10.1016/B978-0-08-100072-4.00012-5.
- [72] A. Hulanicki, S. Glab, i F. Ingman, „Chemical sensors: definitions and classification”, *Pure and Applied Chemistry*, t. 63, nr 9, s. 1247–1250, sty. 1991, doi: 10.1351/pac199163091247.
- [73] Z. Brzózka, E. Malinowska, W. Wróblewski *i in.*, *Sensory chemiczne i biosensory*. Wydawnictwo Naukowe PWN, 2022. doi: 10.53271/2021.012.
- [74] M. Javaid, A. Haleem, S. Rab, R. Pratap Singh, i R. Suman, „Sensors for daily life: A review”, *Sensors International*, t. 2, s. 100121, 2021, doi: 10.1016/j.sintl.2021.100121.
- [75] N. Bhalla, P. Jolly, N. Formisano, i P. Estrela, „Introduction to biosensors”, *Essays Biochem*, t. 60, nr 1, s. 1–8, cze. 2016, doi: 10.1042/EBC20150001.
- [76] S. Kakkar, P. Gupta, N. Kumar, i K. Kant, „Progress in Fluorescence Biosensing and Food Safety towards Point-of-Detection (PoD) System”, *Biosensors (Basel)*, t. 13, nr 2, s. 249, luty 2023, doi: 10.3390/bios13020249.
- [77] W. Zhang, R. Wang, F. Luo, P. Wang, i Z. Lin, „Miniaturized electrochemical sensors and their point-of-care applications”, *Chinese Chemical Letters*, t. 31, nr 3, s. 589–600, mar. 2020, doi: 10.1016/j.ccllet.2019.09.022.
- [78] Y. Hua, J. Ma, D. Li, i R. Wang, „DNA-Based Biosensors for the Biochemical Analysis: A Review”, *Biosensors (Basel)*, t. 12, nr 3, s. 183, mar. 2022, doi: 10.3390/bios12030183.
- [79] Manjula Rajendran i Andrew D. Ellington, „Selecting Nucleic Acids for Biosensor Applications”, *Comb Chem High Throughput Screen*, t. 5, nr 4, s. 263–270, cze. 2002, doi: 10.2174/1386207023330246.
- [80] P. Dua *i in.*, „Cell-SELEX Based Identification of an RNA Aptamer for Escherichia coli and Its Use in Various Detection Formats”, *Mol Cells*, t. 39, nr 11, s. 807–813, lis. 2016, doi: 10.14348/molcells.2016.0167.

- [81] E. Pyrak, J. Krajczewski, A. Kowalik, A. Kudelski, i A. Jaworska, „Surface Enhanced Raman Spectroscopy for DNA Biosensors—How Far Are We?”, *Molecules*, t. 24, nr 24, s. 4423, grudz. 2019, doi: 10.3390/molecules24244423.
- [82] A. Bosco, J. Camunas-Soler, i F. Ritort, „Elastic properties and secondary structure formation of single-stranded DNA at monovalent and divalent salt conditions”, *Nucleic Acids Res*, t. 42, nr 3, s. 2064–2074, luty 2014, doi: 10.1093/nar/gkt1089.
- [83] P. Zhang, T. Beck, i W. Tan, „Design of a Molecular Beacon DNA Probe with Two Fluorophores”, *Angewandte Chemie International Edition*, t. 40, nr 2, s. 402–405, sty. 2001, doi: 10.1002/1521-3773(20010119)40:2<402::AID-ANIE402>3.0.CO;2-I.
- [84] A. A. Lubin i K. W. Plaxco, „Folding-Based Electrochemical Biosensors: The Case for Responsive Nucleic Acid Architectures”, *Acc Chem Res*, t. 43, nr 4, s. 496–505, kwi. 2010, doi: 10.1021/ar900165x.
- [85] J. M. R. Flauzino *i in.*, „DNA electrochemical biosensor for detection of *Alicyclobacillus acidoterrestris* utilizing Hoechst 33258 as indicator”, *Bioelectrochemistry*, t. 140, s. 107801, sie. 2021, doi: 10.1016/j.bioelechem.2021.107801.
- [86] N. Delshadi-Jahromi, R. Nazari-Vanani, H. Yadegari, N. Sattarahmady, G. R. Hatam, i H. Heli, „Label-free ultrasensitive electrochemical genosensing of *Trichomonas vaginalis* using anisotropic-shaped gold nanoparticles as a platform, a repeated sequence of the parasite DNA as a probe, and toluidine blue as a redox marker”, *Sens Actuators B Chem*, t. 273, s. 234–241, lis. 2018, doi: 10.1016/j.snb.2018.06.051.
- [87] S. Hajihosseini, N. Nasirizadeh, M. S. Hejazi, i P. Yaghmaei, „An electrochemical DNA biosensor based on Oracet Blue as a label for detection of *Helicobacter pylori*”, *Int J Biol Macromol*, t. 91, s. 911–917, paź. 2016, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.04.009.
- [88] Y.-P. Dong, T.-T. Gao, Y. Zhou, L.-P. Jiang, i J.-J. Zhu, „Anodic Electrogenerated Chemiluminescence of Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> with CdSe Quantum Dots as Coreactant and Its Application in Quantitative Detection of DNA”, *Sci Rep*, t. 5, nr 1, s. 15392, paź. 2015, doi: 10.1038/srep15392.
- [89] J. I. A. Rashid i N. A. Yusof, „The strategies of DNA immobilization and hybridization detection mechanism in the construction of electrochemical DNA sensor: A review”, *Sens Biosensing Res*, t. 16, s. 19–31, lis. 2017, doi: 10.1016/j.sbsr.2017.09.001.
- [90] J. C. Love, L. A. Estroff, J. K. Kriebel, R. G. Nuzzo, i G. M. Whitesides, „Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology”, *Chem Rev*, t. 105, nr 4, s. 1103–1170, kwi. 2005, doi: 10.1021/cr0300789.
- [91] R. Tavallaie, N. Darwish, D. Brynn Hibbert, i J. Justin Gooding, „Nucleic-acid recognition interfaces: how the greater ability of RNA duplexes to bend towards the surface influences electrochemical sensor performance”, *Chemical Communications*, t. 51, nr 92, s. 16526–16529, 2015, doi: 10.1039/C5CC05450H.
- [92] M. Pividori, „Electrochemical genosensor design: immobilisation of oligonucleotides onto transducer surfaces and detection methods”, *Biosens Bioelectron*, t. 15, nr 5–6, s. 291–303, sie. 2000, doi: 10.1016/S0956-5663(00)00071-3.

- [93] <https://www.cdc.gov/diphtheria/clinicians.html> - dostęp: 21.03.2022
- [94] W. A. P. , H. J. , et al. Hall E., *Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases*, 14. wyd. Waszyngton: Public Health Foundation, 2021.
- [95] <https://immunizationdata.who.int/pages/incidence/diphtheria.html?CODE=Global&YEAR=> - dostęp: 21.03.2022
- [96] K. H. Engler, T. Glushkevich, I. K. Mazurova, R. C. George, i A. Efstratiou, „A modified Elek test for detection of toxigenic corynebacteria in the diagnostic laboratory”, *J Clin Microbiol*, t. 35, nr 2, s. 495–498, luty 1997, doi: 10.1128/jcm.35.2.495-498.1997.
- [97] N. C. Sharma, A. Efstratiou, I. Mokrousov, A. Mutreja, B. Das, i T. Ramamurthy, „Diphtheria”, *Nat Rev Dis Primers*, t. 5, nr 1, s. 81, grudz. 2019, doi: 10.1038/s41572-019-0131-y.
- [98] M. Zeinoddini, A. Azizi, S. Bayat, i Z. Tavasoli, „Localized Surface Plasmon Resonance (LSPR) Detection of Diphtheria Toxoid Using Gold Nanoparticle-Monoclonal Antibody Conjugates”, *Plasmonics*, t. 13, nr 2, s. 583–590, kwi. 2018, doi: 10.1007/s11468-017-0548-7.
- [99] W. A. Ameku *i in.*, „A Pencil-Lead Immunosensor for the Rapid Electrochemical Measurement of Anti-Diphtheria Toxin Antibodies”, *Biosensors (Basel)*, t. 11, nr 12, s. 489, lis. 2021, doi: 10.3390/bios11120489.
- [100] M. H. Sonobe *i in.*, „Determination of low tetanus or diphtheria antitoxin titers in sera by a toxin neutralization assay and a modified toxin-binding inhibition test”, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, t. 40, nr 1, s. 69–76, sty. 2007, doi: 10.1590/S0100-879X2007000100009.
- [101] V. Venkatesan, S. L. Hoti, N. Kamaraj, S. Ghosh, i K. Rajaram, „Optimisation of an asymmetric polymerase chain reaction assay for the amplification of single-stranded DNA from *Wuchereria bancrofti* for electrochemical detection”, *Mem Inst Oswaldo Cruz*, t. 108, nr 6, s. 804–807, wrz. 2013, doi: 10.1590/0074-0276108062013020.
- [102] H. J. Crabtree *i in.*, „Inhibition of on-chip PCR using PDMS–glass hybrid microfluidic chips”, *Microfluid Nanofluidics*, t. 13, nr 3, s. 383–398, wrz. 2012, doi: 10.1007/s10404-012-0968-9.
- [103] Y. Liu, L. Zhang, W. Wu, M. Zhao, i W. Wang, „Restraining non-specific adsorption of protein using Parylene C-caulked polydimethylsiloxane”, *Biomicrofluidics*, t. 10, nr 2, s. 024126, mar. 2016, doi: 10.1063/1.4946870.
- [104] Y. Xue, I. Braslavsky, i S. R. Quake, „Temperature effect on polymerase fidelity”, *Journal of Biological Chemistry*, t. 297, nr 5, s. 101270, lis. 2021, doi: 10.1016/j.jbc.2021.101270.
- [105] N. Ramalingam, M. E. Warkiani, i T. H.-Q. Gong, „Acetylated bovine serum albumin differentially inhibits polymerase chain reaction in microdevices”, *Biomicrofluidics*, t. 11, nr 3, s. 034110, maj 2017, doi: 10.1063/1.4983692.

- [106] A. M. D. Wan, T. A. Moore, i E. W. K. Young, „Solvent Bonding for Fabrication of PMMA and COP Microfluidic Devices”, *Journal of Visualized Experiments*, nr 119, sty. 2017, doi: 10.3791/55175.
- [107] P. Sun, K. Niu, H. Du, R. Li, J. Chen, i X. Lu, „Sensitive Electrochemical Biosensor for Rapid Screening of Tumor Biomarker TP53 Gene Mutation Hotspot”, *Biosensors (Basel)*, t. 12, nr 8, s. 658, sie. 2022, doi: 10.3390/bios12080658.
- [108] <https://eu.idtdna.com/site/account/login?returnurl=%2Fcalc%2Falyzer> - dostęp: 21.03.2022
- [109] T. Špringer, H. Šípová, H. Vaisocherová, J. Štěpánek, i J. Homola, „Shielding effect of monovalent and divalent cations on solid-phase DNA hybridization: surface plasmon resonance biosensor study”, *Nucleic Acids Res*, t. 38, nr 20, s. 7343–7351, lis. 2010, doi: 10.1093/nar/gkq577.
- [110] A. Szymczyk, K. Soliwodzka, M. Moskal, K. Rózanowski, i R. Ziółkowski, „Further insight into the possible influence of electrode blocking agents on the stem-loop based electrochemical DNA sensor parameters”, *Sens Actuators B Chem*, t. 354, s. 131086, mar. 2022, doi: 10.1016/j.snb.2021.131086.
- [111] M. Tichoniuk, M. Ligaj, i M. Filipiak, „Application of DNA Hybridization Biosensor as a Screening Method for the Detection of Genetically Modified Food Components”, *Sensors*, t. 8, nr 4, s. 2118–2135, mar. 2008, doi: 10.3390/s8042118.
- [112] D. Kang, A. Vallée-Bélisle, A. Porchetta, K. W. Plaxco, i F. Ricci, „Re-engineering Electrochemical Biosensors To Narrow or Extend Their Useful Dynamic Range”, *Angewandte Chemie International Edition*, t. 51, nr 27, s. 6717–6721, lip. 2012, doi: 10.1002/anie.201202204.
- [113] H. Trzeciakiewicz, J. Esteves-Villanueva, R. Soudy, K. Kaur, i S. Martić-Milne, „Electrochemical Characterization of Protein Adsorption onto YNGRT-Au and VLGXE-Au Surfaces”, *Sensors*, t. 15, nr 8, s. 19429–19442, sie. 2015, doi: 10.3390/s150819429.
- [114] R. P. C. Driessen *i in.*, „Effect of Temperature on the Intrinsic Flexibility of DNA and Its Interaction with Architectural Proteins”, *Biochemistry*, t. 53, nr 41, s. 6430–6438, paź. 2014, doi: 10.1021/bi500344j.
- [115] T. Arakawa, Y. Kita, i S. N. Timasheff, „Protein precipitation and denaturation by dimethyl sulfoxide”, *Biophys Chem*, t. 131, nr 1–3, s. 62–70, grudz. 2007, doi: 10.1016/j.bpc.2007.09.004.
- [116] N. Dave i J. Liu, „Fast Molecular Beacon Hybridization in Organic Solvents with Improved Target Specificity”, *J Phys Chem B*, t. 114, nr 47, s. 15694–15699, grudz. 2010, doi: 10.1021/jp106754k.
- [117] D. S.-H. Chan *i in.*, „Effect of DMSO on Protein Structure and Interactions Assessed by Collision-Induced Dissociation and Unfolding”, *Anal Chem*, t. 89, nr 18, s. 9976–9983, wrz. 2017, doi: 10.1021/acs.analchem.7b02329.



- [118] R. Ziółkowski, A. Kaczmarek, I. Kośnik, i E. Malinowska, „Reduced nonspecific protein adsorption by application of diethyldithiocarbamate in receptor layer of diphtheria toxoid electrochemical immunosensor”, *Bioelectrochemistry*, t. 132, s. 107415, kwi. 2020, doi: 10.1016/j.bioelechem.2019.107415.
- [119] A. F. Raigoza, G. Kolettis, T. E. S. Brandt, G. Caponigri-Guerra, C. Agostino, i S. A. Kandel, „Coadsorption of Octanethiol and Dialkyldithiocarbamate on Au(111)”, *The Journal of Physical Chemistry C*, t. 116, nr 2, s. 1930–1934, sty. 2012, doi: 10.1021/jp2110538.

## Wykaz skrótów

$\mu$ TAS –	zminiaturyzowane całościowe systemy analityczne
ACV –	woltamperometria prądu zmiennego (sinusoidalna)
aPCR –	asymetryczny PCR
bp –	para zasad azotowych nukleotydów
cDNA –	DNA o sekwencji nukleotydów komplementarnej do sondy w warstwie receptorowej
cDNA-W –	cDNA wskaźnikowe, wyizolowane z mieszaniny poreakcyjnej oraz oczyszczone przy użyciu HPLC
cDNA-PT –	cDNA, które zostało amplifikowane w wyniku reakcji aPCR prowadzonej w termocyklerze
cDNA-PM –	cDNA, które zostało amplifikowane w wyniku reakcji aPCR prowadzonej w mikrosystemie
CNC –	komputerowe sterowanie urządzeniami numerycznymi
COC –	cykliczny kopolimer poliolefinowy
CV –	woltamperometria cykliczna
ddPCR –	droplet digital PCR (emulsyjny PCR)
DEDTC –	dietyloditiokarbaminian
DNA –	kwasy deoksyrybonukleinowe
dNTPs –	deoksynukleotydy
dPCR –	digital PCR
dsDNA –	podwójna nić DNA
EDTA –	kwasy etylenodiaminotetraoctowe (kwasy wersenowe)
HPLC –	wysokosprawna chromatografia cieczowa
ITO –	tlenek cyny indu

LOC –	lab-on-a-chip (laboratorium na chipie)
MCH –	merkaptoheksanol
MEMS –	mikroukład elektromechaniczny
PC –	poliwęglan
PCR –	reakcja łańcuchowa polimerazy
PDMS –	poli(dimetylosiloksan)
PET –	poli(tereftalan etylenu)
PLA –	polilaktyd
PMMA –	poli(metakrylan metylu)
POC –	miejsce opieki nad pacjentem (odnosi się również do typu urządzeń)
RNA –	kwasy rybonukleinowe
SLA –	stereolitografia
ssDNA –	pojedyncza nić DNA
SWV –	woltamperometria fali prostokątnej
TBE –	bufor stosowany w elektroforezie żelowej (Tris/kwas borowy/EDTA)