

Bartłomiej CICHY*, Anna GÓRECKA-DRZAZGA, Jan A. DZIUBAN*POLITECHNIKA WROCŁAWSKA, WYDZIAŁ ELEKTRONIKI MIKROSYSTEMÓW I FOTONIKI, ZAKŁAD MIKROINŻYNIERII I FOTOWOLTAIKI
ul. Janiszewskiego 11/17, 50-372 Wrocław**Miniaturowy krzemowo-szklany mikrocytometr zintegrowany z miniaturowym źródłem światła****Mgr inż. Bartłomiej CICHY**

Jest studentem ostatniego roku studiów doktoranckich prowadzonych na Wydziale Elektroniki Mikrosystemów i Fotoniki Politechniki Wrocławskiej, w dziedzinie Mikrosystemy. W roku 2006 uzyskał stopień magistra inżyniera na wydziale Elektroniki Mikrosystemów i Fotoniki. Jest członkiem Polskiego Towarzystwa Technik Sensorowych. Jego zainteresowania naukowe obejmują badania w zakresie emisji polowej z nanomateriałów, syntezy nanomateriałów kompozytowych oraz ich zastosowania w mikrosystemach cieczowych.

e-mail: bartlomiej.cichy@pwr.wroc.pl

**Dr hab. inż. Anna GÓRECKA-DRZAZGA**

Stopień naukowy doktora nauk technicznych uzyskała w 1978 roku w Instytucie Technologii Elektronowej Politechniki Wrocławskiej. Stopień doktora habilitowanego nauk technicznych z dyscypliny Elektronika, specjalność Mikrosystemy, uzyskała w roku 2008 na Wydziale Elektroniki Mikrosystemów i Fotoniki. Jest członkiem Polskiego Towarzystwa Technik Sensorowych. Zainteresowania naukowe: mikroinżynieria, mikrosystemy typu MEMS i MOEMS, mikrofluidyka, nanoelektronika próżniowa

e-mail: anna.gorecka-drzazga@pwr.wroc.pl

**Streszczenie**

W pracy przedstawiono krzemowo-szklany chip mikrofluidyczny tzw. mikrocytometr. Jest to miniaturowe urządzenie do analizy parametrów różnych komórek (przepływającego obiektu biologicznego) wprowadzonych do układu mikrokanałów. Prezentowany mikrocytometr przystosowany jest do wprowadzania światła prostopadle do kierunku przepływu badanej próbki. Do oświetlenia próbki opracowano miniaturowe krzemowo-szklane źródło światła. Źródło to wykorzystuje emisję polową elektronów z wielościennych nanorurek węglowych oraz wzbudzenie luminescencji w nanokrystalicznym luminoforze tlenkowym. Ze względu na kompatybilność technologiczną obu miniaturowych urządzeń jest możliwa ich pełna integracja. Opracowany chip został zastosowany do analizy właściwości pojedynczych komórek zwierzęcych metodą pomiaru wzbudzonej fluorescencji. Wstępne testy wykazały, że krzemowo-szklany mikrocytometr umożliwia ocenę stanu biologicznego oocytów zwierzęcych poddanych indukowanej apoptozie.

Słowa kluczowe: mikrocytometr, biochip, emisja polowa, polowe źródła światła, zwierzęce oocyty.

Miniature silicon-glass microcytometer integrated with miniature light source**Abstract**

A new silicon-glass microfluidic chip called microcytometer is presented in the paper. It is a miniature device for examining parameters of microscopic particles, such as cells which are suspended in a stream of fluid flowing by microchannel. This chip allows introduction of light beam vertically to the sample flow direction. Miniature light source for lighting the analysed cell was elaborated. The light source makes use of electron emission for cold cathode as an effect of a very high electrical field. Field-emitted electrons from multiwall carbon nanotubes excite luminescence from nanocrystalline oxide phosphors. Because of technological compatibility of both miniature devices, they can be fully integrated. The microcytometer was used for fluorimetric measurements of single living, animal cells. The first results showed that the silicon-glass microcytometer allowed estimation of biological conditions of animal oocytes which were subjected to induced apoptosis.

Keywords: microcytometer, biochip, field emission, field-emission light sources, animal oocytes.

Prof. dr hab. inż. Jan A. DZIUBAN

Specjalizuje się w mikroinżynierii krzemu i szkła oraz budowie mikrosystemów fizycznych, chemicznych i biologicznych. Kieruje Wydziałowym Zakładem Mikroinżynierii i Fotowoltaiki WEMiF, PWr. Współpracuje z wieloma ośrodkami krajowymi i zagranicznymi a szczególnie z ITE w Warszawie i FEMTO ST w Besançon. Jest członkiem zarządu PTTS, członkiem kilku sekcji PAN, członkiem Komitetu Sterującego Eurosensors i IVNC, oraz nominowanym przewodniczącym Konferencji Eurosensors 2012.

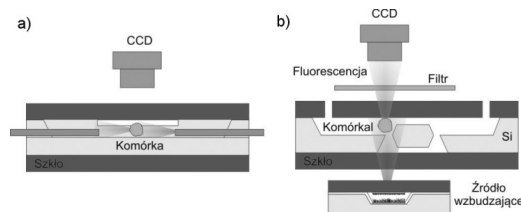
e-mail: jan.dziuban@pwr.wroc.pl

**1. Wstęp**

W wielu ośrodkach na świecie rozwijane są mikrosystemy przepływowe tzw. lab-on-a-chipy (LOC). Są to miniaturowe urządzenia budowane głównie z krzemu, szkła i polimerów z wykorzystaniem technik mikroelektronicznych i mikroinżynierijnych. Mogą zawierać układ mikrokanałów przepływowych, mikrokomory do prowadzenia różnych reakcji chemicznych/biochemicznych, mieszalniki, mikropompki, mikrodozowniki i mikrozapory. Lab-on-a-chipy znajdują szerokie zastosowanie w technice, analityce i medycynie.

W niniejszej pracy przedstawiono wyniki badań nad konstrukcją i technologią lab-on-a-chipa, który pozwala na przeprowadzenie pomiarów próbki biologicznej metodą spektrofotometryczną (VIS/NIR) lub/ oraz metodą spektrofluorymetryczną (rys. 1). Pierwsza z nich umożliwia analizę właściwości absorpcyjnych materiału biologicznego, druga analizę światła fluorescencyjnego emitowanego przez znacznik fluorescencyjny (fluorochrom, barwnik) przyłączony do badanej próbki biologicznej. Fluorescencja fluorochromu wzbudzana jest przez zewnętrzne źródło światła. Długość fali źródła wzbudzającego musi być dobrana do rodzaju zastosowanego fluorochromu. Lab-on-a-chip zaprojektowano tak, aby pełnił rolę mikrocytometru analizującego żywe, pojedyncze komórki zwierzęce.

Do wzbudzenia fluorescencji zaprojektowano nową wersję miniaturowego, polowego źródła światła [1]. Jest to miniaturowe urządzenie, w którym katodę polową wykonano na podłożu krzemowym. Powierzchnia katody została zmodyfikowana przez osadzenie nanorurek węglowych, które stanowiły nanoemitery polowe.



Rys. 1. Schemat mikrocytometru do badań próbek biologicznych: a) chip pracujący w trybie absorpcyjnym a kamerą CCD, b) chip pracujący w trybie fluorymetrycznym z wykorzystaniem miniaturowego polowego źródła światła

Fig. 1. Scheme of microcytometer for biosamples investigations: a) chip working in absorption mode with CCD camera, b) chip working in fluorimetric mode with use of the field-emission light source

Anodę źródła wykonano w postaci szklanego podłoża, na które naniesiono cienką warstwę, niskonapięciowego luminoforu, bazującego na nanokrystalicznym tlenku itru domieszkowanym jonami metali ziem rzadkich.

Światło emitowane przez miniaturowe źródło wzbudza sygnał fluorescencyjny, który jest zbierany za pomocą czulej kamery CCD, archiwizowany oraz przetwarzany z zastosowaniem specjalnie opracowanego oprogramowania autorskiego.

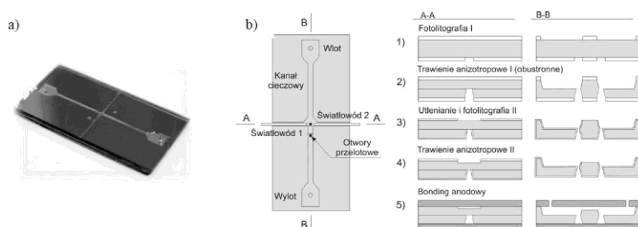
Od dłuższego czasu, w Polsce trwają prace nad konstrukcją urządzenia oraz opracowaniem metod do prowadzenia pomiarów jakościowych żywych komórek zwierzęcych [2]. Szczególne zainteresowanie zwrócone jest w kierunku prowadzenia badań nad niezapłodnionymi komórkami jajowymi (oocytami) oraz embriunami zwierząt hodowlanych. Zagadnienie poprawnej klasyfikacji niezapłodnionych komórek zwierzęcych odgrywa bowiem bardzo ważną rolę w procesach rozmnażania in vitro bydła oraz trzody chlewnej. W związku z tym, w niniejszej pracy wykorzystano miniaturowy cytometr do nieniszczących, jakościowych badań żywych komórek zwierzęcych.

2. Mikrocytometr

Mikrocytometr jest urządzeniem, od którego wymagana jest duża precyzja w manipulacji próbką biologiczną np. komórką. Badana komórka musi być przetransportowana do skrzyżowania mikrokanalów (celi optycznej), przeanalizowana optycznie i następnie wyprowadzona w nieszkodzonej postaci na zewnątrz chipa. W związku z tym zaprojektowano chip przepływowy o trójwarstwowej strukturze szkło/krzem/szkło (biokompatybilne materiały). Obie warstwy szkła (górną i dolną) stanowią „pokrywkę” hermetyzującą warstwę krzemu, w której po obu stronach wytworzono układ mikrokanalów transportująco-pozycjonujących komórkę oraz otwór do jej oświetlenia.

Do wykonania mikrocytometru wykorzystano 3-calowe podłoże krzemowe typu n, o rezystywności 3–5 $\Omega\cdot\text{cm}$ i orientacji krystalograficznej (100). Po kolejnych procesach utleniania termicznego i fotolitografii po obu stronach podłoża krzemowego zostały uformowane mikrokanaly metodą mokrego anizotropowego trawienia krzemu (10 mol/dm³ KOH, 80°C) (rys. 2).

Główną część mikrocytometru stanowi mikrokanal o głębokości 200 μm i szerokości 500 μm , w którym następuje transport oraz pozycjonowanie badanej komórki. W urządzeniu wykorzystano efekt samopozycjonowania się komórki na „progu” krzemowym, wykonanym jako miejscowe zmniejszenie głębokości kanału głównego do 50 μm (rys. 2b 4A-A i 4B-B). Miejsce zatrzymania komórki jest ściśle zgrane z wytworzonym otworem do wprowadzania światła od dolnej strony chipa. Prostopadłe do kanału głównego w miejscu pozycjonowania komórki wykonano również dwa V-rowki, przeznaczone do precyzyjnego doprowadzenia dwóch światłowodów oświetlająco/zbiornych przydatnych do badań spektrofotometrycznych.

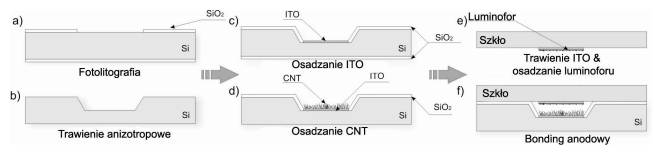


Rys. 2. Krzemowo-szklany mikrocytometr: a) zdjęcie gotowego urządzenia, b) najważniejsze etapy procesu wytwarzania

Fig. 2. Silicon-glass microcytometer: a) photo of the realised device, b) main steps of the fabrication process

3. Polowe źródło światła

Opracowano konstrukcję miniaturowego źródła światła, zgodnego technologicznie z konstrukcją krzemowo-szklanego mikrocytometru. Źródło światła wykorzystuje efekt emisji polowej elektronów, które pobudzają do świecenia nanokrystaliczny luminofor [1]. Katodę polową źródła światła, wykonano na 3-calowym podłożu krzemowym o rezystywności 1–5 $\Omega\cdot\text{cm}$, i orientacji krystalograficznej (100).



Rys. 3. Główne etapy wytwarzania krzemowo-szklanego źródła światła wykorzystującego efekt emisji polowej a) fotolitografia, b) trawienie, c) osadzanie ITO, d) osadzanie CNT, e) osadzanie luminoforu, f) hermetyzacja

Fig. 3. Main steps of the fabrication process of a silicon-glass field-emission light source a) photolithography, b) KOH etching, c) ITO deposition, d) CNT deposition, e) phosphor deposition, f) vacuum sealing

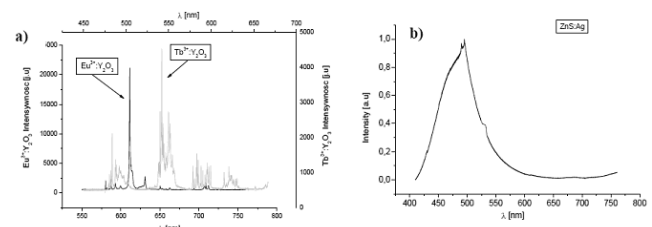
W pierwszej kolejności w podłożu krzemowym wytrawiono selektywnie płytkie zagłębienie o rozmiarach $5\times 5\times 0,07\text{ mm}^3$, którego głębokość odpowiada odległości anoda-katoda w gotowym źródle światła (rys. 3b). Następnie podłoże utleniono termicznie w celu uzyskania warstwy izolacyjnej o grubości 1 μm . W warstwie tlenku odsłonięto fotolitograficznie okno $3\times 3\text{ mm}^2$ znajdujące się na dnie zagłębienia.

W dalszej kolejności na podłożu krzemowe naniesiono warstwę przezroczystego, przewodzącego tlenku indow-cynowego (ITO) o grubości 100 nm [3]. Warstwa ITO charakteryzowała się transmisją światła lepszą niż 80% oraz małą rezystywnością $2\cdot 10^{-4}\ \Omega\cdot\text{cm}$. Zbędna część warstwy ITO usunięto formując w ten sposób elektrodę do osadzania nanorurek węglowych metodą elektroforetyczną (rys. 3c). Proces osadzania wielościennych nanorurek węglowych prowadzono w roztworze koloidalnym, w którym ośrodkiem rozpraszającym był 2-propanol (IPA), z dodatkiem azotanu magnezu ($\text{Mg}(\text{NO}_3)_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$).

Anodę źródła wykonano na podłożu szklanym, na którym uformowano fotolitograficznie elektrodę w postaci cienkiej warstwy tlenku ITO. Na powierzchnię przezroczystej elektrody ($2\times 2\text{ mm}^2$), w miejscu odpowiadającym katodzie CNT (rys. 3e), osadzono nanokrystaliczny luminofor (metodą elektroforetyczną). Ze względu na przewidywania co do właściwości spektralnych emitowanego światła wykorzystano dwa luminofory bazujące na matrycy tlenku itru, domieszkowanej jonami europu oraz terbu ($\text{Re:Y}_2\text{O}_3$ Re = Eu^{3+} , Tb^{3+}). Do wytworzenia nanokrystalicznych luminoforów wykorzystano chemiczną metodę spaleniową [4].

Jako luminofor niebieski użyto komercyjnie dostępny proszek siarczku cynku aktywowanego srebrem (ZnS:Ag). Wybrane luminofory pokrywają zakres trzech podstawowych linii spektralnych: niebieskiej (ZnS:Ag), zielonej/żółtej ($\text{Tb}^{3+}:\text{Y}_2\text{O}_3$) oraz czerwonej ($\text{Eu}^{3+}:\text{Y}_2\text{O}_3$), które są powszechnie wykorzystywane w badaniach biochemicznych (rys. 4) [2].

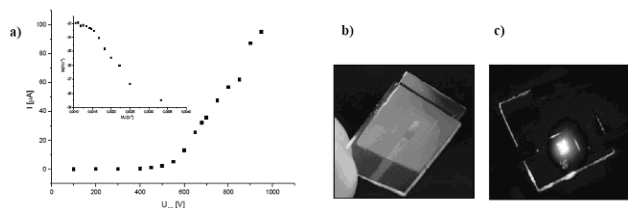
Wykorzystanie jonów ziem rzadkich jako centrów emisyjnych pozwala otrzymać charakterystyki spektralne o bardzo wąskich liniach emisyjnych (rys. 4a). Właściwość ta może być bardzo korzystna w pomiarach spectrofluorymetrycznych próbek biologicznych.



Rys. 4. Charakterystyki widmowe luminoforów: a) nanokrystalicznych pracujących w zakresie linii czerwonej i zielonej/żółtej, b) mikrokrystalicznego komercyjnego (ZnS:Ag) pracującego w zakresie światła niebieskiego

Fig. 4. Spectral characteristics of: a) nanocrystalline phosphors belonging to red and green/yellow lines, b) micro-grained commercial blue phosphor (ZnS:Ag)

Anoda i katoda zostały ze sobą połączone i gotowe źródło światła zostało scharakteryzowane w próżni bezolejowej ($2\cdot 10^{-3}\text{ hPa}$). Uzyskano emisję polową elektronów przy stosunkowo niskim napięciu progowym (300V) oraz wysoką wydajność prądową (50 μA przy 800 V) (rys. 5). Wytworzone luminofory wykazywały właściwości luminescencyjne już podczas pracy przy napięciu anoda-katoda ok. 300 V.

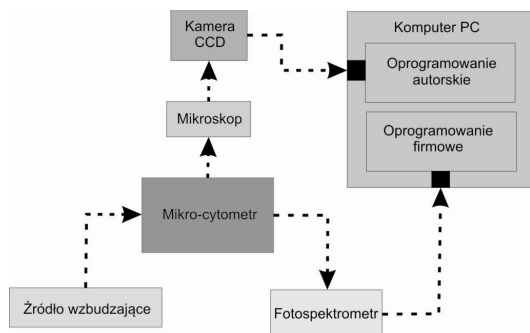


Rys. 5. Miniaturowe polowe źródło światła: a) charakterystyka prądowo-napięciowa, b) po procesie hermetyzacji, c) emisja światła z luminoforu ZnS:Ag, $U_{A-K} = 800$ V

Fig. 5. Miniature field-emission light source: a) current-voltage characteristic, b) after encapsulation, c) light emission from ZnS:Ag phosphor, $U_{A-K} = 800$ V

4. Eksperymenty

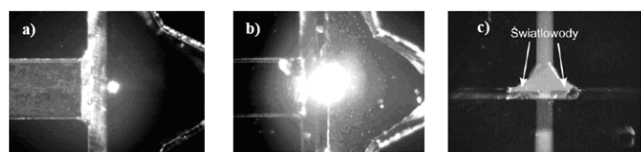
Wstępne testy opracowanego mikrocytometru przeprowadzono na stanowisku pomiarowym, które zostało zbudowane ze źródła światła, fotospektrometru, czułej kamery CCD oraz komputera wyposażonego w oprogramowanie autorskie FluoProject (rys. 6).



Rys. 6. Schemat blokowy systemu do prowadzenia pomiarów spektrofluorescencyjnych

Fig. 6. Block diagram of a system for spectrofluorescence measurements

Kamerę CCD zainstalowano w okularze mikroskopu optycznego tak, aby można było obserwować zmiany zachodzące w mikrokanale cytometru. Opracowane oprogramowanie o nazwie FluoProject zapewniało przechwytywanie danych i ich zapis w postaci filmu oraz przetwarzanie każdej ramki filmu w celu wizualizacji wyników. Zmiana intensywności fluorescencji badanej próbki była obrazowana w przestrzeni trójwymiarowej w postaci różnicy wysokości linii.



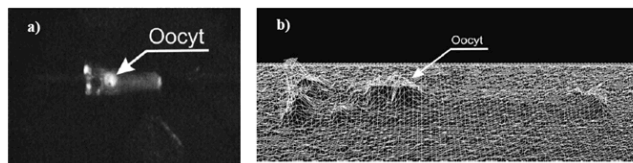
Rys. 7. Centralna część mikrocytometru: a) miejsce pozycjonowania badanej komórki, widoczny jest otwór do jej oświetlenia, b) miejsce pozycjonowania oświetlone przez źródło światła wzbudzającego, c) sygnał fluorescencji wzbudzony w wodnym roztworze fluoresceiny

Fig. 7. Central part of the microcytometer: a) the place for cell positioning, back-lighting hole is visible, b) the positioning place back-lighted by excitation light, c) fluorescence light emitted from fluorescein water solution

Pierwsze testy pracy mikrocytometru oraz współpracującego z nim systemu detekcji zostały wykonane dla wodnego roztworu fluoresceiny pobudzonej do świecenia diodą LED 490 nm. Światło wprowadzono do mikrokanalu przez otwór uformowany od dolnej strony mikrocytometru. Na rysunku 7 pokazano centralną część chipa, gdzie na skrzyżowaniu mikrokanalów widoczny jest otwór podświetlony światłem diody LED (rys. 7b) oraz emisja światła fluorescencyjnego przez wodny roztwór fluoresceiny (rys. 7c).

Pierwsze testy biologiczne przeprowadzono wykorzystując oocyty świni oraz pakiet znaczników fluorescencyjnych (Annexin-V FLUOS kit), składający się z Annexiny-V-Fluoresceiny oraz jodku propidyny. Pakiet ten jest przeznaczony do przeprowadzania badań

różnicujących komórki w stanie apoptycznym oraz ich charakteryzacji. Komórkę o średnicy 100 μm umieszczono pomiędzy dwoma światłowodami ułożonymi prostopadle do głównego mikrokanalu. Jeden ze światłowodów wykorzystano jako oświetlający, podczas gdy drugi z nich służył jako światłowod zbiorczy. Oocyty świni w stanie indukowanej apoptozy oświetlano diodą LED 490 nm i obserwowano jego fluorescencję (rys. 8).



Rys. 8. Fluorescencja oocytu świniowego znakowanego Annexin-V FLUOS: a) obraz fluorescencji, b) intensywność sygnału fluorescencji zobrazowana przez oprogramowanie FluoProject

Fig. 8. Fluorescence of the porcine oocyte tagged by Annexin-V FLUOS kit: a) photo of fluorescence, b) fluorescence intensity imaging by FluoProject software

Wykonane próby potwierdziły, że konstrukcja mikrocytometru umożliwia wzbudzenie fluorescencji w komórce biologicznej znakowanej fluorochromem. Pierwsze testy potwierdziły możliwość wzbudzenia fluorescencji w oocycie znajdującym się w stanie indukowanej apoptozy.

5. Podsumowanie

W pracy przedstawiono konstrukcję i technologię mikrocytometru przeznaczonego do jakościowej analizy próbek biologicznych np. żywych komórek zwierzęcych. Konstrukcja mikrocytometru umożliwia wykonywanie badań materiału biologicznego metodą spektrofotometryczną i fluorescencyjną. Do badań fluorescencyjnych opracowano konstrukcję miniaturowego, polowego źródła światła, które ze względu na kompatybilność technologiczną może być zintegrowane z krzemowo-szklanym mikrocytometrem. Na podstawie przeprowadzonych testów można stwierdzić, że opracowany krzemowo-szklany mikrocytometr prawidłowo współpracuje z układem detekcji wyposażonym w autorskie oprogramowanie. System ten może być wykorzystywany do fluorescencyjnej analizy różnych próbek biologicznych.

Autorzy dziękują prof. dr hab. Jędrzejowi Jaśkowskiemu i mgr. Marcie Jackowskiej z Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu oraz mgr. Bartoszowi Kempistemu z Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu za udostępnienie materiału biologicznego oraz metodologii prowadzenia pomiarów jakościowych oocytów zwierzęcych. Autorzy dziękują również mgr. Patrycji Szczepańskiej za pomoc w pomiarach. Praca była finansowana z grantu promotorskiego nr N N515 336636.

6. Literatura

- [1] Cichy B., Górecka-Drzazga A., Dziuban J. A.: Field-emission light source utilizing carbon nanotubes and composite phosphor made of SiO₂ nanospheres covered with Y₂O₃:Eu. *J. Vac. Sci. Technol. B* 27, 2009. 757-760.
- [2] Szczepańska P., Walczak R., Dziuban J., Jackowska M., Kempisty B., Jaśkowski J., Bargiel S.: Lab-on-chip quality classification of porcine/bosine oocytes. *Procedia Chemistry*. 1, 2009. 341-344.
- [3] Cichy B., Posadowski W., Górecka-Drzazga: Efektywne niskotemperaturowe osadzanie tlenku indow-cynowego (ITO) metodą impulsowego rozpylania magnetronowego. *Elektronika – Konstrukcje, Technologie, Zastosowania*. 6, 2008. 101-103.
- [4] Vu N., Anh T. K., Yi G. C., Stręg W.: Photoluminescence and cathodoluminescence properties of Y₂O₃:Eu nanophosphors prepared by combustion synthesis. *Journal of Luminescence*. 122-123, 2007. 776-779.
- [5] Oosthuizen L., Swart H. C., Viljoen P. E. et al.: ZnS:Cu, Al, Au phosphor degradation under electron excitation. *Applied Surface Science*. 120, 1997. 9-14.