

Rafał WALCZAK^{1,2}¹ POLITECHNIKA WROCŁAWSKA, WYDZIAŁ ELEKTRONIKI MIKROSYSTEMÓW I FOTONIKI, ZAKŁAD MIKROINŻYNIERII I FOTOWOLTAIKI
ul. Janiszewskiego 11/17, 50-372 Wrocław² INSTYTUT TECHNOLOGII ELEKTRONICZNEJ W WARSZAWIE, Al. Lotników 32/46, 02-668 Warszawa**Analizatory DNA/PCR typu lab-chip z detekcją fluorometryczną****Dr inż. Rafał WALCZAK**

Jest absolwentem Wydziału Elektroniki Politechniki Wrocławskiej. W roku 2004 otrzymał tytuł doktora inżyniera na Wydziale Elektroniki Mikrosystemów i Fotoniki Politechniki Wrocławskiej. W chwili obecnej jest zatrudniony na etacie adiunkta w Wydziałowym Zakładzie Mikroinżynierii i Fotowoltaiki tego Wydziału. Jego zainteresowania naukowe skupiają się wokół technologii lab-chipów oraz detekcji i przetwarzania sygnałów optycznych z mikro- i nanoobjętości.



e-mail: rafal.walczak@pwr.wroc.pl

Streszczenie

W artykule przedstawiono przegląd analizatorów DNA wykorzystujących technikę real-time PCR i lab-chipy. Zaprezentowano opis opracowanej metodologii i instrumentarium do detekcji fluorescencji z wykorzystaniem miniaturowanych komponentów optoelektronicznych i „inteligentnego” oprogramowania analizującego. Przedstawiono dwa przykłady miniaturowanych analizatorów real-time PCR/DNA opracowanych w ramach projektów europejskich i krajowych wykorzystujących lab-chipy i nowatorską metodę detekcji fluorometrycznej.

Słowa kluczowe: real-time PCR, lab-chip, fluorescencja.**Lab-on-a-chip DNA/PCR analyzers with fluorometric detection****Abstract**

The paper presents a novel miniaturized optical instrumentation for fluorescence excitation and detection for miniaturized real-time PCR analyzers using lab-on-a-chip (LOC) devices. Application of miniaturized semiconductor laser to fluorescence excitation, CCD-minicamera as fluorescence photodetector and specialized software for optical signal conditioning led to development of low-cost and highly sensitive optical instrumentation. To carry out full characterization of the optical instrumentation, miniaturized thermocycler co-working with LOC was built. The optical instrumentation was tested with three LOC made of different materials and technologies, giving proper detection of fluorescence signals during real-time PCR. Finally, two miniaturized devices for real-time PCR detection and identification of DNA and utilizing described here novel optical instrumentation were briefly described. The scheme and technical realization of the novel instrumentation in laboratory version is shown in Fig. 4. The detection limit of DNA was about 0,1 ng/ml (Fig. 5). It was also found that the optical instrumentation co-works with different constructions of lab-on-a-chips for DNA real-time PCR amplification (Fig. 6). The developed optical instrumentation was successfully applied to two miniaturized devices for DNA detection and identification by real-time PCR. Technical realizations of the devices and views of the lab-on-a-chips are shown in Figs. 7 and 9. In both cases, proper detection of fluorescence signals generated during real-time PCR of *Campylobacter j.* DNA (Fig. 8) or complementary DNA (Fig. 10) were observed. It confirmed high sensitivity of the developed optical instrumentation.

Keywords: real-time PCR, lab-on-a-chip, fluorescence.**1. Wstęp**

Real-time PCR jest standardową laboratoryjną metodą analityczną. W metodzie tej możliwa jest obserwacja w czasie rzeczywistym kinetyki amplifikacji DNA oraz jej analiza, co prowadzi do ponad 100-krotnego zwiększenia czułości procesu w porównaniu do tradycyjnego procesu PCR [1]. Jednocześnie, wykorzystując to samo urządzenie i bez konieczności prowadzenia dodatkowych procesów i przenoszenia próbki, możliwe jest określenie jakości powielonego fragmentu DNA. Prawdziwym wyzwaniem jest budowa urządzeń tanich i przenośnych, nie odbiegających

swoimi parametrami (np. czułością) od stacjonarnych urządzeń laboratoryjnych. Analizatory real-time PCR typu lab-chip łączy najnowsze osiągnięcia biotechnologiczne i mikroinżynieryjne. Urządzenia te wykorzystując jedną kroplę pobranej próbki powinny w czasie od kilku do kilkunastu minut przeprowadzić analizę, która do tej pory była droga i czasochłonna. Wizja analizatora próbki biologicznej zawierającej materiał genetyczny badany metodą real-time PCR w urządzeniu typu „point-of-care” jest konsekwentnie realizowana od kilku lat przez czołowe grupy badawcze na całym świecie.

2. Analizatory real-time PCR typu lab-chip

Analizatory real-time PCR typu lab-chip składają się z czterech głównych elementów: lab-chipa, w którym prowadzony jest proces amplifikacji DNA, termocyklera cyklicznie zmieniającego temperaturę kokałtu genetycznego zgodnie z nastawionym profilem temperaturowym, układu detekcji optycznej rejestrującym sygnał fluorescencji emitowanej przez fluorochrom związany z DNA oraz jednostki kontrolno-sterującej nadzorującej pracę analizatora.

Zestawienie podstawowych cech znanych z literatury przedmiotu laboratoryjnych wersji analizatorów, o których tu mowa, przedstawiono w tabeli 1.

Tabel 1. Laboratoryjne analizatory DNA real-time PCR wykorzystujące lab-chipy

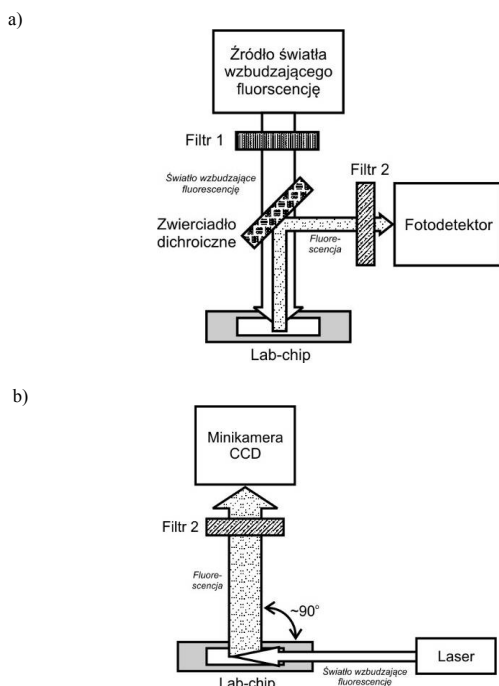
Tabel 1. Lab-chip – based laboratory real-time PCR DNA analyzers

Materiał lab-chipa	Termocykler	Źródło wzbudzające fluorescencję (długość fali)	Detektor fluorescencji	Lit.
PDMS/szkło	Zewnętrzny, cienko-warstwowy	Lampa halogenowa z filtrem (650 nm)	Chłodzona kamera CCD w układzie mikroskopu epifluorescencyjnego	2
-	Zewnętrzny, cienko-warstwowy	Lampa rtęciowa z filtrem (490 nm)	Fotopowielacz w układzie mikroskopu epifluorescencyjnego	3
PDMS/krzem	Zewnętrzny, termoelektryczny	LED z filtrem (490 nm)	Fotopowielacz z filtrem	4
PDMS/szkło	Zewnętrzny, cienko-warstwowy	Laser (640 nm)	Dioda krzemowa z filtrem	5
szkło	Zewnętrzny, grzejnik drutowy	Lampa ksenonowa z filtrem (494 nm)	Miniaturowy spektrometr CCD	6
-	Zewnętrzny, cienko-warstwowy	LED z filtrem (490 nm)	Dioda krzemowa z filtrem	7
krzem/szkło	Zewnętrzny, cienko-warstwowy	LED z filtrem (490 nm)	Dioda krzemowa z filtrem	8
SU-8/szkło	Zintegrowany cienko-warstwowy	Laser (535 nm)	Fotopowielacz z filtrem	9

Analiza rozwiązań technicznych zestawionych w tabeli 1 instrumentów wskazuje na możliwość wykonania lab-chipów umożliwiających prowadzenie reakcji real-time PCR oraz stosunkowo łatwą miniaturyzację termocyklera współpracującego z lab-chipem. Problemem jest jednak budowa miniaturowanych, tanich i czułych układów detekcji fluorometrycznej.

3. Detekcja fluorymetryczna w czasie rzeczywistym – klucz do sukcesu

W znanych rozwiązaniach (tabela 1) układów detekcji fluorymetrycznej systemów real-time PCR wykorzystuje się przede wszystkim tory optyczne mikroskopów epifluorescencyjnych z wysokoczułymi fotodetektorami lub rozwiązania oparte na podobnej konfiguracji. Tor optyczny takiego układu zapewnia efektywne wzbudzenie fluorochromu oraz zbieranie i filtrowanie optyczne sygnału fluorescencji. Jest to realizowane za pomocą zestawu drogich i wysokiej jakości filtrów optycznych oraz zwierciadeł dichroicznych (rys. 1a). Współczynnik blokowania (WB) światła wzbudzającego fluorescencję docierającego do fotodetektora wynosi wówczas co najmniej 10^6 . Fotodetektor – najczęściej fotopowielacz, dioda półprzewodnikowa, rzadziej chłodzona kamera CCD wysokiej rozdzielczości - ze względu na bardzo niski poziom sygnału fluorescencji jest elementem o wysokiej czułości, ale również drogim. Miniaturyzacja układu optycznego jest zatem istotnym krokiem w budowie przenośnych analizatorów DNA, o których tu mowa. Rozpatrzyć należy zatem dwie kwestie związane z budową układu wzbudzenia i detekcji fluorescencji.



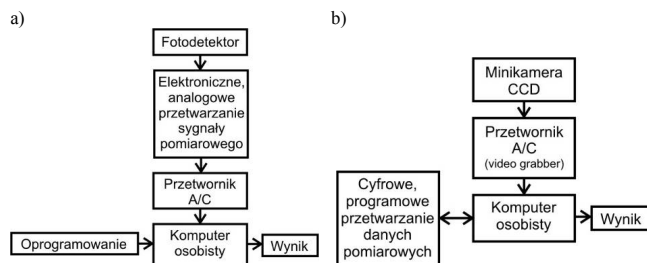
Rys. 1. Schematy torów optycznych układów do wzbudzenia i detekcji fluorescencji stosowanych w: a) typowym mikroskopie epifluorescencyjnym, b) nowej, opisanie tu metodzie

Fig. 1. Schemes of the optical paths of fluorescence excitation and detection units applied in: a) a typical epifluorescence microscope, b) a novel method described

Pierwsza kwestia to rozdzielenie światła wzbudzającego fluorescencję od fluorescencji docierającej do fotodetektora z wykorzystaniem minimalnej liczby elementów toru optycznego blokujących światło wzbudzające fluorescencję. W nowym, przedstawionym tu rozwiązaniu rozdzielanie to uzyskano przez geometryczną separację światła wzbudzającego fluorescencję docierającego do mikrokomory PCR lab-chipa w odniesieniu do kierunku zbierania fluorescencji przez układ optyczny fotodetektora (rys. 1b). Jest to możliwe przez zastosowanie miniaturowego modułu lasera półprzewodnikowego. Lasery wykorzystywane są do wzbudzenia fluorescencji od wielu lat, ale brak jest doniesień literaturowych na temat wykorzystania miniaturowych laserów współpracujących z lab-chipami. Wbudowany w moduł lasera układ optyczny formuje wiązkę laserową tak, że jest możliwe wprowadzenie światła do mikrokomory PCR lab-chipa przez planarny światłowód wytworzony w jednej ze ścianek lab-chipa. Światło laserowe rejestrowane przez fotodetektor związane jest wówczas tylko z rozpraszaniem

tego światła na strukturze lab-chipa. Wartość WB dla poprawnie zestawionego toru optycznego wynosi wówczas co najmniej 10^3 . Zastosowanie filtra interferencyjnego blokującego rozproszone światło lasera w torze optycznym fotodetektora zbierającego fluorescencję powoduje, że WB osiąga wartość na poziomie 10^6 – taką samą jak w tradycyjnym układzie, ale z zastosowaniem tylko jednego filtra w układzie wzbudzająco/rejestrującym fluorescencję.

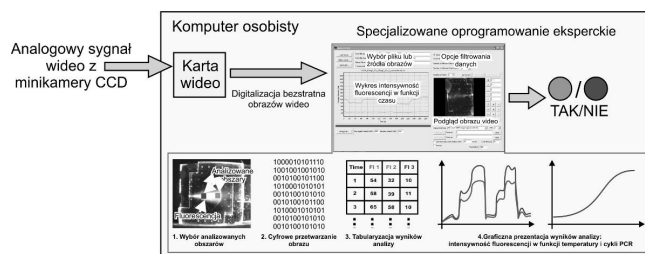
Druga kwestia to wysokoczuła detekcja fluorescencji z zastosowaniem nowych fotodetektorów i metod obróbki sygnału optycznego. W dotychczas stosowanych rozwiązaniach (rys. 2a) fotodetektor generuje analogowy sygnał elektryczny, który następnie jest przetwarzany przez analogowo/cyfrowe układy elektroniczne tak aby uzyskać sygnał elektryczny proporcjonalny do intensywności rejestrowanej fluorescencji. Należy podkreślić, że sygnał optyczny docierający do fotodetektora będzie sumą fluorescencji i innych sygnałów np. tła lub autofluorescencji materiału lab-chipa [10]. Większa część obróbki sygnału elektrycznego realizowana jest sprzętowo, co nie wymaga użycia wydajnej jednostki kontrolno-sterującej, ale drogich i wysokiej jakości komponentów układu elektronicznego. W nowym rozwiązaniu podejście do zagadnienia jest inne (rys. 2b). W rozwiązaniu tym wykorzystuje się miniaturową, wysokoczułą, ale tanią analogową kamerę CCD współpracującą z miniobiektywem i filtrem optycznym, rejestrującą obrazy mikrokomory PCR. Nieprzetworzony analogowy sygnał wideo jest digitalizowany bezstratnie przez kartę wideo połączoną z komputerem. Specjalistyczne oprogramowanie archiwizuje i analizuje te obrazy w czasie rzeczywistym lub tuż po procesie PCR. Analiza obrazu polega na wyborze obszarów, w których widoczna jest tylko fluorescencja oraz innych obszarów istotnych z punktu widzenia analizy, i ich komputerowym przetworzeniu. Przetwarzanie to polega na zamianie jasności analizowanego obszaru widocznego przez operatora na wartość liczbową odpowiadającą 8-bitowej skali szarości (rys. 3). Następnie, realizowane są operacje matematyczne w celu uzyskania wyniku analizy. W ten sposób otrzymujemy (cyfrową) obróbkę sygnału, a nie sprzętowo (analogową) jak w tradycyjnych rozwiązaniach.



Rys. 2. Schemat przetwarzania sygnału z detektora fluorescencji: a) w typowym układzie detekcji z analogowym przetwarzaniem, b) w nowym układzie z cyfrową analizą obrazu

Fig. 2. Schemes of the fluorescence signal conditioning: a) in a typical analog conditioning, b) in a digital image-based conditioning

Wynik końcowy analizy, w zależności od uprawnień użytkownika, podany może być w formie informacji, że analiza dała wynik pozytywny lub negatywny, lub z pełną informacją na temat kinetyki amplifikacji DNA w trakcie procesu PCR.

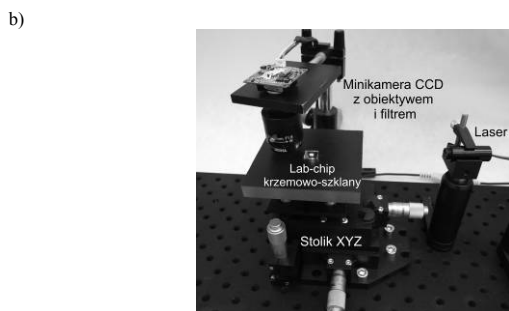
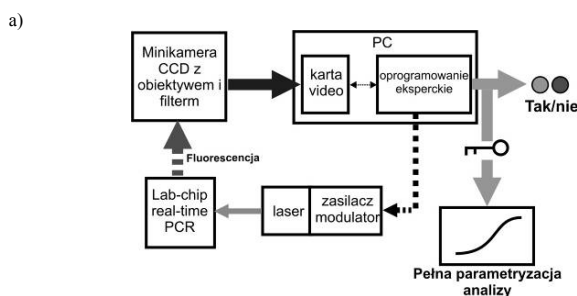


Rys. 3. Schemat przetwarzania sygnału wideo obrazu fluorescencji w lab-chipie

Fig. 3. Scheme of conditioning of the fluorescence images from the the lab-chip

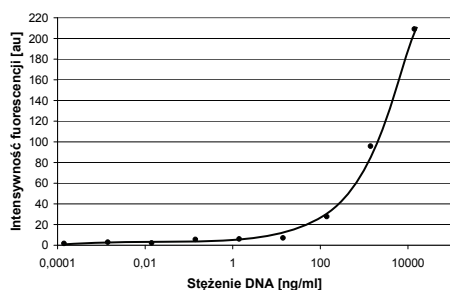
Budowa układu wzbudzenia i detekcji fluorymetrycznej oparta na miniaturowym laserze półprzewodnikowym, minikamerze CCD i komputerowej analizie obrazu nie byłaby możliwa jeszcze kilka lat temu. Nieustanny rozwój mikroelektroniki zaowocował dostępnością komputerów o mocy obliczeniowej umożliwiającej przetwarzanie obrazu w czasie rzeczywistym i tanich, ale zaawansowanych technicznie elementów optoelektronicznych – laserów i minikamer CCD.

Schemat i wygląd technicznej realizacji nowej metody detekcji fluorymetrycznej w analizatorze DNA/PCR przedstawiono na rysunku 4. Układ składa się z modułu półprzewodnikowego lasera 636 nm, lab-chipa o konstrukcji umożliwiającego boczne wprowadzenie światła do mikrokomory PCR, minikamery CCD z miniobiektywem zapewniającym odpowiednie powiększenie obrazu, filtra interferencyjnego górnoprzepustowego 650 nm przepuszczającego fluorescencję, karty wideo digitalizującej obraz wideo oraz komputera ze specjalistycznym oprogramowaniem.



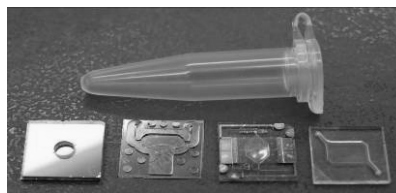
Rys. 4. Schemat (a) oraz realizacja techniczna stanowiska (b) do detekcji fluorymetrycznej
Fig. 4. Scheme (a) and technical realization of the set-up for fluorometric detection

Limit detekcji opracowanego układu zbadano z wykorzystaniem DNA pochodzącego z bakterii *Campylobacter j.* pobranej w trakcie rutynowej kontroli w jednej z duńskich farm drobiu. Osiągnięto próg detekcji wynoszący około 0,1 ng/ml DNA (rys. 5) co jest wystarczające do zastosowania w procesie real-time PCR.



Rys. 5. Zależność intensywności fluorescencji od stężenia DNA bakterii *Campylobacter j.*, zastosowano fluorochrom TO-PRO 3 o koncentracji 0,5 μM
Fig. 5. Fluorescence intensity vs. *Campylobacter j.* DNA concentration, 0,5 μM TO-PRO 3 fluorochrom was applied

W pracach własnych wykazano, że opracowany układ detekcji fluorymetrycznej współpracuje z lab-chipami wykonanymi z różnych materiałów (rys. 6) – szkło/SU-8 [11], krzem/szkło, COC lub ceramika LTCC z wbudowanym światłowodem planarnym [12].



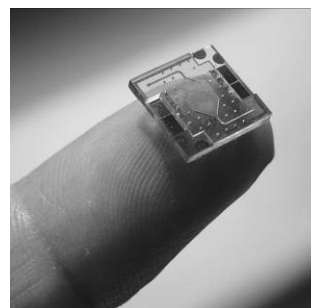
Rys. 6. Wybrane lab-chipy współpracujące z opracowanym układem detekcji fluorymetrycznej dla metody real-time PCR w porównaniu do standardowego mikropojemnika PCR

Fig. 6. Chosen lab-chips co-working with the developed novel fluorescence detection unit for real-time PCR in comparison to a standard PCR microtube

4. Analizatory lab-chip real-time PCR z nowatorską detekcją fluorescencji

Opracowany nowatorski układ detekcji fluorymetrycznej jest elementem przenośnych analizatorów DNA wykorzystujących lab-chipy i termocyklery o różnej konstrukcji.

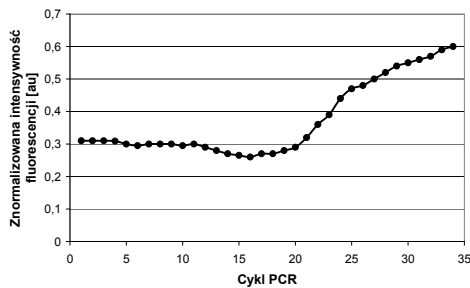
Analizator do wykrywania bakterii kałowych i patogenów żywności, wykorzystujący metodę real-time PCR, opracowano w ramach 6. PR OPTOLABCARD, realizowanego w konsorcjum przez Instytut Technologii Elektronowej w Warszawie [13]. Urządzenie to składa się z lab-chipa, chip-holdera, stacji dokującej i komputera z oprogramowaniem. Lab-chip wykonany jest z SU-8 i szkła, ma zintegrowany cienkowarstwowy grzejnik i czujnik temperatury do termocyklingu PCR. Lab-chip umieszczany jest w tzw. chip-holderze umożliwiającym łatwe wprowadzanie koktajlu genetycznego do mikrokomory PCR oraz podłączenia elektryczne do zintegrowanego termocyklera. Chip-holder jest pozycjonowany w stacji dokującej, zawierającej układ optyczny do wzbudzenia i detekcji fluorescencji oraz elementy elektroniczne sterujące pracą termocyklera. Stacja dokująca jest połączona z komputerem zawierającym specjalistyczne oprogramowanie kontrolno-sterujące pracą termocyklera i analizujące sygnały wideo z minikamery układu detekcji. Widok gotowej do pracy stacji dokującej z chip-holder i lab-chipem przedstawiono na rysunku 7.



Rys. 7. Analizator DNA real-time PCR typu lab-chip z detekcją fluorymetryczną opracowany w ramach projektu OPTOLABCARD oraz lab-chipa na palcu technologa

Fig. 7. Lab-chip – based real-time PCR DNA analyzer with the novel fluorescence read-out developed under OPTOLABCARD project and SU-8/glass lab-chip view on a technologist finger

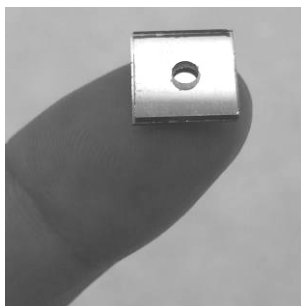
Opracowany w ramach projektu OPTOLABCARD analizator został wykorzystany do wykrywania bakterii *Campylobacter j.* w próbkach pobranych w duńskich fermach drobiu. Przeprowadzono ponad 200 prób, z czego 48 prób było pozytywnych [14]. Uzyskano prawidłową krzywą opisującą kinetykę amplifikacji DNA, tzw. S-krzywą, powstałą przez zastosowanie opisanego tutaj układu detekcyjnego i przetwarzania programowego (rys. 8). Czas pojedynczej analizy wyniósł poniżej 30 minut, czułość procesu PCR określono na 0,7 - 7 ng DNA /ml.



Rys. 8. Zależność intensywności fluorescencji od cyklu PCR – krzywa obrazująca kinetykę amplifikacji DNA bakterii *Campylobacter j.*

Fig. 8. Fluorescence intensity vs. PCR cycle number – S-curve describing kinetics of DNA amplification of *Campylobacter j.* bacterium

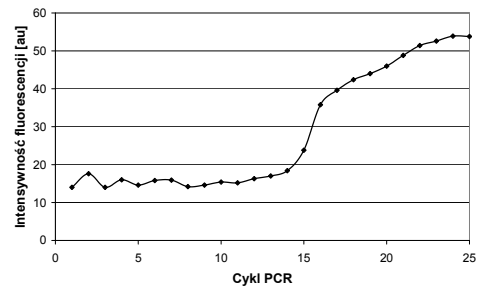
W drugim rozwiązaniu analizatora DNA (rys. 9) zastosowano lab-chipy krzemowo-szklane wielorazowego użytku. Zastosowano zewnętrzny w stosunku do lab-chipa termocykler zbudowany na bazie modułu termoelektrycznego z wbudowanym miniaturowym czujnikiem temperatury. Lab-chip jest pozycjonowany bezpośrednio na odpowiednio wyprofilowanym stoliku termocyklera za-pewniającym powtarzalność pozycjonowania lab-chipa.



Rys. 9. Analizator DNA real-time PCR typu lab-chip z detekcją fluorymetryczną opracowany w ramach prac krajowych oraz lab-chip krzemowo-szklany

Fig. 9. Lab-chip – based real-time PCR DNA analyzer with the novel fluorescence read-out developed under Polish projects and silicon-glass lab-chip

Próbka materiału biologicznego poddanej analizie pochodziła z wycinka tkani pobranej z piersi kobiety rasy kaukaskiej, z rakiem piersi we wstępnym etapie. Uzyskano prawidłową kinetykę amplifikacji materiału genetycznego (cDNA) – krzywą typu S (rys. 10) – potwierdzającą poprawne działanie opracowanego analizatora.



Rys. 10. Zależność intensywności fluorescencji od cyklu PCR – krzywa typu S obrazująca kinetykę amplifikacji DNA

Fig. 10. Fluorescence intensity vs. PCR cycle number – S-curve describing kinetics of DNA amplification

5. Podsumowanie

Opisana metoda detekcji i instrumentarium do niej zostały z sukcesem zastosowane w przenośnych analizatorach DNA wykorzystujących lab-chipy o różnej konstrukcji. Zaproponowane rozwiązanie układu detekcji może zostać wykorzystane również do budowy układów wykorzystujących kilka laserów emitujących światło o różnej długości dla wieloparametrycznych systemów real-time PCR (multiplex real-time PCR). Trwają prace nad wykorzystaniem opisaną tu metody detekcji w wysokoczułym fluorymetrycznym detektorze kokainy lub w badaniach onkogennych wykorzystujące kapilarną elektroforezę żelową w lab-chipie.

Dziękuję J. Dziubanowi za to co nauczyciel może dać najlepszemu uczniowi, J. Koszurowi B. Latekiemu i P. Kowalskiemu z Instytutu Technologii Elektronowej w Warszawie za wieloletnią i owocną współpracę oraz pomoc w realizacji projektu OPTOLABCARD. Członkom konsorcjum OPTOLABCARD, a w szczególności J. M. Ruano-Lopezowi z firmy IKERLAN (Mondragon, Hiszpania) za koordynację projektu i D. D. Bangowi z Danish Technical University (Aarhus, Dania) i jego zespołowi za pomoc biotechnologiczną. Pani Patrycji Szczepańskiej za pomoc w żmudnych pomiarach i pozostałym współpracownikom z Zakładu Mikroinżynierii i Fotowoltaiki Wydziału Elektroniki Mikrosystemów i Fotoniki Politechniki Wrocławskiej za współpracę. Prace finansowane były w ramach projektów OPTOLABCARD, CiS (POIG nr 03.01-02-002/08-00) oraz Grantów Statutowych Politechniki Wrocławskiej.

6. Literatura

- [1] Advan. Physiol. Educ., American Physiological Society, 29, 2005.
- [2] Biomedical Microdevices, Springer, 7:4, 2005.
- [3] Nucleid Acid Research, Oxford Journals, vol. 34, no. 11, 2006.
- [4] Sensors and Actuators B, Elsevier, 107, 2005.
- [5] Biomedical Microdevices, Springer, 9, 2007.
- [6] Sensors and Actuators B, Elsevier, 100, 2004.
- [7] Proc. of μ TAS 2006, Transducers Research Foundation, Tokyo, Japonia.
- [8] Biosensors and Bioelectronics 21, 2006.
- [9] Proc. of MEMS 2006, Transducers Research Foundation, Istanbul, Turcja.
- [10] Lab Chip, RSC Publishing, 5, 2005.
- [11] Proc. of μ TAS 2007, Transducers Research Foundation Paryż, Francja.
- [12] Proc. of μ TAS 2008, Transducers Research Foundation, San Diego, USA.
- [13] Lab Chip, RSC Publishing, vol. 9, iss. 11, 2009.
- [14] Proc. of μ TAS 2009, Transducers Research Foundation, South Korea.