



# Mikrofluidyka – technologia miniaturyzacji laboratorium

Michał Laskowski\*

## 1. Historia mikrofluidyki [1]

Podczas gdy obecnie w naukach przyrodniczych niepodzielnie rządzi przedrostek „nano” wydawałoby się, że hasło „mikro” jest skazane na zapomnienie. Zaprzeczeniem tego jest jednak tytułowa mikrofluidyka lub inaczej technologia mikrocieczowe. Jest to młoda, lecz dynamicznie rozwijająca się interdyscyplinarna dziedzina nauki i technologii zajmująca się badaniem oraz kontrolowaniem płynów o niewielkiej objętości ( $\mu\text{l}$ , nl oraz pl) w sztucznie stworzonych systemach hydraulicznych. Dla nauk chemicznych oraz mikrobiologicznych jest to uzasadnione ekonomiczne, a także wynika z wielkości obiektów będących ich zainteresowaniem - bowiem nawet w mikrolitrowej kropli mieszczą się tysiące dużych cząsteczek np. białek. Mikrofluidyka wpisuje się bardzo dobrze w ogólnoświatowy trend miniaturyzacji urządzeń. Dzięki wykorzystaniu technologii mikrocieczowych można w badaniach znacznie zmniejszyć objętości reagentów oraz skrócić ich czas, co wielokrotnie redukuje ich koszty. Technologię taką można również uznać jako jeden z aspektów zielonej chemii.

Pierwsze urządzenia mikrofluidyczne – miniaturowy chromatograf gazowy powstał

w 1975 r., jednak prawdziwy rozkwit mikrofluidyki datuje na lata 80. XX wieku. Jej szybki rozwój umożliwiło upowszechnienie się zintegrowanych układów elektro-mechanicznych pozwalających na precyzyjną kontrolę płynów o niewielkiej objętości oraz zamówienia wojskowe na przenośne urządzenia do wykrywania broni biologicznej i chemicznej. Mimo tego, że mikrofluidyka jest to bardzo młoda dziedzina nauki i techniki, prawie każdy zetknął się z jej praktycznym wykorzystaniem – głowicami domowych drukarek atramentowych. Obecnie rynek mikrofluidyki wart jest setki milionów dolarów.

## 2. Mikromacierze DNA [2]

Innym wynalazkiem z dziedziny technologii mikrocieczowych będący znacznym sukcesem komercyjnym są mikromacierze DNA. Są to płytki wykonane z tworzyw sztucznych lub szkła z naniesionymi mikroskopowej wielkości polami zawierającymi sondy molekularne będące różniącymi się od siebie fragmentami DNA. Na powierzchni mikromacierzy można obecnie umieścić nawet kilka tysięcy fragmentów DNA. Sondy zwykle zbudowane są z 20-70 nukleotydów (z ang. oligo array) lub pełnych sekwencji mRNA

(z ang. cDNA array) – co oznacza pełną sekwencję danego wariantu genu. W celu użycia chipu DNA należy na jego powierzchnię nanieść próbkę kwasu nukleinowego wyznakowanego znacznikiem fluorescencyjnym. Cząsteczki wyznakowanego kwasu nukleinowego wiążą się do komplementarnych sekwencji w wyniku hybrydyzacji. Zajście takiej reakcji można stwierdzić mierząc intensywność sygnału fluorescencji dla poszczególnych sond. Zwykle użycie chipów DNA jest procedurą w pełni zautomatyzowaną. Mikromacierze DNA wykorzystuje się m.in. do badania sekwencji genów (genotypowania), znajdowania genów reagujących zmianą ekspresji na podanie leku oraz różnic w ekspresji genów pomiędzy tkankami lub gatunkami. Obecnie chipy DNA są komercyjnie dostępne w bardzo dużej liczbie odmian. Umieszczając inne cząsteczki w charakterze sond można również zbudować mikromacierze innego typu: białkowe, przeciwciał lub niewielkich związków chemicznych.

## 3. Lab-on-a-chip [1]

Dla chemików oraz biologów molekularnych najważniejszym trendem w rozwoju mikrofluidyki zaraz obok mikromacierzy są systemy lab-on-a-chip.

Są to urządzenia wielkością zbliżone do rozmiarów karty kredytowej pełniące funkcje „stołu laboratoryjnego” lub bioreaktora. Wykonane ze szkła, poliwęglanu czy PDM-S’u chipy zawierają kanały oraz komory reakcyjne, co umożliwia wykonywanie reakcji chemicznych analogicznie jak przy wykorzystaniu probówek jednak przy użyciu tysiące razy mniejszej objętości odczynników.

Mimo wielu zalet urządzenia typu lab-on-a-chip nie znajdują się w każdym laboratorium. Taki stan wynika z dwóch powodów. Po pierwsze wciąż nie jest dostatecznie poznana fizyka takich układów. Mogłoby się wydawać, że inżynieria chemiczna, której jednym z podstawowych działów jest hydrodynamika powinna udostępnić modele fizyczne wyjaśniające zachowanie mikropłynów. Niestety zachowanie płynów w mikroskali wyraźnie różni się od tych opisywanych modelami dla makroukładów. Przykładowo, czynnikami pomijanymi w przepływie makropłynów oddziałującymi poważnie na układ o skali mikro są siły napięcia powierzchniowego lub naładowanie elektrostatyczne powierzchni cieczy. Konieczność uwzględnienia takich właściwości obiektów powoduje znaczne skomplikowanie



opisów teoretycznych układów mikrofluidycznych, co tym samym utrudnia rozwój technologii. Drugim niezbędnym warunkiem upowszechnienia mikrofluidyki jest rozwiązanie problemów stricte technologicznych, czyli stworzenia standardu miniaturowych pomp, zaworów oraz czujników. Obecnie większość układów mikrofluidycznych jest skonstruowana w formie żartobliwie opisanej jako „lab-on-a-chip-in-lab” oznacza to wykorzystanie niewielkiego chipu mikrofluidycznego oraz urządzeń peryferyjnych zajmujących cały stół laboratoryjny. Jest to sytuacja zadowalająca naukowców pracujących przy badaniach podstawowych, bowiem chipy są relatywnie tanie (koszt jednego chipu to zwykle mniej niż 50\$) i mogą być łatwo wymieniane, a urządzenia peryferyjne są uniwersalne. Niemniej docelową funkcjonalnością ma być reprezentowana przez urządzenia takie jak QuickLab firmy Siemens – mieszające się na dłoni urządzenie diagnostyczne.

#### 4. Systemy kroplet-on-demand [3]

Mikrofluidyka oparta jest na wykorzystaniu dwóch nie mieszających się faz – (np. układu woda-olej), kropeł (fazy rozproszonej) zawieszonych w fazie ciągłej – stanowi kolejny krok ku zmniejszeniu ilości reagentów i polepszeniu kontroli nad wykonywanymi reakcjami. W takim przypadku każda z kropeł stanowi oddzielne środowisko reakcji. Jest to idealne rozwiązanie w przypadku badań przesiewowych (o czym

więcej w następnej części) oraz obserwacji funkcjonowania pojedynczych komórek. Tworzenie kropeł odbywa się przy wykorzystaniu elementów układu nazwanych T-Junction lub flow focuser. O ile tworzenie kropeł o jednolitej wielkości nie jest zadaniem zbyt skomplikowanym technologicznie (dla niezbyt dużych kropeł wystarczy dobrać prędkości przepływu płynu nośnego i fazy zdyspergowanej), to tworzenie kropeł o zmieniającej się wielkości w serii zaczyna komplikować sprawę. Jednak jest to możliwość bardzo cenna – pozwala bowiem na kontrolowanie stężenia poszczególnych substancji przy łączeniu kilku kropeł w jedną większą (poprzez wkład objętościowy kolejnych elementów). Układy mikrofluidyczne posiadające taką możliwość nazywane są systemami kropeł na żądanie (z ang. droplet on demand system). Jedną z najbardziej rozwiniętych technologii uzyskiwania „kropeł na żądanie” opracowała polska grupa badawcza z Instytutu Chemii Fizycznej PAN. Sercem systemu jest zmodyfikowany zawór solenoidowy z tłokiem nurnikowym (V165, Sirai). Modyfikacje polegały na znacznym zmniejszeniu skoku tłoka w celu dotowania do potrzeb mikrofluidyki. Zawór może pracować z maksymalną częstotliwością około 30 kHz, a minimalna objętość tworzonej kropli wynosi 70 nL. Proces otwierania i zamykania sterowany jest za pomocą komputera wyposażonego w oprogramowanie typu LabView, co pozwala na łatwą kalibrację oraz programowa-

nie serii procesów. Ponadto, charakterystyka pracy układu zaworów jest niezależna od materiału, w którym wykonany jest mikroukład, co czyni system uniwersalnym.

#### 5. Wysoko sprawny screening [4]

Jedną z najpoważniejszych motywacji do rozwoju technologii mikrocieczowych jest zapotrzebowanie na urządzenia zdolne wykonywać tysiące reakcji w krótkim czasie. Sekwencjonowanie DNA, czy badania przesiewowe nowych leków są najlepszymi przykładami konieczności użycia systemów High-throughput screening. Obecnie używa się w tym celu wielodołkowych płytek będących naczyniami dla reagentów oraz robotów wyposażonych w ramię z automatycznymi pipetami. Roboty tego typu są zdolne do mieszania reagentów oraz dokonywania pomiarów spektroskopowych a nawet interpretacji wyników, co pozwala na wykonanie nawet do kilku tysięcy reakcji dziennie dla jednej jednostki. Jednakże obecnie stosowane metody są drogie (urządzenia HTS kosztują setki tysięcy dolarów) oraz posiadają ograniczenia – dozowane do dołków mogą być ciecze o objętości większej niż 1  $\mu$ l. Ograniczeń tych nie posiadają opisane powyżej systemy mikrocieczowe oparte na tworzeniu kropli. Porównania takich systemów oraz tych standardowych dokonał D. Witz wraz z współpracownikami. Badania opisane w Proceedings of the National Academy of Science dotyczyły uzyskania i identyfikacji bar-

dziej efektywnych odmian peroksydazy chrzanowej – enzymu chrzanu pospolitego, znajdującego szerokie zastosowanie w biologii molekularnej.

#### Procedura uzyskania peroksydazy chrzanowej

1. Umieszczenie genu kodującego peroksydazę na plazmidzie.
2. Amplifikowanie plazmidu przy pomocy reakcji polimerizacji łańcuchowej z wykorzystaniem polimerazy DNA o dużym współczynniku błędów (tzw. error prone PCR). Spowodowało to wytworzenie dużej ilości odmian enzymu – około  $10^7$ .
3. Po przykróceniu do właściwej formy plazmidy zostały wprowadzone do komórek drożdży.
4. Pożywka z komórkami została w urządzeniu mikrofluidycznym rozbita na krople zawieszona w fazie olejowej, w których zawarta jest (statystycznie) jedna komórka. W skład kropli wchodzi również substrat dla enzymu – produktem reakcji jest fluorescencyjny związek.
5. Po inkubacji w długim przewodzie następuje selekcja kropeł o wysokiej fluorescencji. Następuje to w drugim chipie mikrofluidycznym. Kanał, przez który przepływają krople oświetlany jest promieniem lasera – w przypadku kropeł, w których znajduje się aktywny enzym następuje fluorescencja. Poziom fluorescencji jest mierzony przy pomocy spektrofotometru; w przypadku osiągnięcia wartości granicznej powoduje uruchomienie dielektroforezy



kierującej krople do innego kanału niż krople fluoryzujące poniżej wartości granicznej.

6. Następnie krople o wysokim poziomie fluorescencji są rozbijane i umieszczane w naczyniu z pożywką. Uzyskane w ten sposób drożdże z efektywnymi odmianami enzymu są przenoszone do dalszych badań identyfikacyjnych.

7. Po uzyskaniu najbardziej efektywnych sekwencji genu kodującego peroksydazę całą operację można powtórzyć wykorzystując ten już zmutowany gen.

W wyniku dwukrotnego przeprowadzenia powyższej procedury uzyskano około 10 krotnie aktywniejszy enzym. W całym artykule najbardziej zaskakujące jest jednak zestawienie czasu i kosztu całej operacji. W przypadku zastosowanych urządzeń mikrocieczowych wynosił on 7 h oraz 2,5 \$, w przypadku typowej technologii HTS trwałoby to około 2 lat i kosztowało 15 mln \$. Jest to oczywiście jedynie przykład jednak świetnie ilustrujący przydatność i możliwości mikrofluidyki.

**Podziękowania:** Dr. hab. Piotrowi Garsteckiemu prof. IChF za umożliwienie odbycia praktyk oraz stażu magisterskiego w grupie badawczej mikroprzepływów i cieczy złożonych, mgr. inż. Krzysztofowi Churskiemu za opiekę w trakcie praktyki. Za finansowanie dalszego stażu w IChF dla Programu TEAM Fundacji na rzecz Nauki Polskiej współfinansowanego ze środków Funduszu Rozwoju Regionalnego Unii Europejskiej.

#### Literatura:

- [1] Tabeling P. Introduction to Microfluidics Oxford University Press 2005
- [2] Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO (1995). „Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray”. Science 270 (5235): 467–470.
- [3] High-throughput automated droplet microfluidic system for screening of reaction conditions Krzysztof Churski, Piotr Korczyk and Piotr Garstecki Lab Chip, 2010, 10, 816–818 ]
- [4] Agresti JJ, Antipov E, Griffiths AD, Weitz DA Ultrahigh-throughput screening in

drop-based microfluidics for directed evolution. Proc Natl Acad Sci 2 107 (9):4004-9

\*Michał Laskowski - student V roku biotechnologii na Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej, dyplomant katedry Inżynierii Chemicznej i Bioprosesowej

## Uni-Export Instruments Polska

**MIKROSKOPIA ELEKTRONOWA**  
Skaningowe mikroskopy elektronowe: klasyczne i wysokorozdzielcze  
Systemy Focused Ion Beam  
Akcesoria i oprogramowanie  
Układy cyfrowej archiwizacji zdjęć do analogowych mikroskopów SEM

**MATERIALOGRAFIA**  
Przecinarki, praski, szlifierko-polerki  
Twardościomierze systemy automatycznego pomiaru twardości  
Spektrometry emisyjne typu GDS  
Analityzatory elementarne: C, S, N, H, O  
Analiza obrazu

**ANALIZA WŁASNOŚCI FIZYKOCHEMICZNYCH**  
Pomiar porowatości i powierzchni właściwej  
Gęstość rzeczywista i nasypowa  
Analiza parametrów sypczych pianek  
Analiza sorpcji gazów i cieczy  
Kalorymetry  
Analityzatory: TGA, C, S, N, H, Hg  
Stabilność emulsji i zawiesin

**TECHNIKA PRÓŻNIOWA**  
Pompy i systemy pompowe dla nauki i przemysłu  
Pompy turbomolekularne  
Pompy dyfuzyjne  
Pompy jonowe  
Pompy rotacyjne i scroll  
Pomiar próżni: głowice i próżniomierze  
Detektory nieszczelności  
Naprawa i regeneracja pomp

Czerniakowska 155/109, 00-453 Warszawa,  
tel.: 22 626 87 86, faks: 22 626 87 85,  
e-mail: office@uni-export.com.pl  
SKYPE: biuroUEI

[www.uni-export.com.pl](http://www.uni-export.com.pl)