

Optofluidní mikročip s teplotním gradientem pro určování teplotní stability biomolekul v segmentovaném toku

FOHLEROVÁ, Zdenka.; PODEŠVA, Pavel.; NEUŽIL, Pavel

Anotace

Na Ústavu mikroelektroniky (UMEL), Vysokého učení technického v Brně, v rámci projektu financovaného Grantovou agenturou České republiky a řešeného pod Ústavem mikroelektroniky byl vytvořen funkční vzorek optofluidního mikročipu s teplotním gradientem pro stanovení teploty tání biomolekul. Kombinace optiky a mikrofluidiky je v poslední době velmi aktuálním tématem jak základního, tak aplikovaného výzkumu. Námi popisovaný funkční vzorek je z hlediska tuzemské i světové vědecké konkurence unikátní a vyžaduje znalosti optiky, fyziky a chemie materiálů a biochemie. Doposud nebyl vytvořen žádný čip se stabilním teplotním gradientem pro měření teploty tání biomolekul v reálném čase. Výjimečnost tohoto funkčního vzorku také spočívá v návrhu přístupu měření citlivé fluorescenční odezvy a aplikování segmentovaného toku, tj. měření v mikrolitrové kapce vzorku.

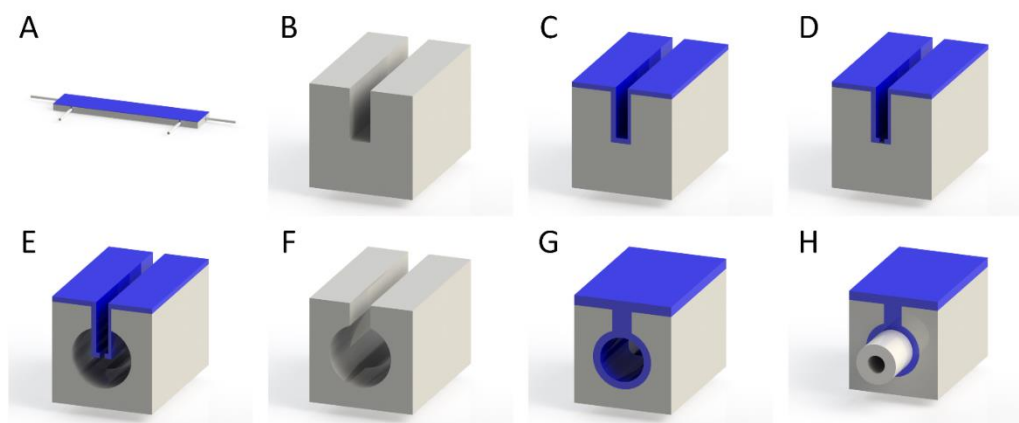
Přínos k poznání

Přínos optofluidního mikročipu spočívá v nově vyvinutém a technologicky pokročilém přístupu vedoucím ke zrychlení a zefektivnění bioanalytických přístrojů pro stanovení teploty tání biomolekul (nukleové kyseliny, bílkoviny). Námi vyvinutý systém efektivně kombinuje metody ohřevu a teplotní vodivosti materiálů tvořící výsledné zařízení, které jsou nezbytné pro vyvíjení teplotně stabilních systémů s homogenním rozložením teploty nebo teplotním gradientem, a to v mikrometrovém měřítku. Dále originalita našeho systému spočívá v samotném navržení způsobu měření a detekce teploty tání, a to především díky vytváření diskrétních objemů nemísitelných fází podél teplotního gradientu a s tím spojeným způsobem detekce fluorescence ve stejném směru, jako je přiváděné excitační světlo. Teoretické principy byly ověřeny praktickou realizací a aplikací unikátního systému v podobě mikročipu a poskytuje významný základ pro efektivní určení teploty tání biomolekul, s praktickým dopadem v bioinženýrství pro charakterizaci např. uměle vytvářených bílkovin v proteomice, screeningu léčiv nebo při charakterizaci nukleových kyselin. Představený funkční vzorek je prozatím v zájmu vědecké komunity a to na celosvětové úrovni, nicméně do budoucna by mohl být zcela jistě zajímavým konkurenčním produktem pro drahé a objemné přístroje. Výsledky získané z realizace optofluidního systému byly prezentovány v prestižním sub-Nature časopise Scientific Reports [1]. Vytvořený mikročip také slouží k demonstraci aplikace mikrofluidních systémů pro výukové předměty. Na výsledném produktu se také podílely zahraniční instituce, jmenovitě Hong Kong, University of Science and Technology China (5% podíl), a Ministry of Education Key Laboratory of Micro and Nano Systems for Aerospace, NPU Xi'an, China (5% podíl). Jejich přínos spočíval především v simulačních procesech přenosu a šíření tepla v mikročipu, což byl velmi zásadní krok pro vytvoření teplotně stabilních systémů.

Popis výsledku

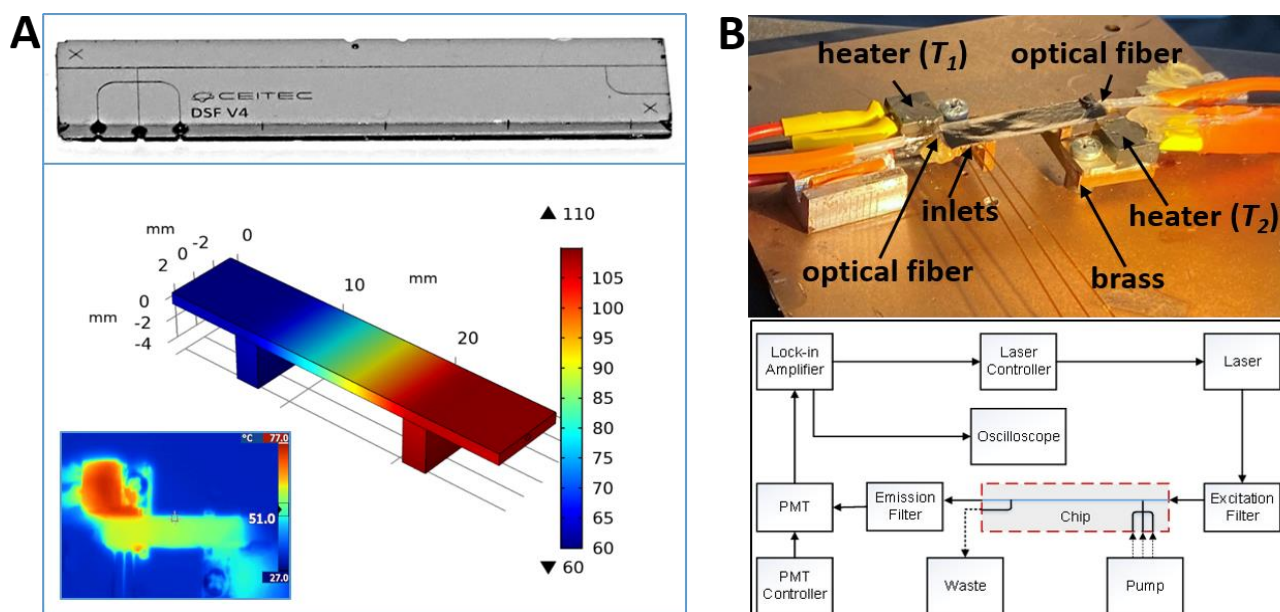
Teplota tání biomolekul je běžně měřena pomocí polymerázové řetězové reakce v reálném čase (qPCR) u nukleových kyselin a následné analýze křivky tání (MCA) a dále pomocí diferenciální skenovací fluorimetrie (DSF) u bílkovin. V obou případech se jedná o objemná, časově náročná a drahá zařízení. Z technologického hlediska bylo tedy vyzvou vyvinout principiálně podobné zařízení na čipu, které by bylo miniaturizované, citlivější a efektivnější jak po stránce časové, tak i finanční. K dosažení výsledného produktu předcházely dlouhodobé systematické přístupy vycházející od prvotního návrhu mikrofluidního čipu s teplotním gradientem, jeho fabrikaci s využitím mikro- a nanotechnologií, integraci optického detekčního systému a demonstrování účinnosti takto vyrobeného zařízení na vzorku nukleové kyseliny se známou teplotou tání.

Námi vyvinutý optofluidní mikročip je výsledkem jedinečného komplexního řešení spočívajícího v kombinaci optiky, MEMS technologie, mikrofluidiky, materiálových věd a biomolekulární chemie. Samotný produkt je tvořen křemíkovým čipem s trubkovitými mikrokanály utopenými uvnitř substrátu. Jeho celková velikost je 6×27 mm. Čip tvoří jeden průchozí kanál o průměru $500 \mu\text{m}$ a tři vstupní kanály spojené přes příčný spoj a jeden výstupní kanál (Obrázek 1A). Pro zhotovení čipu je použita pokročilá metoda pro výrobu mikrofluidních struktur zahrnujících utopené kanály a vstupy / výstupy v křemíkové destičce pomocí jednoúrovňové litografie [2]. Fabrikace čipu spočívá ve vytvoření jamky do silikonového substrátu (Obr. 1B), která je následně zakryta vrstvou Parylenu C (Obr. 1C). Dno jamky je selektivně otevřeno pomocí femtosekundové laserové ablace (Obr. 1D). Kanály, vstupy / výstupy jsou vytvořeny izotropním leptáním křemíku parami xenon difluoridu (Obr. 1E, F). Následně jsme kanály utěsnili druhou vrstvou Parylenu C (Obr. 1G, H). Na rozdíl od dříve publikovaných prací [3] se celý tento proces provádí při okolní teplotě.



Obrázek 1 Optofluidní mikročip s napojenými optickými vlákny (A) a postup výroby mikročipu (B-H). Popis viz text.

Podél tohoto mikrokanálu je vytvořen teplotní gradient (∇T) (Obrázek 2A). Čip je umístěn na dva mosazné bloky se vzdáleností ≈ 13 mm. Každý blok má svůj vlastní ohřivač a senzor připojený k proporcionálnímu derivačnímu regulátoru teploty. Na základě vzdálenosti mosazných bloků a rozsahu teplot nastavených na obou koncích čipu dle známé teploty tání DNA jako standardu, je dosažen teplotní gradient $\nabla T \approx 2,31$ °C · mm⁻¹. Do průchozího mikrokanálu čipu jsme integrovali optické vlákna. Na jedné straně je vlákno připojeno k laseru s excitační vlnovou délkou 471 nm a nominálním výkonem 10 mW. Na opačné straně, světlo opouštějící čip vstupovalo do druhého optického vlákna připojeného přes pásmový filtr se střední vlnovou délkou a šířkou pásma ≈ 525 nm a ≈ 50 nm, aby blokovalo druhé harmonické laserové světlo s vlnovou délkou ≈ 471 nm a harmonickou ≈ 942 nm. Celkové schéma zapojení se zesilovači je na Obr. 2B a obecně je takovéto zapojení z pohledu měření fluorescence zcela jedinečné, jelikož se běžně emitované světlo měří kolmo ke světlu excitačnímu. Nicméně pro měření teploty tání v našem uskupení, kdy se generuje v čipu pouze jedna kapka vzorku do mobilní fáze, představuje napojený optický systém inovativní řešení. Funkčnost systému je ukázána na stanovení teploty tání krátkého komplexu dsDNA - SYBR Green I. Ve srovnání s komerční qPCR technikou, náš prozatímní systém umožňuje významně urychlit analýzu díky rychlému generování kapiček vzorku do mobilní fáze protékající čipem. Tradiční qPCR systémy, dle nastavení teplotní rampy, pracují rychlostí mezi 100-500 sec/vzorek [4]. Námi vyvinutý čip umožňuje analýzu pod 30 sekund. Dále, na základě pracovních podmínek pracuje qPCR s objemem vzorku mezi 20 μ l a 100 nl [5], přičemž náš systém nyní umožňuje detekci v objemu kolem 2 pl. Přesnost mezi námi naměřenou průměrnou teplotou tání ve srovnání se standardním vzorkem DNA měřeným qPCR (reference) byla 0,7 °C.



Obrázek 2 Reálný obrázek optofluidního čipu se simulovaným a reálným teplotním gradientem (A). Celkové uspořádání optofluidního systému (B).

Reference

- [1] Fohlerova, Z., Zhu, H., Hubalek, J. et al. Rapid Characterization of Biomolecules' Thermal Stability in a Segmented Flow-Through Optofluidic Microsystem. *Sci Rep* 10, 6925, 2020.
- [2] Gablech, I. et al. Fabrication of buried microfluidic channels with observation windows using femtosecond laser photoablation and parylene-C coating. *Microfluid Nanofluid* 22, 105, 2018.
- [3] Boer MJd et al (2000) Micromachining of buried micro channels in silicon. *J Microelectromech Syst* 9:94–103
- [4] Bartsch, M. S. *et al.* The rotary zone thermal cycler: a low-power system enabling automated rapid PCR. *PloS one* **10**, e0118182–e0118182, 2015.
- [5] <https://www.takarabio.com/learning-centers/real-time-pcr/reaction-size-guidelines-for-qpcr>