

4.3. Mikrofluidikai csipek analitikai alkalmazásai

4.3.1. DNS meghatározása

A kettős szálú DNS példáján kiválóan demonstrálhatók a mikrofluidikai eszközökön (csip, lab-on-a-chip) elérhető gyors és nagyfelbontású elválasztások. A DNS meghatározás volt célja az 1999-ben a kereskedelemben először megjelent csipnek is. Mára számos csip-alapú eszközt kifejlesztettek, amikkel például PCR termékek analízisét vagy DNS ujjlenyomat vizsgálatot lehet végezni.

A DNS fragmentumok elektroforetikus elválasztása az elmúlt 60 év egyik legfontosabb prioritása volt az analitikai kémiában, hiszen a DNS az a biomolekula, mely az élő szervezet valamennyi genetikai információját magában hordozza. Egy adott DNS szakasz (azonos hosszúságú és szekvenciájú) nagy mennyiségben előállítható a PCR (polimeráz-láncreakció) technika alkalmazásának köszönhetően, ezért ideális tesztkomponens gélelektroforézishez, ahol méret alapján történik az elválasztás.

A fiziológiás pH-n a DNS negatív töltésű. Szabad oldatokban (nem gélben) végrehajtott elektroforézisnél a 200 bázispárnál hosszabb kettős szálú DNS molekuláknak hasonló az elektroforetikus mozgékonyaságuk, így elválasztásuk nem lehetséges. Polimermátrixban (pl. kémiaailag térhálósított gélekben vagy polimer oldatokban) azonban a különböző hosszúságú DNS molekulák kölcsönhatásba lépve mátrixszal az elektromos erőterben eltérő sebességgel fognak haladni, a kisebb DNS fragmentek gyorsabban vándorolnak, mint a nagyobbak, azaz méret szerint szeparálódnak.

A hatvanas évektől a (lap)gél elektroforézis volt a DNS meghatározások standard eszköze. A nyolcvanas években a kapilláris elektroforézis (CE) megjelenése tovább erősítette az elektroforetikus módszerek fontosságát a klinikai, biológiai és biotechnológiai kutatásokban, különösen a kilencvenes évektől kezdve, amikor megjelentek a nagysebességű, multi-kapillárisos gélelektroforetikus rendszerek. Ezeknek az automatizált, multi-kapillárisos rendszereknek az alkalmazása a Humán Genom Projekt befejezését több évvel előbbre hozták a tervezethez képest. A CE kvarc kapillárisok tipikusan 50-100 μm belső átmérőjűek és 10-50 cm hosszúak. A DNS elválasztásoknál a kapillárisokba injektált minta hossza 1-2 mm, az elemzés időtartama pedig néhányszor tíz perc volt.

Csipek alkalmazása a DNS meghatározásában tovább gyorsította a molekuláris biológiai kutatásokat. Ezekben az eszközökben a gélelektroforézist még rövidebb idő alatt, általában egy nagyságrenddel gyorsabban el lehet végezni mint kapillárisokban (emellett a tányérszám és felbontás értékek sem rosszabbak). A gyorsabb elválasztásokat elsősorban az teszi lehetővé, hogy a mikrofluidikai csipekbe sokkal keskenyebb, csupán 10-100 μm hosszúságú mintazónákat tudunk beinjektálni. Az elektroforetikus elválasztásoknál az elméleti tányérszám (N) az elválasztási úthossz (L) négyzetével növekszik:

$$N = \frac{12(L/w)^2}{1+L/L_0}; \quad L_0 = \frac{\mu E w^2}{24D} \quad (33)$$

ahol μ a komponens elektroforetikus mozgékonyága, E az elektromos térerő, D a komponens diffúziós állandója és w a mintazóna és a detektálási hely szélességei átlagának négyzetgyöke. A mikrofluidikai kísérletekben a detektor 10-50 μm -nyi szakaszra fókuszál, hogy a mintaszéleségek tartományában legyünk. A megfelelő felbontás ($L=L_0$) eléréséhez szükséges idő arányos w -vel:

$$t_0 = \frac{w^2}{24D} \quad (34)$$

A gyorsabb elválasztáshoz az is szükséges, hogy az L elválasztási hosszúság a kapillárisokban tipikus néhányszor tíz centiméterről néhány centiméterre csökkenjen.

Jelenleg két, DNS meghatározására szolgáló mikrofluidikai csip érhető el a kereskedelemben: az Agilent gyártmányú 2100 Bioanalyzer (41. ábra) és a Caliper Life Sciences által kifejlesztett, nagy elemzési sebességű LabChip 90 (42. ábra).



41. ábra Az Agilent Bioanalyzer 2100 készülék [18]

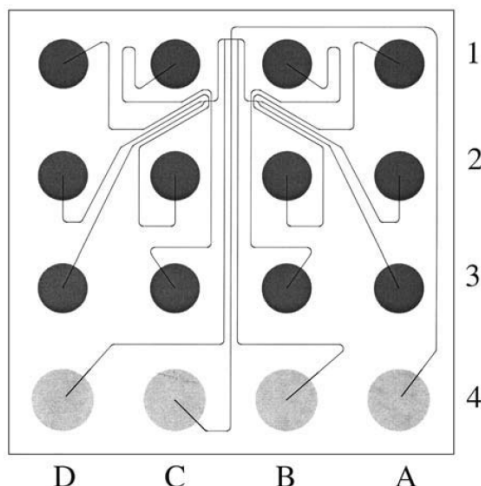


42. ábra A Caliper LabChip 90 készülék [19]

A 2100 Bioanalyzer-nél használt mikrocsip egy olyan sík mikrofluidikai eszköz, mely egy fotolitográfiával és nedves maratási technikákkal kialakított mikrocsatorna rendszert tartalmazó üveglapkát tartalmaz. A lapkán levő csatornákat termikusan kötik egy másik üveglapkához, az ezen található lyukak lehetővé teszik, hogy a csatorna végekhez e lyukakon (portokon) keresztül folyadékokat lehessen bevezetni. A 43. ábrán egy ilyen csipek fényképe látható. A csatornák 10-25 μm mélyek és 20-100 μm szélesek.



43. ábra Az elválasztásokhoz használatos planáris LabChip eszközök [18]



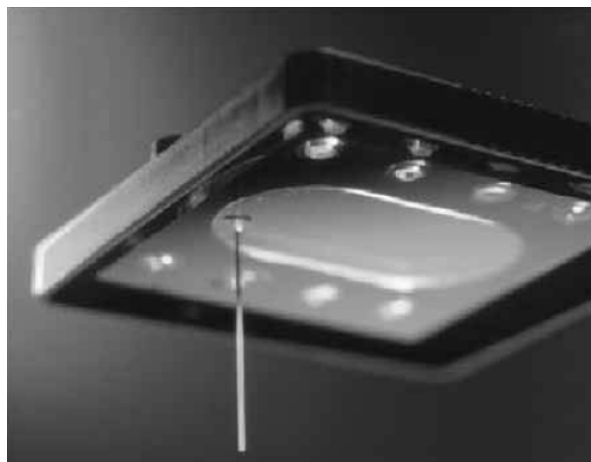
44. ábra A mikrocsonna mintázata a planáris LabChip-nél [18]

A csip működését a 4. ábra áttekintésekor könnyen megérthetjük. Az egyetlen szeparációs mikrocsonnát tartalmazó csipbe legfeljebb 12 mintát elemezhetünk. Miután a mikrocsonnát egy polimer szűrőmátrixszal feltöltöttük („chip priming”), a mintákat manuálisan pipettázzuk a csip edénykéibe. A mátrix egy nagy molekulatömegű polimer, a poli(dimetilmetakrilát) (PDMA) oldata, mely TAPS puffert és egy fluoreszcens DNS festéket tartalmaz. A fluoreszcens festék fényérzékeny, ezért annak törzsoldatát sötét helyen kell tárolni. Az alkalmazandó polimer koncentráció és molekulatömeg-eloszlás a molekulaszűrő mátrixban az elválasztandó DNS fragmensektől és a kívánt felbontástól függ. A csipen való munkához szükség van még mintapufferre és DNS létra standardra (DNS létra: ismert méretű és koncentrációjú DNS fragmentek standardja, amit a különböző méretű fragmensek azonosításához és mennyiségi meghatározásához használunk).

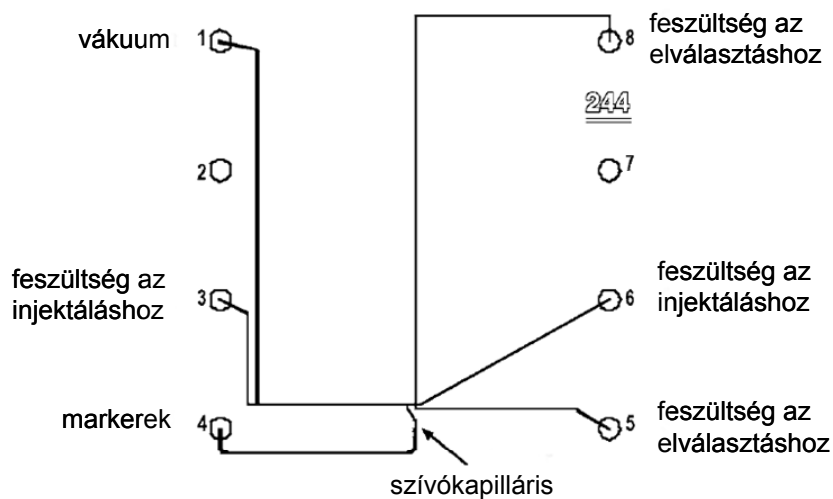
A laboratóriumokban nagy számú DNS minta feldolgozásakor mikrotiter tálcákat használnak, hogy a sok minta feldolgozását párhuzamosan tudják végezni. A standard tálcák 96 (8 x 12) vagy 384 (16 x 24) tárolóhelyet tartalmaznak. A LabChip 90 készüléket úgy tervezték, hogy mind a 96, mind a 384 tárolóhelyes tálcákkal közvetlenül összekapcsolhatóak legyenek. Az automatizált mintavételezés miatt ennek a készüléknek a mintaelemzési sebessége nagy. A kvarc anyagú csip csatorna rendszeréhez egy kvarc kapilláris szívószál (sipper) kapcsolódik (45. ábra). A csatornarendszert - hasonlóképpen, mint a Bioanalyzernél - fotolitográfiával és nedves maratási eljárásokkal alakítják ki. A csatornarendszer sémája a 46. ábrán látható. A csatornák 5-25 μm mélyek, 20-500 μm szélesek, a szívókapilláris belső átmérője 20-50 μm .

Miután a polimermátrixszal kitöltik a csip csatornarendszerét, a szívókapilláris egymásután valamennyi mikrotiter mintatartóba belemerül, és kb. 100 nL DNS

mintát visz a csipre. A minta felszívásához a kifolyónyílásra (waste) kis vákuumot kapcsolnak, majd az injektálást és az elválasztást elektrokinetikus (feszültség alkalmazásával) érik el. Egyetlen csip akár 1-2 ezer minta analíziséhez is használható. A tálca mind a 384 mintájának elemzését követően, a csipet friss gélfesték mátrixszal kell feltölteni a további vizsgálatokhoz.

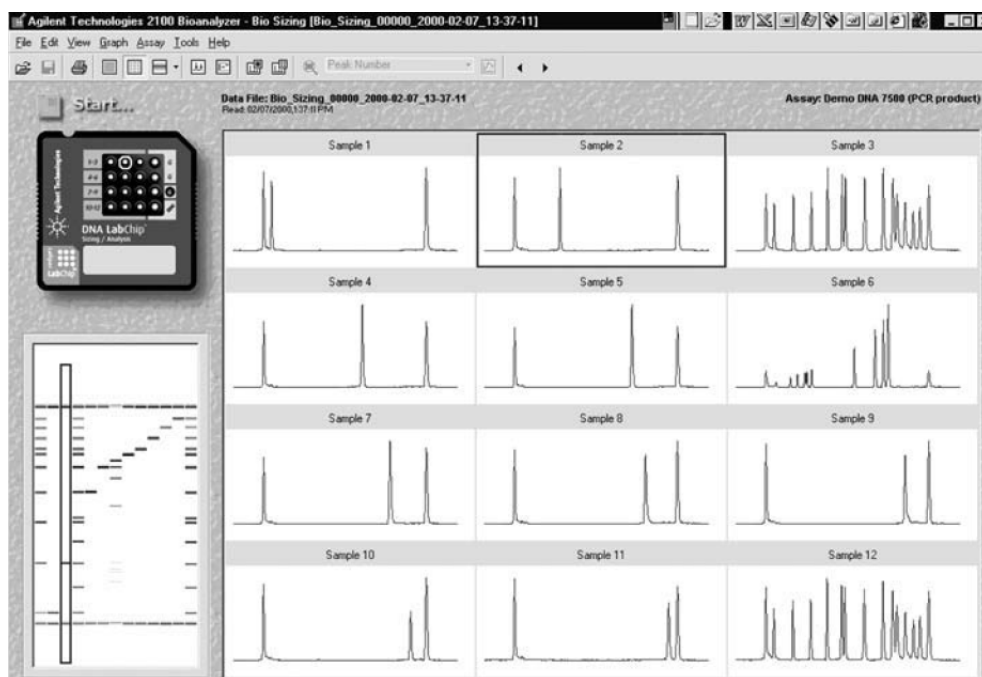


45. ábra A Caliper LabChip90 készülékhez használatos a szívókapilláris csip [19]



46. ábra A mikroszaturna mintázata a szívókapilláris DNS-csipnél [19]

A teljes mérési időtartam körülbelül félóra. A kiértékelő szoftver a standard és a minták elválasztásait virtuális gélmintázatként is megjeleníti (47. ábra bal széle). Az egyes DNS fragmentek méretét a szoftver a DNS létra standard felső és alsó markerének figyelembevételével számítja ki.



47. ábra A mérési adatok (12 minta elemzése egy csipen) megjelenítése a Bioanalyzer 2100 készüléknél [18]