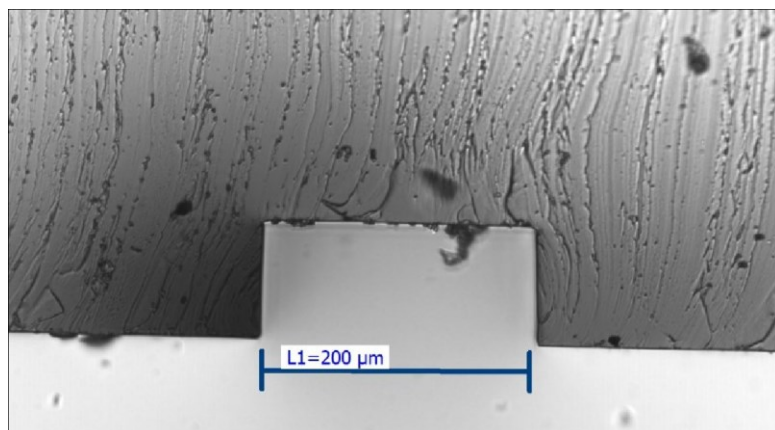


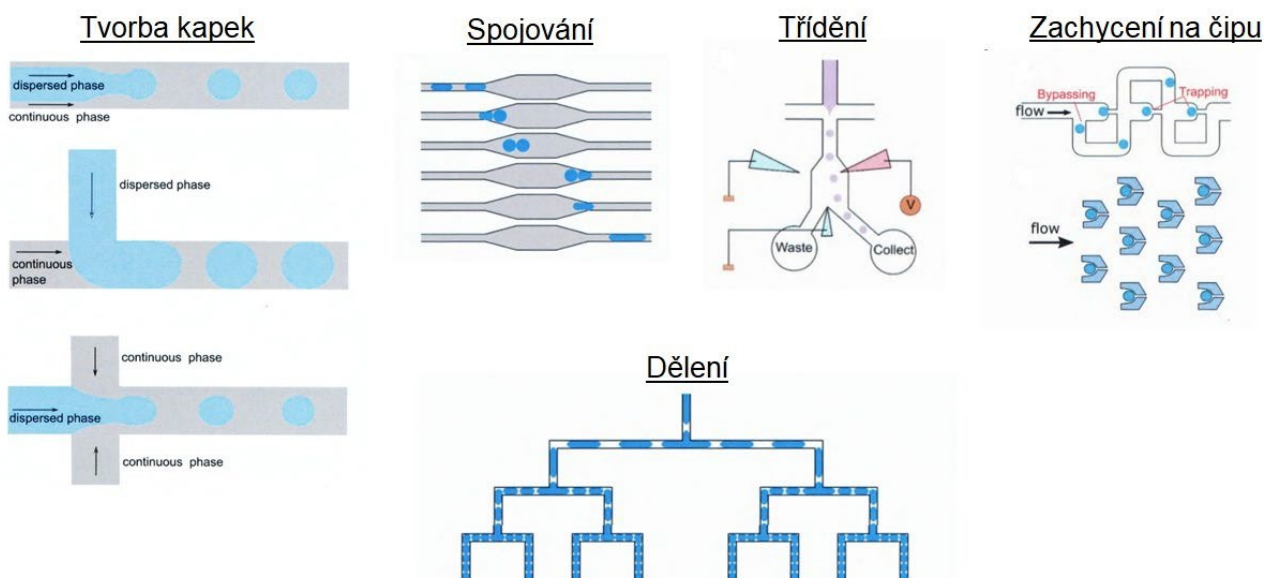


Obr.2.: Fotografie řezu kanálkem PDMS čipu, použitého ve cvičení. Odlitek křemíkového waferu s vytvořenou strukturou na povrchu. Výsledné kanálky mají rozměry 200 μm x 100 μm .

Kapková mikrofluidika:

Jednou z často používaných variant mikrofluidiky je kapková mikrofluidika, využívající tvorby kapek reakční směsi v nemísitelné kontinuální fázi. S takovými kapkami (často stabilizované přídavkem surfaktantu) lze na čipu manipulovat a považovat je za jednotlivé mikroreaktory. Na obrázku č.3 jsou zobrazeny příklady operací s kapkami na čipu: pasivní tvorba kapek s využitím chování dvou nemísitelných kapalin, spojování kapek například obsahujících různé reagenty, třídění elektrickým polem (průtoková cytometrie), zachycení nebo dělení kapek.

Při použití správného designu čipu a experimentálních podmínek je možné provádět miniaturizované různé laboratorní postupy, například PCR na čipu, kapilární elektroforéza v čipovém formátu, s využitím minimálních objemů zkoumat kinetické parametry enzymů a jejich inhibici různými látkami.



Obr.3.: Některé operace s kapkami reakční směsi v oleji na čipu.

Práce s kapkovou mikrofluidikou a on-line ředění reagentů

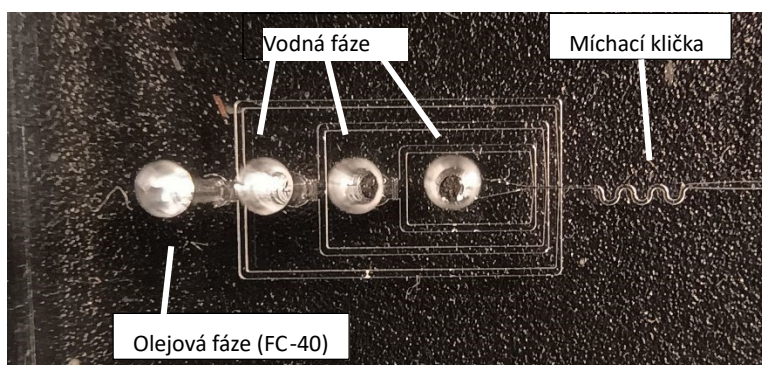
Materiál a vybavení:

- Inkubační pufr: 100 mM fosfátový pufr pH 7,4
- Zásobní 600 nM roztok fluoresceinu v inkubačním pufru
- Fluorinert FC-40 s 2% surfaktantu Fluosurf jako olejová fáze
- Instrumentace kapičkové mikrofluidiky (mikroskop Olympus, zdroj excitačního záření Cooled pE-300, PMT detektor Hamamatsu, stříkačkové pumpy Nemesys, stříkačky Hamilton, trubičky a spojky)
- Mikrofluidní čip (PDMS odlitek navázaný na skleněné sklíčko)
- Nastavení detekčního systému: excitační vlnová délka: 450 nm; emisní filtr: 510 – 560 nm; nastavená intenzita exc. záření na ovladači:; gain; zvětšení okuláru:; interval záznamu: 0,004 s

Pracovní postup:

A: Sestavení aparatury, on-line míchání, kalibrační závislost

1. Do jednotlivých stříkaček naplníme přefiltrovaný FC-40 (obsahující 2% surfaktantu), 2x pufr a 600 nM roztok fluoresceinu. Dbáme, aby v nich nezůstávaly bublinky vzduchu, které mohou ovlivnit přesnost dávkování.
2. Připojíme trubičky pomocí spojek ke stříkačkám, manuálně vytlačíme kapaliny tak, aby v trubičkách nezbyval vzduch a druhý konec trubiček zapojíme do čipu do odpovídajících vstupů.
3. Nastavíme software ovládající stříkačkové pumpy na dané objemy stříkaček a stříkačky upevníme do pump.
4. Čip umístíme do detekční oblasti mikroskopu a pomocí okulárů nebo kamery mikroskopu vycentrujeme detekční kanálek do středu zorného pole.
5. Spustíme průtok olejové fáze 3 $\mu\text{l}/\text{min}$ a každé vodné fáze 1,3 $\mu\text{l}/\text{min}$, dokud se nazačnou stabilně tvořit kapičky.



Obr.3.: Detail vstupní části čipu se vstupy pro vodné fáze (např. reakční směs) a olejovou fází. Jednotlivé složky reakční směsi se spojují v nehomogenní směs, která je následně odpojována na jednotlivé kapky olejovou fází (v posledním křížovém spojení) a kapky jsou promíchány po průchodu míchací kličkou.

	Průtok ($\mu\text{l}/\text{min}$)									
FC-40 (2% surfaktantu)	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Pufr 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Pufr 2	0,2	0,5	0,8	1	1,2	1,5	2	2,5	2,8	2,9
500 nM Fluorescein	2,8	2,5	2,2	2	1,8	1,5	1	0,5	0,2	0,1
Výsledná C fluoresceinu (nM)	420	375	330	300	270	225	150	75	30	15

6. Postupně budeme měnit průtoky pufru a roztoku fluoresceinu podle tabulky.
7. Po ustálení toku (cca 1 minuta) spustíme záznam signálu po dobu 20 s
8. Odečteme intenzitu fluorescence ve vrcholu píku (záznam středu kapky).

9. Sestavte kalibrační závislost intenzity fluorescence na koncentraci fluoresceinu.
10. Stanovte limit detekce podle rovnice (1), kde S_y je směrodatná odchylka y a S je směrnice kalibrační přímky. (Například použijte funkce =SLOPE a =STEYX v Excelu)

$$LOD = \frac{S_y}{S} \times 3,3 \quad (1)$$

Graf kalibrační závislosti (y= int. Fluorescence; x= koncentrace fluoresceinu)

Limit detekce (nM)	
--------------------	--

B: Charakterizace měřicího systému

1. Zjistěte frekvenci tvorby kapek, jejich přibližný objem a rychlost pohybu.
2. Potřebná data získáte ze záznamů fluorescence a kamery mikroskopu: rozměry kapky, vzdálenost kapek, čas mezi dvěma kapkami. Pro výpočet objemu kapek, které nejsou zcela kulové můžeme uvažovat rozměry krychle ($200 \times 100 \times ? \mu\text{m}$)

Vzdálenost kapek (cm)	Čas mezi kapkami (s)	Rozměry (μm)

Frekvence (kapek/min)	Přibližný objem (nl)	Rychlost pohybu (mm/s)

Závěr/shrnutí:

(stručně shrnout princip metody, jaké může podle Vás přinést výhody, úskalí, okomentovat získaná data)