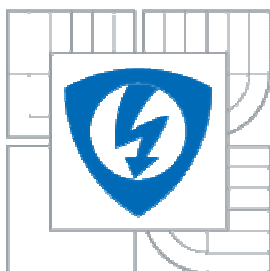




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



**FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH
TECHNOLOGIÍ
ÚSTAV MIKROELEKTRONIKY**

**FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION
DEPARTMENT OF MICROELECTRONIC**

ANALYTICKÉ METODY NA MIKROFLUIDNÍM ČIPU

ANALYTICAL METHODS FOR MICROFLUIDIC CHIP

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Ing. JAN SLAVÍK

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

Doc. Ing. JAROMÍR HUBÁLEK, Ph.D.

BRNO 2013



VYSOKÉ UČENÍ
TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta elektrotechniky
a komunikačních technologií

Ústav mikroelektroniky

Diplomová práce

magisterský navazující studijní obor
Mikroelektronika

Student: Ing. Jan Slavík

ID: 106110

Ročník: 2

Akademický rok: 2012/2013

NÁZEV TÉMATU:

Analytické metody na mikrofluidním čipu

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

Nastudujte analytické metody stanovení proteinů nebo nukleových kyselin. Navrhněte mikrofluidní systém pro vámi navrženou metodiku analýzy vybraných látek, který by se mohl realizovat v podobě čipu. Systém by měl být se zapuštěným nebo povrchovým kanálem, případně kombinovaný s využitím elektroforetické separace. Detektor použijte elektrochemický nebo optický.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

Podle pokynů vedoucího práce

Termín zadání: 11.2.2013

Termín odevzdání: 30.5.2013

Vedoucí práce: doc. Ing. Jaromír Hubálek, Ph.D.

Konzultanti diplomové práce:

prof. Ing. Vladislav Musil, CSc.

Předseda oborové rady

UPOZORNĚNÍ:

Autor diplomové práce nesmí při vytváření diplomové práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č.40/2009 Sb.

ABSTRAKT

Tato práce se zabývá výrobou a otestováním mikrofluidního čipu pro separaci látek. Čip je vyroben ze skla a polymeru. Pro separaci látek je použita elektroforéza a k detekci slouží integrované elektrody.

KLÍČOVÁ SLOVA

Mikrofluidní čip, Kapilární elektroforéza, PDMS, Amperometrie

ABSTRACT

This work deals with fabrication and test of microfluidic chip for separating substances. For separation of substances is used electrophoresis and detection is by integrated electrodes.

KEYWORDS

Microfluidic chip, Capillary electrophoresis, PDMS, Amperometry

SLAVÍK, J. Analytické metody na mikrofluidním čipu. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií. Ústav mikroelektroniky, 2013. 32 s., 0 s. příloh. Diplomová práce. Vedoucí práce: doc. ing. Jaromír Hubálek, Ph.D.

Výzkum popsáný v této diplomové/disertační práci byl realizován v laboratořích podpořených z projektu SIX; registrační číslo CZ.1.05/2.1.00/03.0072, operační program Výzkum a vývoj pro inovace.



Tato práce vznikla za podpory CEITEC - Středoevropského technologického institutu s pomocí výzkumné infrastruktury financované projektem CZ.1.05/1.1.00/02.0068 z Evropského fondu regionálního rozvoje.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že svou diplomovou práci na téma Analytické metody na mikrofluidním čipu jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této diplomové práce jsem neporušil autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhl nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a/nebo majetkových a jsem si plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č. 40/2009 Sb.

V Brně dne

.....

(podpis autora)

PODĚKOVÁNÍ

Za vedení své diplomové práce chci poděkovat doc. Ing. Jaromíru Hubálkovi Ph.D. a Ing. Janě Chomoucké Ph.D. Za cenné rady a příjemnou pracovní atmosféru chci také poděkovat i celému pracovnímu týmu LabSensNano.

V Brně dne

.....

(podpis autora)

OBSAH

| | |
|--|-----------|
| Seznam obrázků | x |
| Seznam tabulek | xi |
| Úvod | 1 |
| 1 Kapilární elektroforéza | 2 |
| 1.1 Instrumentace kapilární elektroforézy | 3 |
| 1.2 Elektroosmotický tok | 4 |
| 1.3 Jouleovo teplo | 5 |
| 1.4 Regenerace kapilár | 5 |
| 1.5 Metody kapilární elektroforézy | 5 |
| 1.5.1 Kapilární zónová elektroforéza..... | 5 |
| 1.5.2 Kapilární gelová elektroforéza..... | 6 |
| 1.5.3 Kapilární izotachoforéza..... | 7 |
| 1.5.4 Kapilární izoelektrická fokusace | 8 |
| 1.5.5 Micelární elektrokinetická chromatografie..... | 8 |
| 1.5.6 Přehled použití metod kapilární elektroforézy..... | 9 |
| 2 funkční princip mikrofluidních čipů pro Kapilární Elektroforézu | 10 |
| 3 Povrchové úpravy polydimethylsiloxanu | 12 |
| 3.1 Plazma..... | 12 |
| 3.2 Ultrafialové záření | 12 |
| 3.3 Chemická depozice z plynné fáze..... | 13 |
| 3.4 Potahování kovy a oxidy kovů..... | 13 |
| 3.5 Depozice vrstvy za vrstvou | 13 |
| 3.6 Sol-gel potahování | 13 |
| 3.7 Silanizace | 13 |
| 3.8 Dynamické povrchové modifikace | 14 |
| 3.9 Záměrná proteinová adsorpce | 14 |
| 4 Metody detekce | 15 |
| 4.1 Absorpční fotometrie | 15 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 4.2 | Fluorescence | 16 |
| 4.3 | Amperometrie | 17 |
| 4.3.1 | Metody amperometrie | 18 |
| 4.3.2 | Konstrukční řešení amperometrické detekce na mikrofluidním čipu. 18 | |
| 4.4 | Konduktometrie | 19 |
| 4.5 | Další metody detekce | 19 |
| 5 | Praktická část | 20 |
| 5.1 | Příprava roztoků | 20 |
| 5.2 | Výrobní procesy | 20 |
| 5.2.1 | Výrobní procesy spodního substrátu ze skla s integrovanými elektrodami 20 | |
| 5.2.2 | Výrobní procesy horního substrátu z PDMS s mikrokanály | 22 |
| 5.3 | Podpůrná zařízení | 24 |
| 5.4 | Analytické experimenty | 25 |
| 5.4.1 | Amperometrická detekce | 25 |
| 5.4.2 | Diskuze výsledků | 28 |
| 6 | Závěr | 29 |
| | Literatura | 30 |
| | Seznam symbolů, veličin a zkratk | 32 |

SEZNAM OBRÁZKŮ

| | |
|--|----|
| Obr. 1: Síly působící na nabitou částici v elektrickém poli | 2 |
| Obr. 2: Uspořádání kapilární elektroforézy | 3 |
| Obr. 3: Elektroosmotický tok..... | 4 |
| Obr. 4: Schéma izotachoforézy..... | 8 |
| Obr. 5: Princip kapilární izoelektrické fokusace | 8 |
| Obr. 6: Základní varianta uspořádání mikrokanálů čipu pro kapilární elektroforézu; 1 – rezervoár pro pufr, 2 – rezervoár pro vzorek, 3 – odpadní rezervoár, 4 - detekční rezervoár, 5 – injekční intersekce, 6 – separační mikrokanál, 7 – oblast detekce..... | 10 |
| Obr. 7: Injekční intersekce; A – realizována překřížením mikrokanálů, B – dvojitě T; šipka znázorňuje tok roztoků působením napětí..... | 11 |
| Obr. 8: Uspořádání detekce analytů optickým kabelem a mikrokanálem vedeném ve tvaru U | 16 |
| Obr. 9: Fluorescenční excitační spektrum a fluorescenční emisní spektrum barviva SYBR Green I navázaného do dvoušroubovnice DNA (převzato a upraveno z [11])..... | 16 |
| Obr. 10: Kroky výrobního procesu spodního substrátu ze skla s integrovanými elektrodami | 21 |
| Obr. 11: Kroky výrobního procesu horního substrátu z PDMS s mikrokanály..... | 22 |
| Obr. 12: Profil vyleptané vrstvy Si | 23 |
| Obr. 13: Replikační maska pro PDMS | 23 |
| Obr. 14: Přípravek pro kontaktování čipu | 24 |
| Obr. 15: Uspořádání mikrofluidního čipu. Pro amperometrickou detekci; A – horní substrát (PDMS); B – dolní substrát (Pyrex s integrovanými elektrodami); C – detail detekční oblasti..... | 25 |
| Obr. 16: Cyklický voltamogram 10mM NaOH | 26 |
| Obr. 17: Cyklický voltamogram 10mM NaOH + 5 mM glukózy | 26 |
| Obr. 18: Cyklický voltamogram 10mM NaOH + 5 mM fruktózy..... | 27 |
| Obr. 19: Separace 50mM glukózy a 50mM fruktózy v 10 mM NaOH..... | 27 |

SEZNAM TABULEK

| | |
|--|----|
| Tab. 1: Oblasti použití metod kapilární elektroforézy | 9 |
| Tab. 2: Elektroosmotická mobilita a zeta potenciál mikrokanálů z různých materiálů.. | 12 |

ÚVOD

Současným trendem analytických technik je miniaturizace. Hlavním důvodem je snížit cenu prováděných analýz. Dochází tak vývoji zařízení lab-on-chip, nebo-li laboratoře na čipu. Lab-on-chip bývá definováno jako zařízení integrující jednu nebo více laboratorních funkcí na jediném čipu o velikosti do několika čtverečných centimetrů, využívají velmi malé objemy kapaliny. Hlavními výhodami lab-on-chip jsou nízká pořizovací cena, používání velmi malých objemů reagentů a vzorků a kratší doba analýzy. Tyto výhody tak vedou ke snížení nákladů na provádění analýz a to jak nižší cenou a menším množstvím spotřebovaného materiálu, tak zkrácením času analýz. Mezi nevýhody systému lab-on-chip patří především možné nepřesnosti při výrobě, zesložitění konstrukce v důsledku uplatnění fyzikálních jevů a nižší poměr signálu k šumu. Přesto lab-on-chip nachází široké uplatnění a vývoji těchto zařízení je věnována čím dál větší pozornost.

Mikrofluidní čipy se staly efektivním nástrojem pro analýzu vzorků na čipu. Na trhu je již k dispozici více typů takovýchto čipů. Díky chemickým a optickým vlastnostem a také díky dobře prostudovaným výrobním procesům, se tyto čipy vyrábí ze skla. Z ohledem na se cenu, čas a práci, stávají se polymery a elastomery ještě vhodnějším materiálem pro mikrofluidní čipy. Experimentálně se vyrábí čipy v kombinaci sklo-sklo, sklo-polymer nebo polymer-polymer.

Tato práce se zabývá výrobními procesy mikrofluidního čipu vyrobeného v kombinaci substrátu sklo-polymer a amperometrickou analýzou dvou monosacharidů.

1 KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZA

Elektroforéza patří mezi elektromigrační separační techniky. Základním principem je separace elektricky nabitých látek na základě jejich rozdílné pohyblivosti v elektrolytu, na který je přivedeno konstantní elektrické pole. Jako elektrolyt slouží pufr. Rychlost pohybu nabité částice v elektrickém poli o jednotkové intenzitě se nazývá elektroforetická pohyblivost u_p . V elektrickém poli o intenzitě E působí na částici o náboji Q elektrická síla F_1 , která uvádí tuto částici do pohybu a odpor viskózního prostředí F_2 , který částici brzdí. Nabitá částice je tedy uváděna do pohybu silou F_1 . Rychlost nabité částice stoupá, ale se zvyšující se rychlostí stoupá i síla F_2 tak dlouho, dokud se síly F_1 a F_2 nevyrovnají. Pak se nabitá částice pohybuje konstantní rychlostí [1]. Platí:

$$F_1 = q \cdot E \quad (1)$$

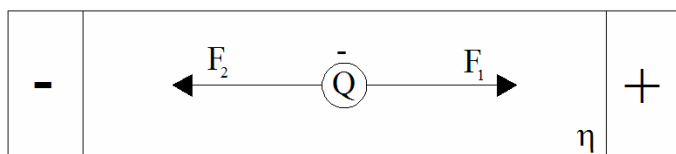
$$F_2 = \eta \cdot r \cdot v \quad (2)$$

$$F_1 = F_2 \rightarrow q \cdot E = \eta \cdot r \cdot v$$

$$u_p = \frac{v}{E} = \frac{q}{\eta \cdot r} \quad (3)$$

| | | |
|-----|--------|--|
| kde | F_1 | elektrická síla [N] |
| | F_2 | odpor viskózního prostředí [N] |
| | u_p | elektroforetická pohyblivost částice [$\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$] |
| | q | náboj molekuly [C] |
| | E | intenzita elektrického pole [$\text{V} \cdot \text{cm}^{-1}$] |
| | η | viskozita prostředí [$\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$] |
| | r | velikost částice [cm] |
| | v | rychlost pohybu částice [$\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$] |

Síly působící na nabitou částici v elektrickém poli jsou znázorněny na Obr. 1.



Obr. 1: Síly působící na nabitou částici v elektrickém poli

V koncentrovaných roztocích se uplatňují parazitní jevy. Kolem nabitých částic se vytváří solvatační obal. Při vysokých koncentracích nabitých částic, strhávají tyto částice se solvatačními obaly i okolní kapalinu a vzniká hydrodynamický tok. Tomuto jevu se říká elektroforetický efekt. Druhým parazitním jevem je relaxační efekt. Při něm se nabitá částice svým pohybem vzdaluje od svého současného solvatačního obalu a postupně je obalována novým obalem. Dříve než se tento nový solvatační obal vytvoří, je tato částice přitahována zpět svým původním solvatačním obalem. Tyto jevy

ovlivňují pohyb nabitých částic. [1]

Elektroforéza může probíhat v plošném uspořádání, nebo se může jednat o kapilární elektroforézu (CE), kdy separace analytů probíhá v úzké kapiláře.

1.1 Instrumentace kapilární elektroforézy

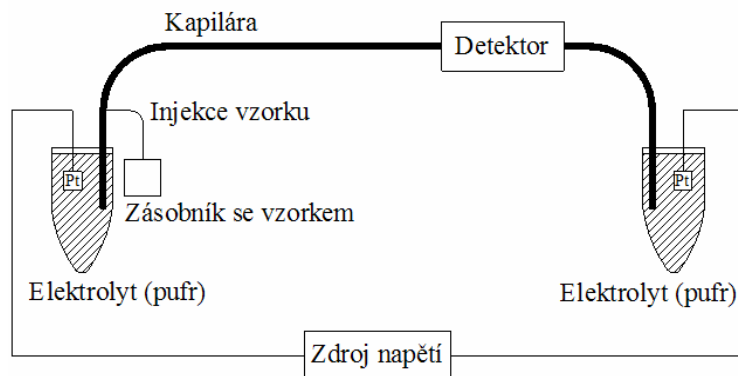
Kapilára má vnitřní průměr 25 až 100 μm a délku 25 až 100 cm. Kapilára je vyrobena z taveného křemene a potažena ochranou polyamidovou vrstvou, která pohlcuje ultrafialové (UV) záření. Vnitřní povrch kapiláry může být chemicky modifikován, např. ke změně iontového náboje vnitřního povrchu. [1]

Konce kapiláry jsou ponořeny do zásobníku s elektrolytem a elektrodami s inertního kovu – platiny. Na elektrody se přivádí konstantní napětí 5 až 30 kV. Při tomto napětí by proud neměl být větší než přibližně 300 μA . Na elektrody je možno přivádět i konstantní proud 10 až 100 μA , avšak metoda s konstantním proudem vede k nereprodukovatelným analýzám. Vysoké napětí vytváří uvnitř kapiláry teplo, které je odváděno dobře vodivými stěnami těchto kapilár. Analýza je také teplotně závislá, musí proto probíhat při konstantní teplotě. Regulace teploty je proto zajišťována jak chladicími tak zahřívacími jednotkami. Jako médium slouží vzduch nebo kapalná směs. Obvykle se pracuje při teplotách 20 až 50 $^{\circ}\text{C}$. [1]

Detekce u kapilární elektroforézy je obvykle optická. Typicky se provádí na 200 μm dlouhém a 50 μm širokém úseku kapiláry zbaveného polyamidové vrstvy. Závislost odezvy detektoru na čase se nazývá elektrofonegram. Z polohy píku lze identifikovat analyt a z velikosti nebo plochy píku lze stanovit množství analytu. [1]

V automatickém dávkovači vzorků bývá 20 až 50 zásobníků se vzorkem. Množství vzorku v zásobnících je od 10 μl až po 5 ml, ale injektováno je jen několik nanolitů. Používají se tři způsoby injekce vzorku. Hydrodynamická injekce spočívá v působení přetlaku na zásobník se vzorkem, čímž dojde k injekci vzorku v množství závislém na rozdílu tlaků. Gravitační injekce je nadzvednutí zásobníku se vzorkem nad úroveň odpadní ampule na určitý čas, čímž dojde k nasátí určitého množství vzorku. Principem elektrokinetické metody je vložení vysokonapěťové elektrody do zásobníku se vzorkem. Následně aplikované napětí způsobí elektroforetickou migraci nabitých částic do kapiláry. [1]

Uspořádání zařízení pro kapilární elektroforézu je na obr. 2.



Obr. 2: Uspořádání kapilární elektroforézy

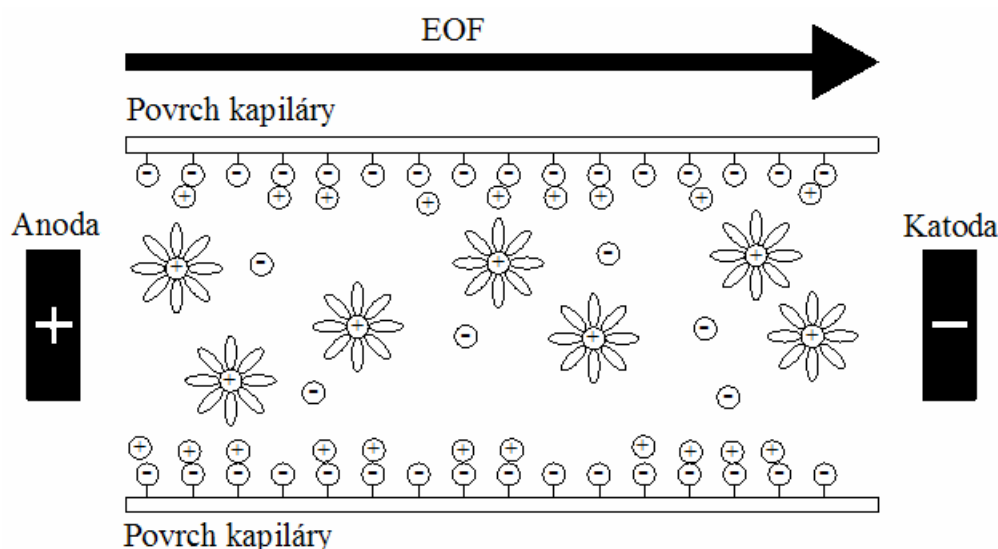
1.2 Elektroosmotický tok

Separace analytů u elektroforézy v plošném uspořádání je založena na elektroforetickém pohybu analytů. Kromě tohoto pohybu se uplatňuje i pohyb difúzní, kvůli kterému je nutno separované analyty fixovat. Díky malým vnitřním průměrům kapilár je u CE zabráněno difúznímu promísení separovaných částic. Kromě elektroforetického toku se u CE vyskytuje i elektroosmotický tok (EOF). Elektroosmotický tok je důsledkem deprotonizace silanolových skupin na vnitřním povrchu kapiláry. Tuto deprotonizaci lze popsat následující rovnicí:



K výraznější deprotonizaci začíná docházet od $\text{pH} = 4$. Od $\text{pH} > 9$ jsou deprotonovány již všechny silanolové skupiny na stěně kapiláry a EOF je tak největší. Deprotonizací silanolových skupin získávají stěny kapiláry záporný náboj a přitahují tak ionty elektrolytu. Vzniká tak nepohyblivá elektrická dvojrivrstva. Uprostřed kapiláry se tvoří difúzní vrstva z kationů H^+ . Potenciálový rozdíl mezi elektrickou dvojrivrstvou a difúzní vrstvou se nazývá zeta potenciál ζ . Kationy H^+ bývají silně hydratovány a po přiložení napětí se začnou pohybovat ke katodě. Proud těchto kationů je tak silný, že s sebou strhává veškerou kapalinu. Rychlost pohybu analytů v tomto prostředí ovlivňuje jejich elektroforetická pohyblivost. Kationy se pohybují rychleji než je tok EOF, neutrální částice se pohybují stejnou rychlostí jako je EOF a aniony se pohybují pomaleji než EOF. Pokud je EOF menší než elektroforetický tok anionů, pak aniony migrují k anodě. Dalším fyzikálním jevem EOF je přitahování kationtů směrem ke stěně kapiláry. Čím blíže jsou kationy ke stěně kapiláry, tím pomalejší je jejich pohyb. Rychlost EOF je v průřezu kapiláry konstantní, mimo oblast u stěn kapiláry, kde postupně klesá na nulu. [1, 2]

Elektroosmotický tok je znázorněn na obr. 3.



Obr. 3: Elektroosmotický tok

1.3 Jouleovo teplo

Průchodem elektrického proudu kapilárou dochází k zahřívání roztoku v kapiláře. Takto vznikající teplo se označuje jako Jouleovo teplo. Jouleovo teplo negativně ovlivňuje analýzu. Uvnitř kapiláry difúzí tepla vzniká radiální teplotní gradient. Nejvyšší teploty jsou ve středu kapiláry a klesají směrem ke stěně kapiláry. Jelikož s teplotou stoupá i rychlost pohybu analytů, dochází k nesteré rychlosti pohybu analytů v kapiláře, což se projeví rozšířením píku. Vyšší tepla dále vede k snížení viskozity elektrolytu a tím k zrychlení času analýzy. U většiny iontů se zvýší pohyblivost o 2% na jeden stupeň celsia. Při vyšších teplotách také může dojít až k varu elektrolytu, čímž dojde ke vzniku bublinek, které mohou přerušit analýzu. [2]

Jouleovo teplo je možno eliminovat chlazením kapiláry, nižší vodivostí elektrolytu, nižším separačním napětím, nebo nižším průměrem kapiláry. Ovšem příliš malé průměry kapiláry snižují limit detekce. [2]

Rychlost vzniku Jouleova tepla lze popsat následující rovnicí:

$$\frac{dH}{dt} = \frac{k \cdot U^2}{L^2} \quad (4)$$

kde $\frac{dH}{dt}$ rychlost vzniku Jouleova tepla [$\text{J} \cdot \text{s}^{-1}$]
 k konduktivita [S]
 U napětí [V]
 L délka kapiláry [m]

1.4 Regenerace kapilár

Před použitím kapiláry je nutno provést regeneraci kapiláry. Regenerace je důležitá pro vznik stejného náboje po celém vnitřním povrchu kapiláry. Regenerace se používá před začátkem měření a někdy i mezi jednotlivými analýzami. Kapiláry se naplní 0,1 M NaOH po dobu 10 minut, následně se naplní vodou na 5 minut a nakonec separačním pufrům na 10 minut. V extrémních případech se používá 1 M NaOH. Regenerace bývá nezbytná při změnách separačních časů analytů mezi jednotlivými měřeními. To se děje zejména při použití pufrů s pH 2 až 6. Při použití pufrů s pH nad 9 nebývá regenerace tolik potřeba. Regeneraci pomocí NaOH nelze použít u chemicky modifikovaných kapilár. [2]

1.5 Metody kapilární elektroforézy

1.5.1 Kapilární zónová elektroforéza

Kapilární zónová elektroforéza (CZE) je nejjednodušší formou CE. Separace je analytů je založena rozdílných poměrech náboje ku hmotnosti. Menší molekuly s větším nábojem se pohybují rychleji než menší molekuly s větším nábojem. Základními předpoklady CZE jsou homogenní elektrolyt a působení konstantního elektrického pole v celé délce kapiláry. [1, 2]

Celková rychlost pohybu částice je u CZE dána součtem elektroforetické a elektroosmotické pohyblivosti:

$$u = u_p + u_o = \mu_p \cdot E + \mu_o \cdot E = \frac{q}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r} \cdot \frac{U}{L} + \frac{\varepsilon \cdot \zeta}{4 \cdot \pi \cdot \eta \cdot R} \cdot \frac{U}{L} \quad (5)$$

| | | |
|-----|---------------|--|
| kde | u | rychlost pohybu iontu [$\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$] |
| | u_p | elektroforetická rychlost pohybu iontu [$\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$] |
| | u_o | elektroosmotická rychlost pohybu iontu [$\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$] |
| | μ_p | elektroforetická pohyblivost [$\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$] |
| | μ_o | elektroosmotická pohyblivost [$\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$] |
| | E | intenzita elektrického pole [$\text{V} \cdot \text{cm}^{-1}$] |
| | q | náboj molekuly [C] |
| | η | viskozita elektrolytu [$\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$] |
| | r | poloměr iontu [cm] |
| | ε | permitivita elektrolytu [$\text{C}^2 \cdot \text{N}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$] |
| | ζ | zeta potenciál [V] |
| | R | poloměr kapiláry [cm] |
| | U | napětí mezi elektrodami [V] |
| | L | délka kapiláry [cm] |

Náboj molekuly je obvykle závislý na pH. Např. sodík má v rozsahu pH 4 až 10 stejný náboj i pohyblivost. Jiné molekuly jako je acetát nebo glutamát jsou v tomto rozsahu pH záporně nabité, ovšem v alkalickém prostředí vlivem EOF migrují směrem k záporně nabitě elektrodě. Amfolytů jako jsou aminokyseliny, peptidy a proteiny se mění jejich náboj v pH podle jejich izoelektroického bodu (pI). [2]

Jedním z problémů CZE je adsorpce analytů na stěnu kapiláry. Adsorpce je způsobená elektrostatickým vázáním kladně nabitých analytů na záporně nabitou stěnu kapiláry a také hydrofóbními interakcemi. K adsorpci na stěnu kapiláry dochází při separacích s proteiny, jejichž pK_a je vyšší než pH pufru. Adsorpci lze předejít vhodným pH pufru nebo pokrytím vnitřního povrchu kapiláry tenkou vrstvou polymeru. [2]

1.5.2 Kapilární gelová elektroforéza

Pro elektroforetickou analýzu deoxyribonukleových kyselin (DNA) a proteinů se nejčastěji používá kapilární gelová elektroforéza (CGE). U této metody se kapiláry vyplňují gelem, respektive polymerem. Tento polymer se zesítuje a vytvoří tak síto. Podle velikosti analytů se i volí hustota gelu. Čím hustší gel, tím jemnější rozdělení analytů, ale pomalejší analýza. Cílem CGE je dělení DNA a proteinů, na základě jejich hmotnosti. Molekulová hmotnost proteinů se udává v Daltonech (Da). V průměru kódovaná aminokyselina váží 110 Da a průměrný nukleotidový pár váží 649 Da. DNA se ovšem přímo přepočítává na počet nukleotidů.

Existuje velké množství používaných gelů s různými vlastnostmi. Liší se v separační účinnosti, viskozitě, pohlcovaných vlnových délkách a dalších vlastnostech. Mohou mít i speciální vlastnosti jako je např. termosenzitivita. Gely lze dělit na chemické a fyzikální. Chemické gely jsou zesítovány kovalentními vazbami a mohou být i kovalentně navázány na vnitřní povrch kapiláry a tak potlačovat EOF. Avšak kovalentní vazba gelu na stěnu kapiláry vede k problému s ucpáváním a ničením kapiláry. Proto se

spíše aplikují roztoky s plnitelným gelem. Plnitelé gely používají deprivatizované celulosy rozpuštěné v pufru. Fyzikální gely jsou zesíťovány vodíkovými můstky, hydrofóbními interakcemi a zauzlením. Nejčastěji se u CGE používá chemický gel polyakrylamid. Agarósový gel není pro CGE příliš vhodný, neboť nevydrží vyšší teploty, které vznikají při vysokých napětích a vytváří se tak v gelu trhliny. [1-3]

Pokud proteiny nejsou studovány ve svém nativním stavu, jsou denaturovány. Denurací proteinů se rozumí jejich rozpad z nativní prostorové struktury. U proteinů k renaturaci nedochází vůbec nebo jen částečně. Často používaná metoda pro analýzu proteinů je elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS-PAGE). Denaturace proteinů se provádí zahřátím na 90 °C po dobu 30 minut za přítomnosti 2 % β -mercaptoethanolu a 1 % dodecylsírany sodného (SDS). SDS je silný aniontový detergent používaný k denaturaci nativních proteinů. Denaturace proteinů při 90 °C a za přítomnosti SDS způsobí, že se SDS naváže na denaturované proteiny v konstantním poměru 1,4 g SDS na 1 g denaturovaných proteinů. Náboj proteinů je zanedbatelný v porovnání s nábojem SDS. Denaturované proteiny takto získávají náboj úměrný jejich velikosti. Takto upravené proteiny se separují na základě svých hmotností, nezávisle na tvarech a vlastním náboji proteinů. Separace probíhá v 90 mM Trisfosfátovém pufru s pH 8,6 a 0,1% SDS. Kapiláry jsou dlouhé 10 až 20 cm a přikládá se napětí 400 V·cm⁻¹. Za těchto podmínek dochází k lineární korelaci mezi pohyblivostí a molekulovou hmotností. [2, 4]

V případě optické detekce s využitím barviva může SDS znehodnocovat analýzu. Jestliže stoupne koncentrace SDS nad micelární koncentraci, začne se do SDS micel vázat barvivo. To je pak detektorem v záznamu detekováno jako pozadí. Tomuto nežádoucímu účinku lze předejít snížením koncentrace SDS a tím rozpadu SDS micel. Provádí se to rozšířením oblasti, kterou SDS micely prochází. Difúzí se začne koncentrace SDS vyrovnávat a může klesnout až pod micelární úroveň. [2]

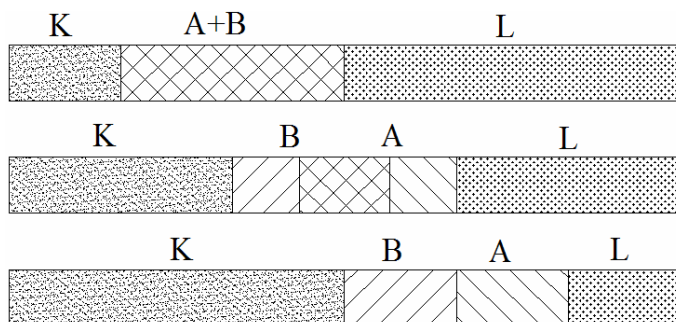
Separace oligonuklotidů probíhá v polyakrylamidovém gelu se 100 mM Tris-borátovým pufrům, pH 8,3 s 2 mM kyselinou ethylendiamintetraoctovou (EDTA) a 7 M močovinou. Hustota polyakrylamidového gelu se volí např.: pro 50 bp 8 %. Močovina se přidává do pufru pro denaturaci DNA. Denurací DNA se rozumí rozvolnění komplementárních vazeb mezi řetězci DNA a tím přechod DNA do jednořetězcové formy. Po odeznění denaturačních podmínek DNA opět denaturuje. Pro analýzu dvoušroubovicové DNA se používají fyzikální gely. Používají se kapiláry s povrchovou úpravou pro úplné potlačení EOF. Za těchto podmínek migrační časy DNA jsou úměrné počtu bází. [2, 5, 6]

Optická detekce DNA bývá pomocí nekovalentně se vázajícího interkalačního barviva jako je např. ethidium bromid, nebo SYBR Green. Ethidium bromid sesilně váže na DNA vmezeřováním do dvojšroubovice DNA. Ethidium bromid fluoreskuje mnohem více vmezeřený do DNA, ale fluoreskuje i volně vázaný a vytváří tak pozadí. Ethidium bromid také ovlivňuje pohyblivost DNA, na kterou je navázán. [2]

1.5.3 Kapilární izotachoforéza

Principem kapilární izotachoforézy (CITP) je rozdělení směsi iontů na základě jejich rozdílných elektroforetických mobilit. Směs iontů (A+B) se přidá mezi vedoucí (L) a koncový elektrolyt (T). Pohyblivost jednotlivých složek se volí tak, aby postupně klesala, tj.: $u_L > u_A > u_B > u_T$. Po přiložení elektrického pole se složky rozdělí podle

svých elektroforetických pohyblivostí. Princip izotachoforézy je schématicky znázorněn na obr. 4. [2]



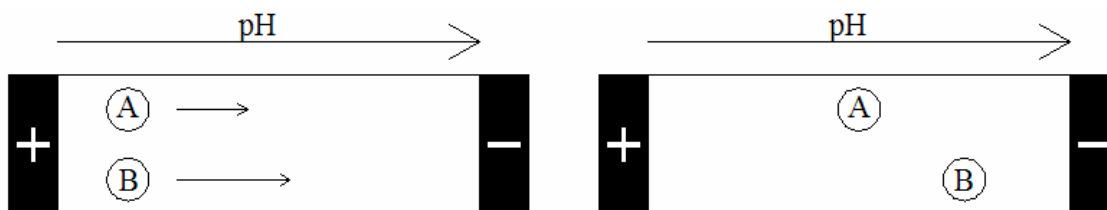
Obr. 4: Schéma izotachoforézy

1.5.4 Kapilární izoelektrická fokusace

Kapilární izoelektrická fokusace (CIEF) slouží k separaci amfolytů. Amfolyty jsou látky obsahující kladnou i zápornou skupinu. V závislosti na pH prostředí mohou existovat ve formě kladné, neutrální i záporné. pH při kterém má amfolyt neutrální náboj se rovná pI amfolytu. pI aminokyselin lze vypočítávat z disociačních konstant pro kyselé a zásadité funkční skupiny. Jestliže je pH prostředí vyšší než pI amfolytu, amfolyt má záporný náboj, jestliže je pH prostředí nižší než pI amfolytu, amfolyt má kladný náboj. Příkladem amfolytu je glycin s pI = 6,064, který se může vyskytovat v těchto formách:



Principem CIEF je naplnění kapiláry pufrů s gradientem pH. Vzorek se nadávkuje na konec kapiláry s nízkým pH, který je zároveň zapojen na kladný pól. Po přiložení napětí kladně nabitě ionty migrují v gradientu pH a zastavují na tom místě, kde získají neutrální náboj. Po dokončení separace je tlakem posouván obsah kapiláry směrem k detektoru [1, 2]. Princip kapilární izoelektrické fokusace je schématicky znázorněn na obr. 5.



Obr. 5: Princip kapilární izoelektrické fokusace

1.5.5 Micelární elektrokinetická chromatografie

Micelární elektrokinetická chromatografie (MECC) je hybridní technika mezi chromatografií a kapilární elektroforézou. Principem metody je použití vysoké koncentrace povrchově aktivních látek - surfaktantů. Jako surfaktant se používá např. SDS. Po překročení micelární koncentrace začnou surfaktanty nad touto koncentrací agregovat a vytvářet micely. Na vnější straně micel jsou umístěny hydrofilní hlavičky a

vnitřní stranu micel tvoří hydrofobní řetězce surfaktantů. Jádro micely je tedy nepolární a může rozpouštět složky vzorku. Tato nepolární jádra vytvářejí pseudostacionární fázi. Analyty ve vzorku se rozdělují mezi pseudostacionární fázi v micelách a mobilní fázi v pufru. Dělení probíhá za vysokého pH, aby vznikl tak silný EOF, aby micely migrovaly stejným směrem jako EOF. Technika není vhodná pro větší látky kvůli omezenému vnitřnímu rozměru micel. [1, 2]

1.5.6 Přehled použití metod kapilární elektroforézy

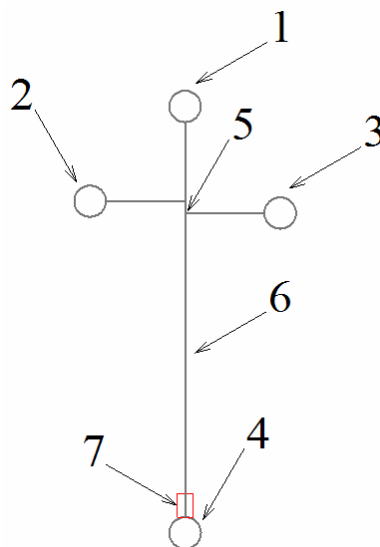
V tab. 1 jsou shrnuty oblasti použití jednotlivých metod CE [2].

Tab. 1: Oblasti použití metod kapilární elektroforézy

| Malé ionty | Malé molekuly | Peptidy | Proteiny | Oligonukleotidy | DNA |
|-------------|---------------------|------------------------------------|----------------------------|-----------------|-----|
| CZE CITP | MECC CZE CITP | CZE MECC CIEF CGE CITP | CZE CGE CIEF CITP | CGE MECC | CGE |

2 FUNKČNÍ PRINCIP MIKROFLUIDNÍCH ČIPŮ PRO KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZU

Mikrofluidní čipy, miniaturizující zařízení pro CE, z funkčního hlediska vychází z konstrukce znázorněné na obr. 6.

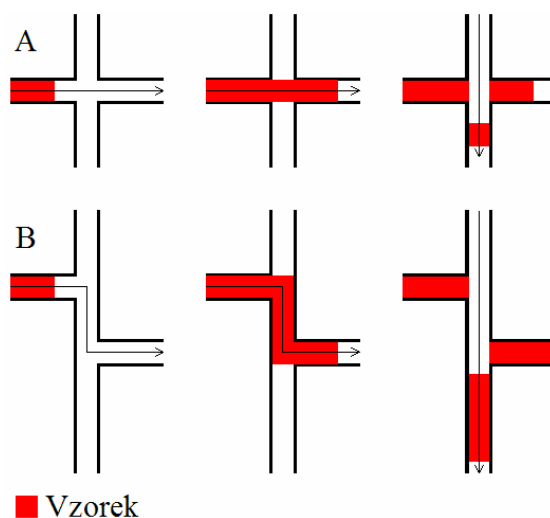


Obr. 6: Základní varianta uspořádání mikrokanálů čipu pro kapilární elektroforézu;
1 – rezervoár pro pufr, 2 – rezervoár pro vzorek, 3 – odpadní rezervoár,
4 - detekční rezervoár, 5 – injekční intersekce, 6 – separační mikrokanál,
7 – oblast detekce

Čip bývá velký řádově v desítkách milimetrů, hloubky mikrokanálů bývají 10 až 50 μm a šířky mikrokanálů 50 až 100 μm . Postup pro použití čipu je následující: V jednotlivých rezervoárech, nebo pod nimi jsou umístěny elektrody pro CE. Do rezervoáru pro pufr se napipetuje pufr (nebo gel) a přetlakem se nechá roztéci do mikrokanálů. Pokud není k dispozici přetlak, alternativním krokem může být vyplnění rezervoárů 1, 2 a 3 pufrem, následně se aplikuje vakuum na rezervoár 4 a nechají se vyplnit mikrokanály elektrolytem, nakonec se pipetou odsaje z rezervoárů 2 a 3 přebytečný elektrolyt. Do rezervoáru 2 se napipetuje vzorek a aplikuje se napětí mezi rezervoáry 2 a 3. Napětí mezi elektrodami u mikročipů bývá okolo $250 \text{ V}\cdot\text{cm}^{-1}$. Po 5 až 30 vteřinách by mělo dojít k vyplnění injekční intersekce vzorkem. Napětí se následně začne vést z rezervoáru 1 do rezervoáru 4. Z injekční intersekce se tak dostane malé množství vzorku do separačního mikrokanálu. V separačním mikrokanálu dojde k separaci analytů podle jejich pohyblivosti v mikrokanálu. V oblasti detekce, která je těsně před koncem separačního mikrokanálu se detekuje analyt. Nejčastěji opticky nebo elektrochemicky pomocí integrovaných elektrod.

Čip pro proteiny má ve své konstrukci navíc rezervoár pro SDS. Poté co je v separačním mikrokanálu protein úspěšně separován, dostává se těsně před oblastí detekce do oblasti křížení s mikrokanály pro rezervoár pro SDS. Tyto mikrokanály obsahují stejný pufr jako separační mikrokanál, ale neobsahují SDS. Přivedením napětí z těchto postraních mikrokanálů do separačního mikrokanálu dojde ke vzniku koncentračního gradientu SDS. Koncentrace SDS klesne pod micelární úroveň a SDS micely se tak rozpadnou. Tím dojde tak k uvolnění barviva do pufru a zabrání se tak vzniku pozadí na detekovaném signálu.

Injekční intersekcce je znázorněna na obr. 7. Může být realizována prostým překřížením mikrokanálů (obr. 7A), nebo může i vytvářet krátký mikrokanál (obr. 7B). Této konstrukci se říká dvojitě T, bývá do 1000 μm dlouhá a slouží k dávkování většího množství vzorku.



Obr. 7: Injekční intersekcce; A – realizována překřížením mikrokanálů, B – dvojitě T; šipka znázorňuje tok roztoků působením napětí

3 POVRCHOVÉ ÚPRAVY POLYDIMETHYLSILOXANU

Polydimethylsiloxan (PDMS) patří díky svým výborným optickým vlastnostem, nízké ceně a jednoduchým výrobním procesům mezi často používané materiály u experimentálně sestavených mikrofluidních čipů. Některé vlastnosti PDMS ovšem nejsou pro mikrofluidiku vhodné. Povrch PDMS je ale možno poměrně snadno modifikovat a tak upravovat jeho vlastnosti. Mezi nevýhodné vlastnosti patří hydrofobní povrch, který znesnadňuje nasávání roztoků do mikrokanálů. Dále často nestabilní EOF a adsorpce hydrofobních látek na povrch PDMS během analýzy. Povrchové modifikace jsou důležité pro potlačení adsorpce, zvýšení snášivosti, zvýšení stability povrchu a úpravu EOF.

3.1 Plazma

Plazma je ionizovaný plyn složený z elektronů a iontů. Vzniká odtržením elektronů z elektronového obalu atomů plynu. Modifikace pomocí plazmy využívá jako plyn kyslík, dusík nebo vodík. Molekuly plynu disociují a vytváří na povrchu substrátu funkční chemické skupiny. [7, 8]

Použitím kyslíkové plazmy vznikají na povrchu PDMS silanolové skupiny. Povrchu PDMS se tak snižuje kontaktní úhel vody (WCA) ze 112° na 70°, zvyšuje EOF a za současného působení vyšších teplot se PDMS může pevně vázat na sklo nebo jiné PDMS. Plazmou modifikovaný povrch bez dalších úprav rychle ztrácí své vlastnosti. Povrchová úprava plazmou trvá řádově desítky vteřin [7, 8]. Elektroosmotická mobilita a zeta potenciál mikrokanálů z různých materiálů jsou uvedeny v tab. 2. [9]

Tab. 2: Elektroosmotická mobilita a zeta potenciál mikrokanálů z různých materiálů

| Materiál | $\mu_o [10^{-4} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}]$ | $\zeta [\text{mV}]$ |
|-----------------------|---|---------------------|
| Sklo | 3,90±0,08 | -55±1 |
| Plazmou upravený PDMS | 3,52±0,06 | -49±1 |
| PDMS/Sklo | 2,30±0,07 | -32±1 |
| Nativní PDMS | 1,12±0,10 | -15±1 |

3.2 Ultrafialové záření

Ultrafialové záření (UV) vede ke stejným modifikacím povrchu jako modifikace povrchu plazmou. Výhodou použití UV je působení do větší hloubky povrchu PDMS a modifikování povrchu bez jeho mechanického zeslabení a bez vzniku trhlin. Nevýhodou použití UV je delší čas v řádu desítek minut. [8]

3.3 Chemická depozice z plynné fáze

Chemická depozice z plynné fáze (CVD) je chemický proces používaný k nanášení tenkých filmů na povrch substrátu depozicí molekul v plynném skupenství, které chemicky reagují s povrchem. CVD probíhá ve fázích sublimace, pyrolýzy a depozice. Deponované vrstvy vedou k reaktivnímu povrchu PDMS a zesílení síly vazby mezi při spojování dvou PDMS. [8]

3.4 Potahování kovy a oxidy kovů

Kovy mění povrchovou energii PDMS. Naprášená vrstva TiO_2 snižuje WCA ze 105° na 25° , materiál si zachovává svou propustnost pro světlo, ale dochází ke vzniku trhlin. Naprášené zlato (<1 nm) snižuje WCA o 25° bez vzniku trhlin. Potahování kovy se provádí rovněž i pro udržení hydrofility po modifikaci povrchu PDMS plazmou. K tomuto účelu se nejčastěji používá hliník. [8]

3.5 Depozice vrstvy za vrstvou

Depozice vrstvy za vrstvou (LBL) slouží k vytváření polyelektrolytových vícevrstev (PEMs). Výroba těchto vrstev spočívá v adsorpci polyaniontů a polykationtů na povrchu substrátu. PEM slouží k vytváření přesných tlouštěk vrstev v nanorozměrovém měřítku a k vytvoření stabilního osmotického toku. Ovšem struktura, funkce a stabilita PEM vrstev závisí na mnoha faktorech, např.: iontové síle polyelektrolytu a jeho koncentraci, typu rozpouštědla nebo teplotě a pH roztoku. [8]

3.6 Sol-gel potahování

Sol-gel metoda spočívá aplikaci sol-gel látky v tekutém stavu „sol“ na povrch PDMS a v její následné polymerizaci do pevného stavu „gel“ působením vyšších teplot. V tekutém stavu jsou částice rozpuštěny, při přechodu na pevný stav dojde mezi částicemi k překřížením. Tyto překřížení mají vysokou hustotu a homogenní distribuci, tím dojde k jejich stabilizaci na povrchu PDMS a snížením WCA až na 19° . [8]

3.7 Silanizace

Povrchová silanizace může být provedena na různých substrátech obsahujících povrchovou hydroxylovou skupinu, která bude reagovat s alkoxyasilany za vytvoření kovalentních Si-O-Si vazeb na tomto substrátu. Amino skupiny, thiolové skupiny a karboxylové skupiny ukončené jako alkoxyasilany, mohou být vystaveny na povrchu a sloužit k oxidaci. Mimo plazmy lze k oxidaci povrchu PDMS použít 1 M NaOH, nebo $\text{H}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{HCl}$. [8]

3.8 Dynamické povrchové modifikace

Tato technika zahrnuje použití surfaktantů nebo iontových roztoků k modifikaci povrchu PDMS. Použitím této metody jsou povrchové modifikátory přidány přímo do pufru ve kterém se provádí analýza. Hydrofobní konce surfaktantů jsou přitahovány k hydrofóbnímu povrchu PDMS, zatímco hydrofilní hlavičky surfaktantu jsou otočené směrem do pufru. Takto se stane povrch PDMS hydrofilním a v závislosti na použitém surfaktantu může dojít ke zvýšení elektroosmotického toku. Adsorpce surfaktantů nevadí, neboť surfaktanty jsou přímo v pufru. Výhodou této metody je její rychlost, jednoduchost a nízká cena. [7, 8]

3.9 Záměrná proteinová adsorpce

Principem je využití malých proteinů bohatých na cystein s vlastnostmi podobnými surfaktantům. Tyto proteiny vytvoří vrstvu na rozhraní PDMS a vody. Na povrchu PDMS pak WCA klesá až na 51°. Výhodou této metody je její biokompabilita. [8]

4 METODY DETEKCE

4.1 Absorpční fotometrie

Absorpci fotonů vlnových délek odpovídajících Elektronů volných atomů mohou přecházet ze základního stavu do excitovaného stavu. Absorpční fotometrie je optická metoda ke stanovení koncentrací analytů absorbujících elektromagnetické záření. Elektromagnetické záření se používá v oblasti UV (190 – 400 nm) i v oblasti viditelného záření (VIS) (400 – 760 nm) a méně často i v oblasti infračerveného záření (IR) (760 – 1000 nm). Elektronů volných atomů absorbují fotony vlnových délek odpovídajících excitační energii přechodu elektronu ze základního stavu do stavu excitovaného. Množství absorbovaného záření závisí na koncentraci stanovované látky. Měření se provádí pro určitou vlnovou délku, která odpovídá maximu absorpce stanovované látky. U DNA závisí absorpční maximum na zastoupení jednotlivých bází. Více absorbují puriny než pyrimidiny. Měření DNA se standardně provádí pro vlnovou délku 260 nm. U proteinů závisí absorpční maximum na zastoupení jednotlivých aminokyselin. Nejvíce absorbují cystein, tryptofan a tyroxin. Měření proteinů se standardně provádí pro vlnovou délku 280 nm. [1]

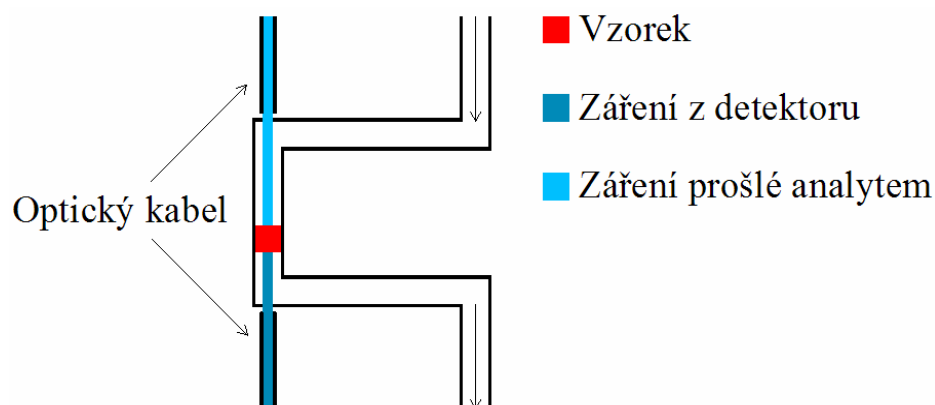
Pro výpočet koncentrace se používá Lambertovův-Beerovův zákon:

$$\log \frac{I_0}{I} = A = \varepsilon_a \cdot c \cdot l \quad (6)$$

- kde I_0 intenzita vstupujícího záření [$\text{W} \cdot \text{m}^{-2}$]
 I intenzita vystupujícího záření [$\text{W} \cdot \text{m}^{-2}$]
 A absorpance [-]
 ε_a molární absorbanční koeficient [$\text{cm} \cdot \text{l} \cdot \text{mol}^{-1}$]
 c koncentrace látky [$\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$]
 l délka optické dráhy světla procházejícího roztokem [cm^{-1}]

Molární absorpční koeficient závisí na vlnové délce a určuje se buď experimentálně na známých vzorcích, nebo výpočtem. Ke stanovení množství látky lze přistoupit i přístupem, kdy se měří absorpce pufru, která se mění podle toho, jak je pufr ředěn analyzovaným analytem.

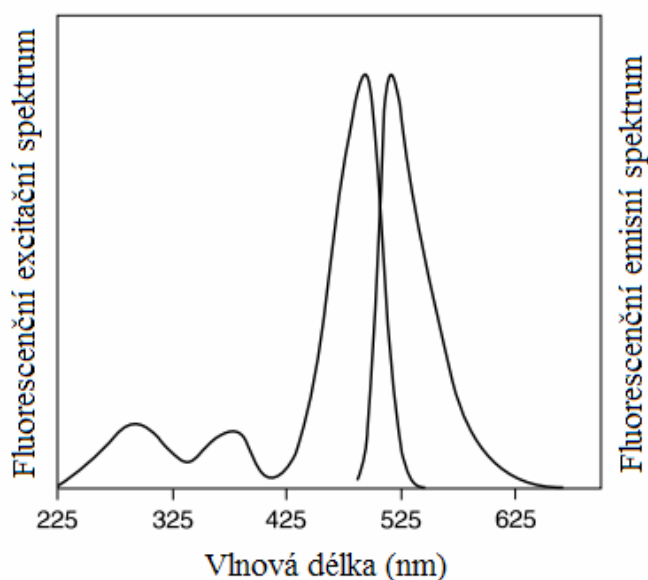
Absorpční fotometrie se sestává ze zdroje světla, monochromatického filtru pro izolaci dané vlnové délky a detektoru záření prošlého vzorkem. Vzorek bývá umístěn v kyvetě. Kromě odezvy ze vzorku v kyvetě se měří i odezva záření prošlého referenční kyvetou, která obsahuje roztok bez měřeného analytu. U čipů se detekce provádí přes průhledné substráty, nebo pomocí optických vláken. Optické vlákno přivádí záření ze zdroje záření na rozšířenou část separačního kanálu, nebo na část separačního kanálu vedeného ve tvaru U. Tento způsob uspořádání je zobrazen na obr. 8. Světlo by mělo projít 100 – 250 μm délky analyzovaného roztoku. Vyvedení vystupujícího světla k detektoru je provedeno opět pomocí optického vlákna.



Obr. 8: Uspořádání detekce analytů optickým kabelem a mikrokanálem vedeném ve tvaru U

4.2 Fluorescence

Jak již bylo popsáno v předcházející kapitole, při absorpci záření analyzovanou látkou, dochází vlastně k absorpci fotonů elektronem a tím k přechodu molekuly ze základního stavu do stavu excitovaného. Z excitovaného stavu se molekula vrací zpět do základního stavu emisí fotonu. Jelikož během toho procesu došlo ke ztrátě energie, emisní foton má vždy nižší energii než foton excitační. To má za následek, že emitované záření má vždy větší vlnovou délku než záření excitační. Pro fluorescenční barviva jsou stanovovány fluorescenční excitační a emisní spektra. [1, 10] Příklad takového barviva je např. ethidium bromid nebo SYBR Green I, jehož fluorescenční excitační spektrum a fluorescenční emisní spektrum po navázání do dvoušroubovice DNA je znázorněno na obr. 9.



Obr. 9: Fluorescenční excitační spektrum a fluorescenční emisní spektrum barviva SYBR Green I navázaného do dvoušroubovice DNA (převzato a upraveno z [11])

Jestliže došlo k emisi světla z molekuly v singletovaném stavu (tj. celkové spinové kvantové číslo molekuly je 0), pak se hovoří o fluorescenci. Při fluorescenci trvá dohasínání emisního světla řádově nanosekundy. Jestliže došlo k emisi světla z molekuly v tripletovém stavu (tj. celkové spinové kvantové číslo molekuly je 1), pak se hovoří o fosforescenci. Při fosforescenci trvá dohasínání emisního světla řádově nanosekundy až sekundy. [10]

Zařízení pro měření fluorescence se sestává ze zdroje světla (laser, dioda emitující světlo), dvou filtrů a optického detektoru. Excitační filtr, který se umísťuje mezi zdroj záření a vzorek, slouží k propouštění vlnové délky záření podle excitačního maxima analyzované látky. Tento filtr slouží k výběru analytu, u kterého má docházet k fluorescenci. Emisní (bariérový) filtr, který se umísťuje mezi vzorek a detektor, slouží k propouštění vlnové délky světla podle emisního maxima analyzované látky. Tento filtr slouží ke zvýšení citlivosti detekce. [10]

4.3 Amperometrie

Z elektrochemických detekcí se u mikrofluidních čipů využívá nejčastěji amperometrická detekce. Amperometrie je založena na měření proudu vznikajícího na povrchu pracovní elektrody redoxní reakcí elektroaktivních složek analytu procházejícího mikrokanálem. Z velikosti tohoto proudu lze určit molární množství oxidované ($I > 0$) nebo redukované ($I < 0$) látky na povrchu pracovní elektrody pomocí Faradayova zákona:

$$Q = nFN \quad (7)$$

kde Q náboj [C]
 n počet elektronů [-]
 F Faradayova konstanta ($96485 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$)
 N množství produktu přeměněného na povrchu pracovní elektrody [mol^{-1}]

$$i_t = \frac{dQ}{dt} = nF \frac{dN}{dt} \quad (8)$$

kde i_t proud [A]
 t čas [s]

U amperometrie se používá tříelektrodové zapojení s pracovní, referenční a pomocnou elektrodou, nebo dvouelektrodové zapojení s pracovní a pomocnou elektrodou. Při tříelektrodovém zapojení potenciostat udržuje na pracovní elektrodě konstantní potenciál prostřednictvím referenční elektrody, ke které je potenciál vztažen a to nezávisle na velikosti protékajícího proudu. Pomocná elektroda slouží jednak k vedení proudu, který by bez ní procházel přes referenční elektrodu a mohl referenční elektrodu poškozovat a dále slouží k minimalizaci ohmického úbytku napětí na rozhraní elektrody a roztoku. Při dvouelektrodovém zapojení je potenciál na pracovní elektrodě vztažen k pomocné elektrodě. Při tomto typu zapojení je velikost pracovního potenciálu ovlivněna velikostí proudu procházejícího roztokem, jelikož napětí se snižuje odporem měřeného roztoku a ohmickým úbytkem na rozhraní elektrody a roztoku. [12]

4.3.1 Metody amperometrie

Přímá amperometrie

Při použití přímé amperometrické detekce je měřen proud vznikající redoxní reakcí analytu na pracovní elektrodě. [13]

Pulsní amperometrie

Principem pulsní amperometrické detekce (PAD) je cyklické měnění potenciálu pracovní elektrody. Tato metoda byla použita např. pro detekci Ti^+ , Pb^{2+} a Cu^{2+} . Nejdříve byl na pracovní elektrodu přiveden negativní potenciál pro redukci měřených kovů a následně byl na pracovní elektrodu přiveden pozitivní potenciál pro oxidaci redukováných kovů [14]. PAD je velice citlivou metodou, která se používá i pro detekci např. cukrů a glykoproteidů na zlatých elektrodách. [13]

Nepřímá amperometrie

Nepřímá amperometrická detekce slouží k detekci analytů, které nejsou elektroaktivní. Principem je pufr s rozpuštěnou pomocnou elektroaktivní látkou, která vytváří stálou proudovou odezvu. Měřený analyt snižuje koncentraci této pomocné látky a dojde tak ke snížení proudové odezvy, čímž je detekován analyt. Nepřímou amperometrií je možno kombinovat s přímou amperometrií. [13]

4.3.2 Konstrukční řešení amperometrické detekce na mikrofluidním čipu

Detekce na konci mikrokanálu

Detekce na konci mikrokanálu je nejpoužívanější metodou amperometrické detekce u mikrofluidních čipů. V tomto uspořádání je pracovní elektroda umístěna desítky mikrometrů od konce separačního mikrokanálu. Tato vzdálenost je dostačující pro oddělení separačního napětí od pracovní elektrody. I když je separační napětí uzemněno v detekčním rezervoáru, zbývající separační pole způsobí zvýšení potenciálů na pracovní elektrodě. Proto se provádí voltmetrická charakterizace analytu za separačních podmínek, pro určení vhodného detekčního potenciálu. Detekce na konci mikrokanálu je nejméně citlivým konstrukčním řešením s nejvyššími proudy na pozadí. Separační účinnost je rovněž snížena difúzí analytu mezi koncem mikrokanálu a pracovní elektrodou. Elektrody se také neumisťují příliš blízko ke konci separačního mikrokanálu, protože fluktuace separačního napětí vytváří šum, který zvyšuje detekční limit. [15, 16]

Detekce v mikrokanálu

Při detekci v mikrokanálu je pracovní elektroda umístěna přímo v separačním mikrokanálu. Analyty migrující pufrém jsou detekovány v mikrokanálu a je tak eliminována difúze analytů. Při umístění pracovní elektrody přímo do mikrokanálu je nutno používat elektricky oddělený (plovoucí) potenciostat. Oproti detekci na konci mikrokanálu má detekce v mikrokanálu vyšší píky s menším zkreslením. [15, 16]

Detekce vně mikrokanál

Při metodě detekce vně mikrokanál je pracovní elektroda umístěna v mikrokanálu. Ještě přední je umístěna oddělovací elektroda, která uzemňuje separační napětí. Tok analytu přes pracovní elektrodu je způsoben EOF. Elektrolýza vody během elektroforetické separace způsobuje vznik plynu na uzemňovací elektrodě a zasahuje do elektrochemické odezvy. K předcházení vzniku těchto bublin se používá čip vyrobený z poly(methylmethacrylát) (PMMA) na kterém jsou hydrogenové ionty redukovány a adsorbovány. [15, 16]

4.4 Konduktometrie

Konduktometrie je elektroanalytická metoda, pomocí které se měří vodivost iontů v roztoku. Jedná se tedy o měření celkové vodivosti elektrolytu mezi dvěma elektrodami, která se mění s vodivostí a koncentrací analyzovaných látek. Obvykle se používá elektrolyt s nižší vodivostí a vyšší koncentrací, aby došlo k potlačení elektrodisperze. Konduktometrický detektor se skládá ze dvou elektrod, mezi které je vkládán vysokofrekvenční střídavý proud. Střídavý proud se používá proto, aby nedocházelo k elektrolytickým reakcím na povrchu elektrod. Existují dvě základní konduktometrické metody, a to kontaktní a bezkontaktní. [17]

Při použití kontaktní konduktometrie jsou konduktometrické elektrody v přímém kontaktu s elektrolytem. Při tomto uspořádání, je ovšem nutno od sebe oddělit separační napětí a konduktometrické elektrody. Konduktometrické elektrody se proto vkládají na konec kapiláry. Tato metoda se ale příliš nepoužívá. [17]

Rozšířenější je bezkontaktní konduktometrie, kdy elektrody tvoří válečky, kterými prochází kapilára. Válečky jsou 2 až 30 mm dlouhé a navzájem od sebe vzdálené 1 až 5 mm. Elektrody se také navzájem odstiňují pomocí tenké měděné fólie. Na excitační elektrodu je přiváděn proud a výsledný proud protékající kapilárou je zaznamenáván detekční elektrodou. [17]

4.5 Další metody detekce

Kromě výše zmíněných detekcí analytů lze u mikrofluidních čipů použít další způsoby detekce. U optických metod detekce se jedná o využití plasmové emise, chemiluminiscence, refrakčního indexu, termální mikroskopie, Ramanových spekter a rezonance povrchového plasmonu. U elektrochemických metod detekce lze dále použít voltmetrii a potenciometrii. Dále je možno použít hmotnostní spektrometrii, tepelnou detekci, akustickou detekci a nukleární magnetickou rezonanci. [18]

5 PRAKTICKÁ ČÁST

5.1 Příprava roztoků

Některé roztoky byly připraveny ve vyšších koncentracích a podle potřeby ředěny.

NiCr leptadlo

16 g, $(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{NO}_3)_6$ se smíchá 4,5 ml HClO_4 a doplní na 100ml

Piraña

Smíchání H_2SO_4 a 30 % H_2O_2 v poměru 3:1

30 % KOH

300 g KOH se doplní na 1 l milli-Q vodou.

100mM NaOH

0,4 g NaOH se doplní na 100 ml milli-Q vodou

100 mM Glukóza

0,0198 g glukózy monohydrátu je v mikrokumavce rozpuštěno v 1 ml 10mM NaOH

100 mM Fruktóza

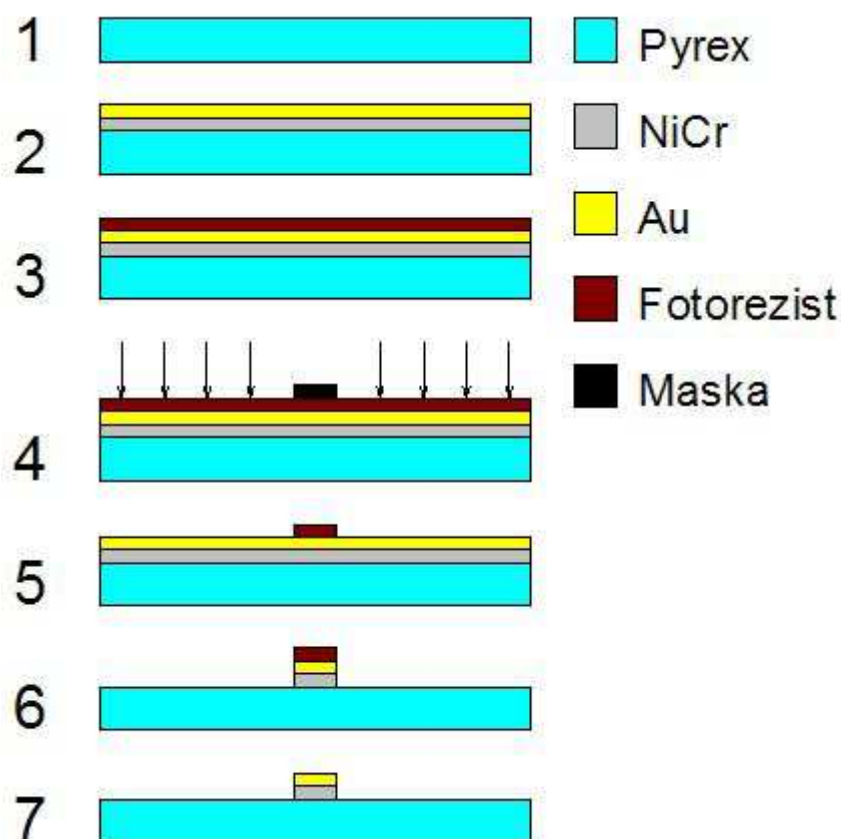
0,0180 g fruktózy je v mikrokumavce rozpuštěno v 1 ml 10mM NaOH

5.2 Výrobní procesy

Mikrofluidní čip se sestává ze spodního skleněného substrátu s integrovanými elektrodami a horní substrátu z PDMS s mikrokanály.

5.2.1 Výrobní procesy spodního substrátu ze skla s integrovanými elektrodami

Kroky výrobního procesu spodního substrátu ze skla s integrovanými elektrodami jsou znázorněny na obr. 10.



Obr. 10: Kroky výrobního procesu spodního substrátu ze skla s integrovanými elektrodami

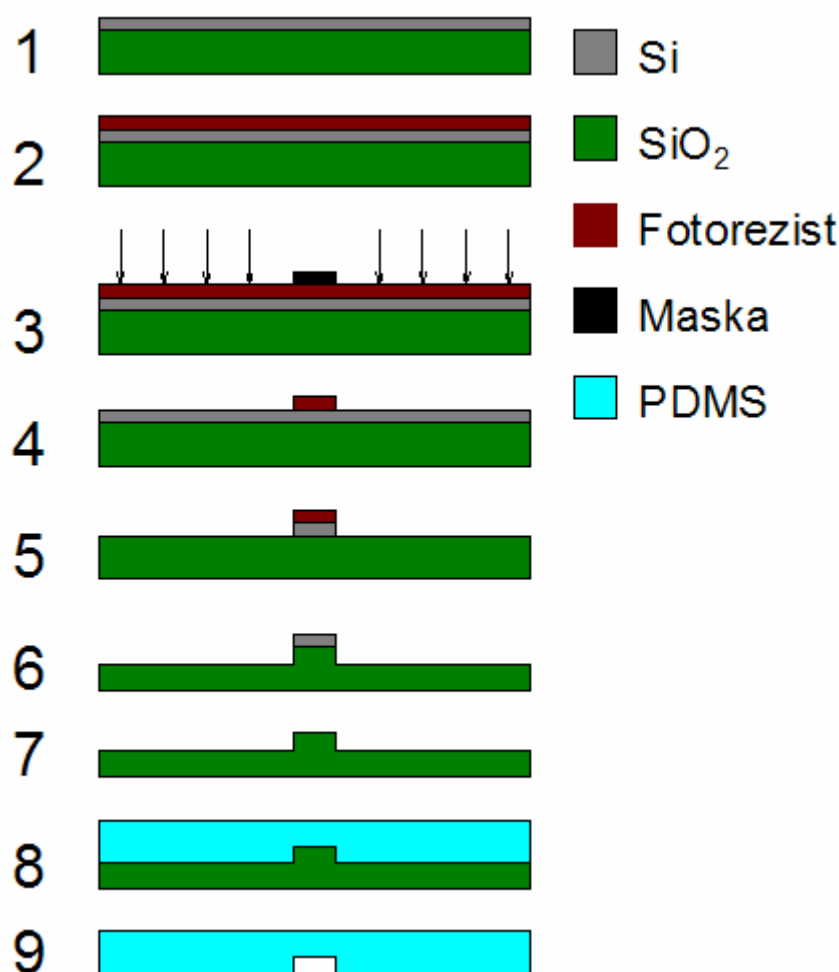
Spodní substrát je vyroben z pyrexového waferu (krok 1). Na tento substrát bylo napařeno 7 nm NiCr a 120 nm Au. Dále byl substrát žíhán ve vakuu při 300°C po dobu 10 minut (krok 2). Dále se pracovalo se světlocitlivým fotorezistem. Práce tedy probíhala pod žlutým světlem, aby nedošlo k znehodnocení fotorezistu před jeho vyvoláním. Na wafer byl pak umístěn na spincoater. Na střed waferu bylo pipetou nanášeno 4 ml pozitivního fotorezistu S1813. Pak wafer roztočen při 500 ot. za minut po dobu 3 s. A následně otáčky plynule přešly na 3500 ot. za minutu po dobu 35 s. Wafer s nanášeným fotorezistem byl pak 1 minutu vyhříván na hot-plate při 110 °C po dobu 1 minuty (krok 3). Po 3 minutách wafer dostatečně vychladne. Pak se wafer umístil do osvitové jednotky a sesouhlasila se na něm maska s motivem. Jako maska sloužila průhledná fólie s motivem vytištěným na spodní straně. Vakuem v osvitové jednotce se motiv těsně přitiskl na wafer. Následovala expozice světlem po dobu 110 s (krok 4). U fotorezistu vystaveného světlu z osvitové jednotky dojde k narušení polymerních vazeb. Wafer se vyvolal ve 100 % vývojce MF322 v petriho misce za stálého promíchávání po dobu 160 s. Následně byl wafer promícháván v 50 % vývojce MF 322 po dobu 30 s. Pak byl wafer ostříkán milli-Q vodou. Wafer byl vysušen kompresním vzduchem a vytvrzen na hot-plate při 110 °C po dobu 5 minut (krok 5). Wafer byl leptán v leptacím roztoku na zlato (Gold-Etchant, Sigma-Aldrich). Toto leptadlo se používá opakovaně a jeho leptací rychlost se tedy postupem času snižuje. K odleptání 120 nm Au došlo řádově během sekund. NiCr byl odleptán v leptadle na

NiCr. K odleptání 7 nm NiCr došlo také řádově během několika sekund (krok 6). Nakonec byl fotorezist odstraněn acetonem. Zbytky fotorezistu byly odstraněny namočením waferu do roztoku piraňa po dobu 5 minut (krok 7).

Wafer se nakonec nechal rozřezat pilou s diamantovým kotoučem na požadovaný tvar čipu.

5.2.2 Výrobní procesy horního substrátu z PDMS s mikrokanály

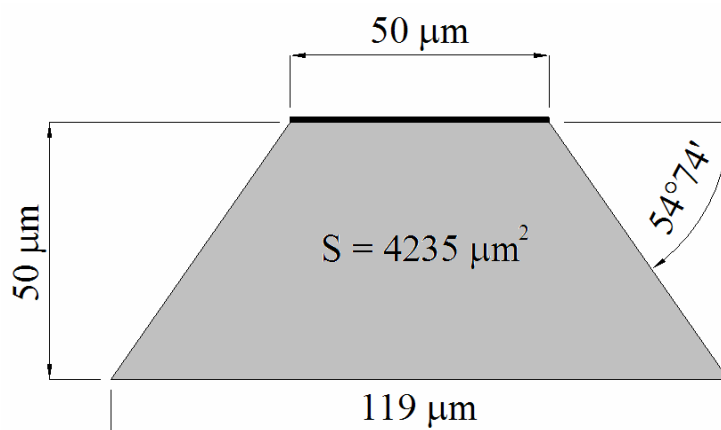
Kroky výrobního procesu horního substrátu z PDMS s mikrokanály jsou znázorněny na obr. 11.



Obr. 11: Kroky výrobního procesu horního substrátu z PDMS s mikrokanály

Horní substrát je vyroben z PDMS. To se odlévá z replikační masky. Výchozím materiálem pro replikační masku byl 500 μm tlustý křemíkový wafer s 1 μm tlustou vrstvou oxidu křemíku (krok 1). Kroky 2 až 4 stejným výrobním operacím popsaných výše. Získal se tedy wafer s vyvolaným a vytvrzeným fotorezistem (krok 4). Wafer byl následně leptán v BOE po dobu 12 minut. Došlo tak k odleptání celé SiO₂ vrstvy nechráněné fotorezistem (krok 5). Fotorezist byl následně odstraněn acetonem. Zbytky fotorezistu byly odstraněny namočením waferu do roztoku piraňa po dobu 5 minut. Wafer

byl následně ostříkán milli-Q vodou. Wafer byl dále uchycen v teflonovém držáku a ponořen do 30 % roztoku KOH s teplotou 80 °C. Wafer v držáku byl elektromotorem otáčen rychlostí 40 ot. za minutu. Za těchto podmínek je leptací rychlost 1,1 μm za minutu. Po 45 minutách tedy došlo k odleptání 50 μm tloušťky Si. Profil vyleptané vrstvy je znázorněn na obr. 13 (krok 6). Následně bylo odleptáno zbylé SiO₂, znovu v BOE po dobu 12 minut. Tím byla replikační maska dokončena (krok 7). PDMS se skládá z polymeru a tužidla. Tyto látky byly rozmíchány v poměru 10:1 v celkovém množství 30 g. Po rozmíchání vznikly ve směsi bublinky, které byly odstraněny ve vakuové mezikomoře při tlaku 0,2 bar. Každých 10 minut bylo prováděno zavzdušnění mezikomory dusíkem pro popraskání bublinek plynu které se pohybují k povrchu směsi. Tím je proces odplynování PDMS urychlen a zároveň je tak zabráněno přetečení PDMS přes okraje kádinky. Po odplynění PDMS byla replikační maska oblepena lepicí páskou a zalita PDMS (krok 8). PDMS tuhne při pokojové teplotě přibližně 36 hodin, při vyšších teplotách kratší dobu. Např. při 80°C PDMS tuhne 4 hodiny. Po ztuhnutí se PDMS s replikační masky odstraní (krok 9). Nakonec se PDMS vyřízne na požadovaný tvar a vyříznou nebo proděraví rezervoáry. Tvary mikrokanálů odpovídají profilu vyleptaného na replikační masce, viz. obr. 12. Replikační maska pro PDMS je vyfocena na obr. 13.



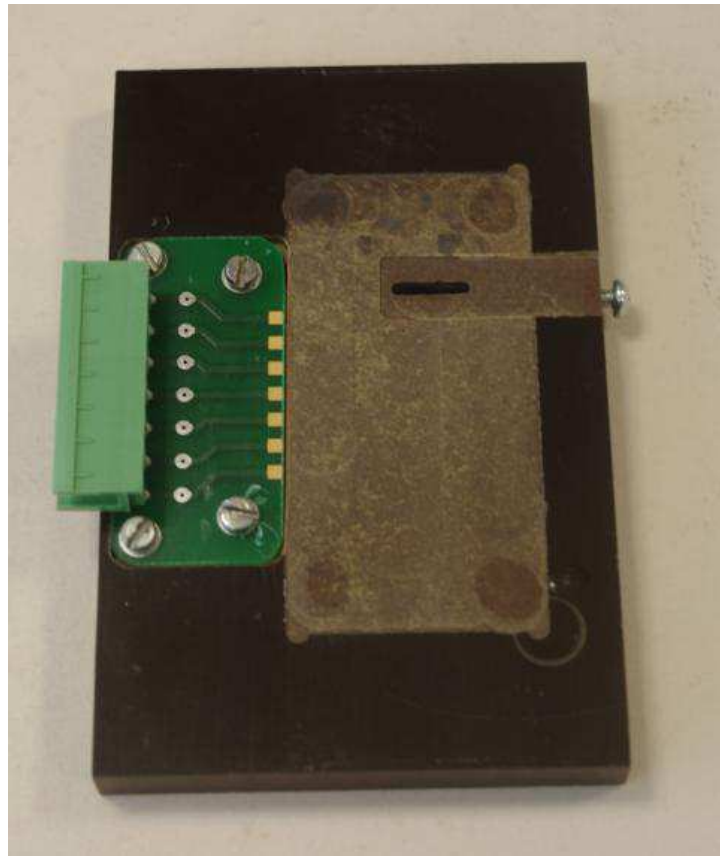
Obr. 12: Profil vyleptané vrstvy Si



Obr. 13: Replikační maska pro PDMS

5.3 Podpůrná zařízení

Pro amperometrická měření byl použit přístroj AutoLab s počítačovým programem pro měření NOVA 1.9.16. Pro bezkontaktní konduktometrické měření byl použit RLC metr Agilent E4980A. Na zakázku byl vyroben zdroj dvou nezávislých napětí do 5000 V, schopný měřit procházející proud do 450 μ A. Pro vyrobené mikrofluidní čipy byl pracovníky školy vyroben přípravek pro uchycení a nakontaktování čipu. Přípravek byl vyroben z kartitu. Měl vyfrézovanou plochu pro umístění mikrofluidního čipu. Čip se do toho přípravku uchycoval oboustrannou lepicí páskou. V případě potřeby odstranění čipu se lepicí vrstva oboustranné lepicí pásky roztavila horkovzdušnou pistolí. Na přípravku byl také ze spodu vyfrézován prostor pro umístění a přichycení optického filtru pro možnou optickou detekci. Na přípravku je dále deska plošných spojů se zlatými kontaktovacími ploškami a vývodou součástkou TBW-5-7P/GN. Kontaktování mezi mikrofluidním čipem a přípravkem bylo provedeno pomocí vodivého lepidla Epo-Tek H31D a měděného drátku. Vodivé lepidlo by se mělo vytvrzovat při 150 °C po dobu 1 hodiny. Jelikož vývodová součástka dlouhodobě vydrží teploty pouze do 105 °C, bylo vytvrzování prováděno při 100 °C po dobu 1,5 hodiny. Alternativou pro tento způsob kontaktování by mohlo být mikrokontaktování zlatým drátkem a zalití kontaktů nevodivým lepidlem. Na Obr. 14 je vyfocen přípravek pro kontaktování čipu.

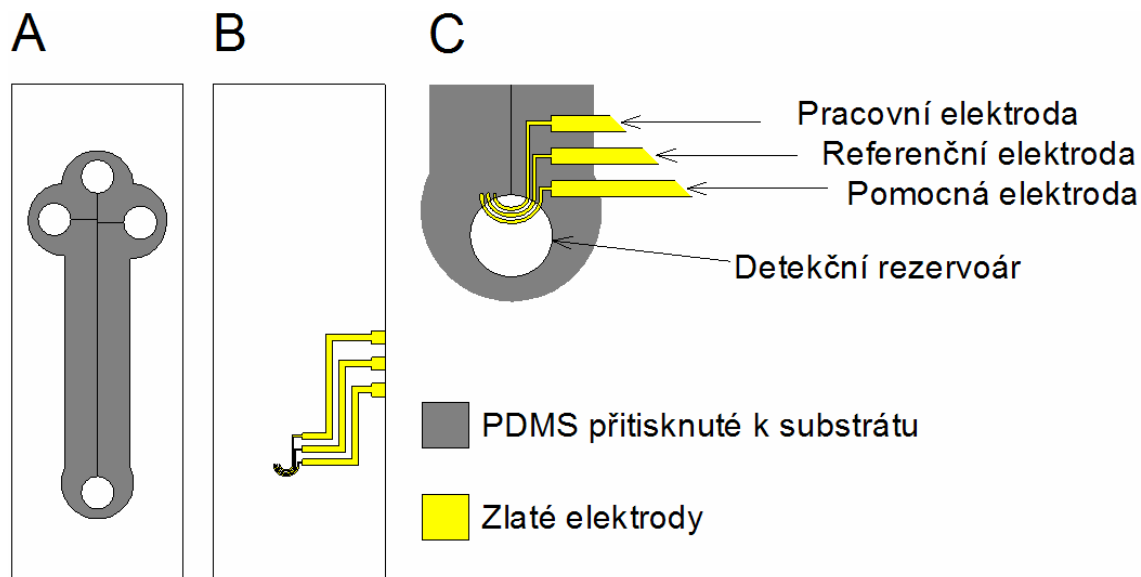


Obr. 14: Přípravek pro kontaktování čipu

5.4 Analytické experimenty

5.4.1 Amperometrická detekce

Bylo zvoleno základní uspořádání mikrofluidního čipu, principem odpovídající uspořádání čipu z obr. 6. Sestavení čipu pro amperometrickou detekci je uvedeno na obr. 15.

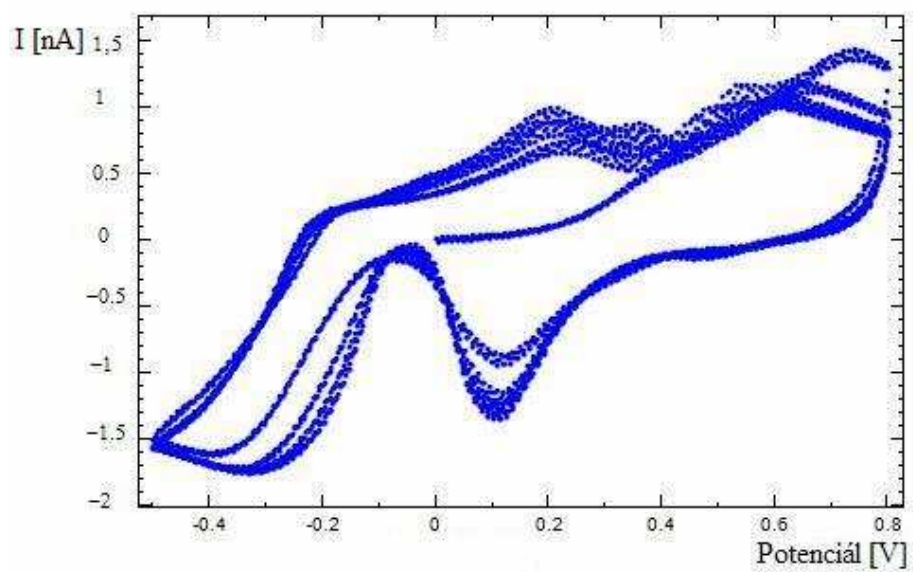


Obr. 15: Uspořádání mikrofluidního čipu. Pro amperometrickou detekci; A – horní substrát (PDMS); B – dolní substrát (Pyrex s integrovanými elektrodami); C – detail detekční oblasti

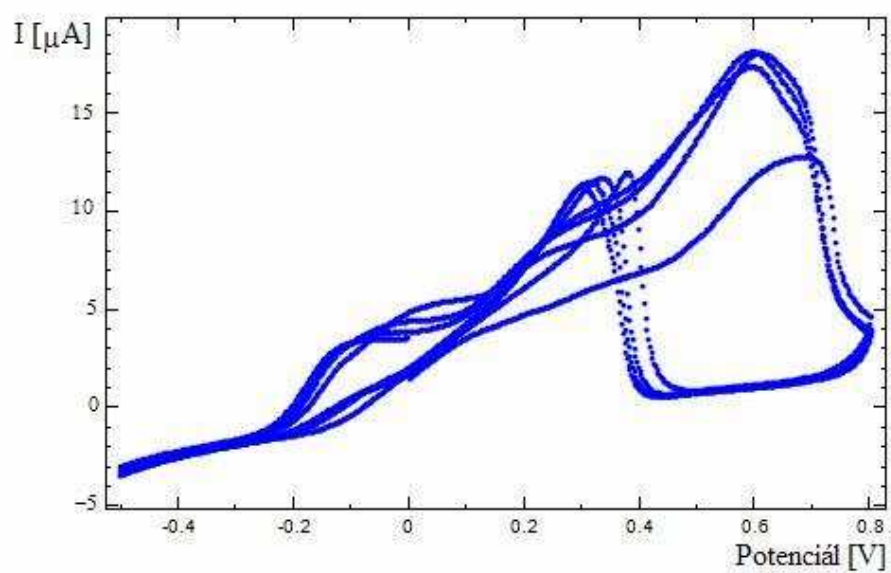
Elektrody byly 0,2 mm široké a vzdáleny od sebe byly rovněž 0,2 mm. Délka separačního mikrokanálu byla 4 cm a délka injekční intersekce 0,5 mm.

Jako analyty pro měření byly zvoleny dva monosacharidy, a to glukóza a fruktóza. Pufrem byl 10mM NaOH. Nejdříve byly zjištěny potenciály redoxních reakcí obou cukrů pomocí cyklické voltametrie. Byly provedeny 4 cykly v rozsahu potenciálu od -0,5 V do 0,8 V s krokovým potenciálem 0,00244 V a rychlostí skenu 0,1 V·s⁻¹. Cyklické voltamogramy samotného pufru, 5mM glukózy v pufru a 5mM fruktózy v pufru jsou uvedeny na obr. 16-18.

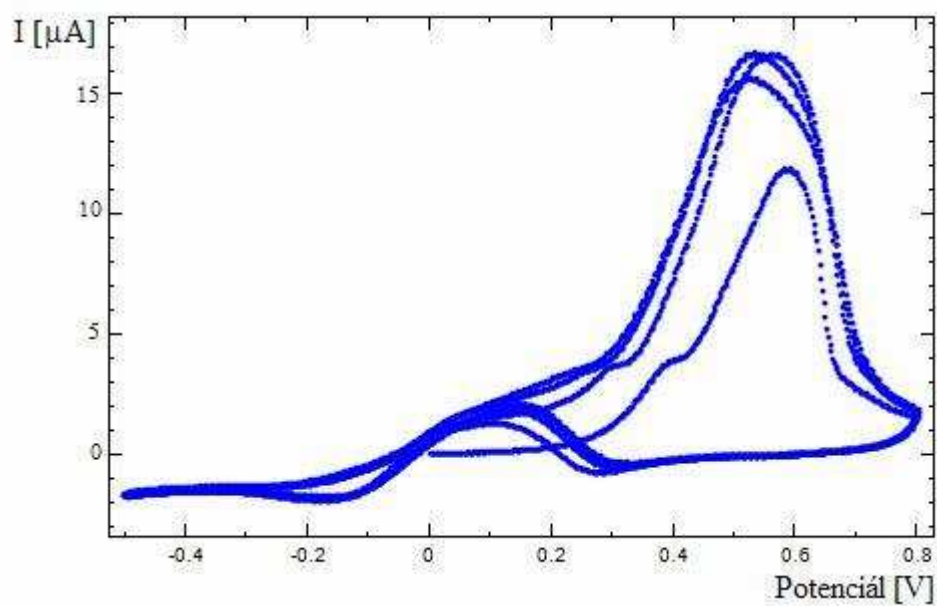
Na základě těchto výsledků byl jako vhodný potenciál, kdy u obou analytů dochází k redoxní reakci, zvolen potenciál při 0,4 V. Analyzovaný roztok byl v koncentracích 10 mM NaOH, 50 mM glukóza a 50 mM fruktóza. Pomocí podtlakového byl vyplněn mikrokanál mezi detekční rezervoárem a rezervoárem pro pufr. Analyt rozpuštěný v pufru byl potlakem nasán z rezervoáru pro vzorek přes injekční intersekci do odpadního rezervoáru. Pomocí externích platinových elektrod bylo přiloženo napětí 1000 V mezi rezervoár pro pufr (anoda) a detekční rezervoár (katoda). Analyty z injekční intersekce se začaly pohybovat směrem ke katodě. Výsledek detekce je uveden na obr. 19.



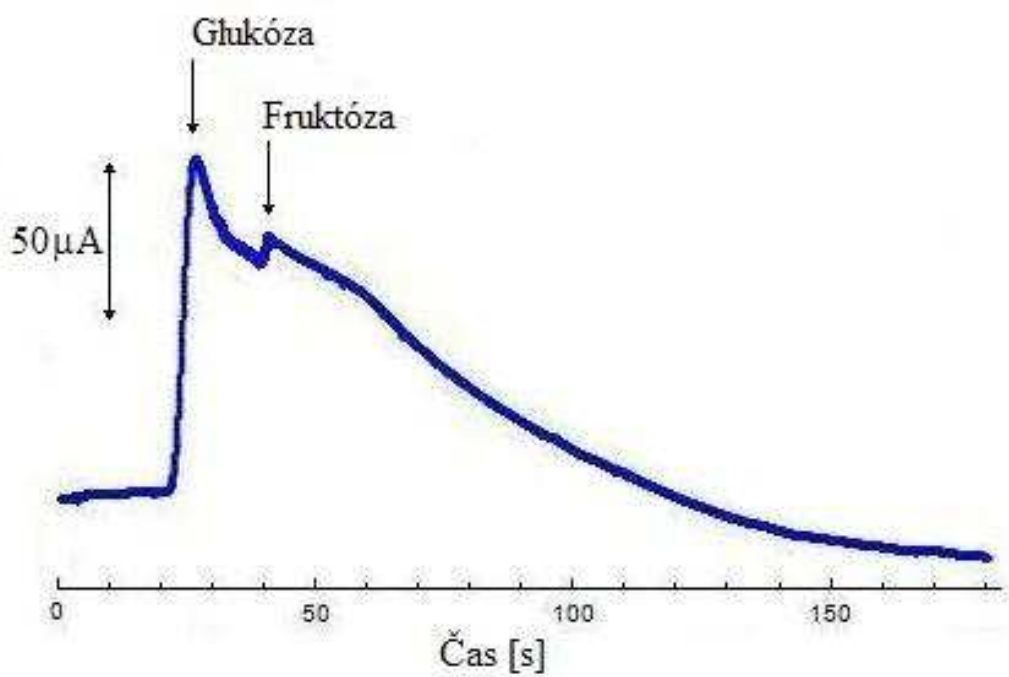
Obr. 16: Cyklický voltamogram 10mM NaOH



Obr. 17: Cyklický voltamogram 10mM NaOH + 5 mM glukózy



Obr. 18: Cyklický voltamogram 10mM NaOH + 5 mM fruktózy



Obr. 19: Separace 50mM glukózy a 50mM fruktózy v 10 mM NaOH

5.4.2 Diskuze výsledků

Hydroxidové skupin sacharidů mají nízkou disociační konstantu. Disociují pouze v prostředí s pH větší než 12. U 10 mM NaOH bylo naměřeno $\text{pH} = 12,16$. Pak získávají sacharidy záporný náboj. Přesto jsou unášeny EOF a pohybují se směrem ke katodě. Na výsledném obrázku nejsou vidět píky ale vlny. To je pravděpodobně způsobeno tím, že v detekčním rezervoáru již nejsou analyty unášeny EOF a difúzním pohybem analytů ve velkém prostoru rezervoáru. Analyty byly identifikovány na základě pomocných měření, kdy glukóza migrovala přibližně 20 vteřin fruktóza přibližně 40 vteřin.

Celý systém bylo nutno nastavit tak aby nedocházelo k vysychání nebo zavzdušňování mikrokanálů. Proto byl zvolen pufr s nižší koncentrací (10 mM NaOH). Při 1000 V mezi rezervoárem pro pufr a detekčním rezervoárem, mikrokanálem protékalo 16 μA . Zlaté integrované elektrody byly umístěny na konci mikrokanálu ve volném prostoru rezervoáru, neboť na nich dochází k elektrolýze. V případě umístění elektrod do malého prostoru mikrokanálu by došlo k zavzdušnění mikrokanálu a tím přerušení analýzy.

Působením elektrolýzy postupně dojde ke zničení elektrod z používaného materiálu Au-NiCr. Přesto při vhodných podmínkách analýzy lze na jednom čipu provést desítky měření.

6 ZÁVĚR

Tato práce se zabývá konstrukcí a otestováním mikrofluidního čipu pro detekci látek. Jsou zde shrnuty základní poznatky z kapilární elektroforézy. Pozornost je věnována možnostem detekce DNA a proteinů. Kapilární elektroforéza se provádí v dlouhých kapilárách, ale je ji možno miniaturizovat na čip. Moderním materiálem pro výrobu těchto čipů je PDMS. Práce shrnuje možné modifikace tohoto materiálu a představuje základní možnosti detekce na mikrofluidním čipu. V praktické části byl vyroben mikrofluidní čip v kombinaci materiálů skla a PDMS. Tento čip byl následně otestován pro analýzu glukózy a fruktózy. Byla tak vytvořena funkční metodika, na které lze stavět a toto zařízení dále zdokonalovat.

LITERATURA

- [1] KLOUDA Pavel. *Moderní analytické metody*. 2003, Ostrava: Klouda Pavel, p. 132. ISBN 80-86369-07-2
- [2] Beckman Coulter: Introduction to capillary electrophoresis
- [3] KŘÍŽEK T. a kol. Fyzikální gely v kapilární gelové elektroforéze a jejich uplatnění v analýze bílkovin. *Chemické listy*, 2009, vol. 103, p. 130-135
- [4] STREGE M. LAGU A. *Capillary Electrophoresis of Proteins and Peptides. Methods in molecular biology*. Vol. 276: Humana Press
- [5] MITCHELSON K., CHENG. J. *Capillary Electrophoresis of Nucleic Acids; Volume I Introduction to the Capillary Electrophoresis of Nucleic Acids. Methods in Molecular Biology*. Vol. 162: Humana press.
- [6] MITCHELSON K., CHENG J. *Capillary Electrophoresis of Nucleic Acids; Volume II Practical Applications of Capillary Electrophoresis. Methods in Molecular Biology*. Vol. 163: Humana press.
- [7] ESSÖ, C. *Modifying Polydimethylsiloxane (PDMS) surfaces*. 2007, Mälardalen University: Uppsala.
- [8] ZHOU Jinwen, ELLIS Vera Amanda, VOELCKER Hans Nicolas. Recent developments in PDMS surface modification for microfluidic device. *Electrophoresis*, 2010, vol. 31, p. 2-16
- [9] COLTRO Tomazelli Kralos Wendell, LUNTE M. Susan, CARRILHO Emanuel. Comparison of the analytical performance of electrophoresis microchannels fabricated in PDMS, glass, and polyester-toner. *Electrophoresis*, 2008, vol. 29, p. 4928-4937
- [10] LAKOWICZ R. Joseph. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 2006, 3. vydání : Springer, p. 954. ISBN 978-0-387-46312-4
- [11] Invitrogen: SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain. 2006.
- [12] HENRY S. Charles. *Microchip Capillary Electrophoresis : Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology*. Vol. 339. ISBN 978-1-58829-293-3
- [13] O'SHEA J. Thomas, LUNTE M. Susan. Capillary Electrophoresis/Electrochemistry. *Current Separations*, 1995, vol. 14, no. 1, p. 18-23.
- [14] ENGSTROM-SILVERMAN E. Charlotte, EWING G. Andrew. Copper wire amperometric detector for capillary electrophoresis. *Journal of Microcolumn Separations*. 1991, vol. 3, no. 2, p. 141-145.
- [15] VANDAVEER IV R. Walter a kol. Recent developments in electrochemical detection for microchip capillary electrophoresis. *Electrophoresis*. 2004, vol. 25, p. 3528-3549
- [16] CHEN Rongsheng a kol. Analysis of inorganic and small organic ions by CE

with amperometric detection. *Electrophoresis*. 2007, vol. 28, p. 3347-3361

- [17] GONG, X., Applications of Capillary Electrophoresis with Contactless Conductivity Detection, in Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät. 2008, Universität Basel: Basel.
- [18] LI H. C. Paul. *Microfluidic Lab-on-a-Chip for Chemical and Biological Analysis and Discovery. Chromatographic Science Series*. 2005, p. 528. ISBN 1574445723

SEZNAM SYMBOLŮ, VELIČIN A ZKRATEK

| | |
|-----------------|---|
| bp | Páru bází |
| Da | Dalton |
| pH | Záporně vzatý dekadický logaritmus aktivity oxoniových kationů |
| pI | Izoelektrický bod |
| pK _a | Disociační konstanta kyselin |
| | |
| BOE | Buffered oxide etch, Pomalé oxidační leptadlo |
| CE | Capillary electrophoresis, Kapilární elektroforéza |
| CGE | Capillary gel electrophoresis, Kapilární gelová elektroforéza |
| CIEF | Capillary isoelectric focusing, Kapilární izoelektrická fokuzace |
| CITP | Capillary isotachopheresis, Kapilární izotachoforéza |
| CVD | Chemical vapour deposition, Chemická depozice z plynné fáze |
| CZE | Capillary zone electrophoresis, Kapilární zónová elektroforéza |
| DNA | Deoxyribonucleic acid, Deoxyribonukleová kyselina |
| EDTA | Ethylenediaminetetraacetic acid, Kyselinu ethylendiamintetraoctová |
| EOF | Electroosmotic flow, Elektroosmotický tok |
| IR | Infrared radiation, Infračervené záření |
| LBL | Layer by layer, Vrstva za vrstvou |
| MECC | Micellar electrokinetic capillary chromatography, Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie |
| PAD | Pulsed amperometric detection, Pulsní amperometrická detekce |
| PAGE | Polyacrylamid gel electrophoresis, Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu |
| PDMS | Polydimethylsiloxane, Polydimethylsiloxan |
| PEM | Polyelectrolyte multilayer, Polyelektrolytová vícevrstva |
| PMMA | Poly(methylmethacrylate), Poly(methylmethacrylát) |
| SDS | Sodium dodecyl sulphate, Dodecylsírán sodný |
| VIS | Visible, Viditelné záření |
| WCA | Water contact angle, Kontaktní úhel vody |