

Nghiên cứu thiết kế chế tạo chip vi lưu ly tâm kết hợp điện cực in lưới ứng dụng trong cảm biến sinh học điện hóa

Design and Fabrication of Centrifugal Microfluidic Chip Integrated with Screen-Printed Electrode for Electrochemical Biosensor Application

Đỗ Thị Ngọc Trâm^{1,*}, Yoshiakia Ukita², Trương Thị Ngọc Liên¹

¹Trường Đại học Bách khoa Hà Nội – Số 1, Đại Cồ Việt, Hai Bà Trưng, Hà Nội

²Trường Đại học Yamanashi, Takeda, Kofu, Yamanashi, 400-8510 Nhật Bản

Đến Tòa soạn: 01-3-2018; chấp nhận đăng: 28-9-2018

Tóm tắt

Trong nghiên cứu này, chip vi lưu ly tâm (CMF) sử dụng vật liệu PDMS được nghiên cứu thiết kế và chế tạo kết hợp với điện cực của cảm biến nhằm giảm lượng tiêu tốn hóa chất trong quá trình chế tạo và khảo sát hoạt động cảm biến. Kết quả cho thấy, CMF loại xi phông kết hợp với điện cực đã làm giảm lượng hóa chất xuống 20 lần so với phương pháp thông thường. Hơn nữa, việc kết hợp đồng thời bốn CMF chip trên cùng một đĩa tròn được gắn với máy quay ly tâm giúp nâng cao hiệu suất chế tạo cảm biến. Khảo sát hoạt động của cảm biến xác định kháng nguyên PSA bằng phương pháp đo phổ tổng trở điện hóa cho thấy độ lặp lại của cảm biến cao (sai số < 5%), giới hạn phát hiện thấp (0,12 ng/mL) hoàn toàn đáp ứng chẩn đoán bệnh sớm.

Từ khóa: chip vi lưu ly tâm, điện cực in lưới, cảm biến miễn dịch điện hóa.

Abstract

In this work, the centrifugal microfluidic chip (CMF) was designed and fabrication to integrate onto transducer's sensor in order to obtain minimization of reagent consumption used in sensor fabrication and to establish the automation process for bioelements immobilization. The results showed that the integrated centrifugal microfluidic chip (siphon type) with electrode can reduce 20 times of the chemical reagent consumption compared to dropping method in the sensor fabrication process. Furthermore, the integration of four chip simultaneously on the circular disk mounted on centrifugal system can improve the sensor fabrication efficiency. Experimental result of the fabricated sensor showed its high reproducibility (error lower than 5%) and the detection limit is 0.12 ng/mL which is appropriate for early diagnosis.

Keywords: Centrifugal microfluidic chip, Screen-printed electrode, Impedimetric immunosensor.

1. Giới thiệu

Công nghệ vi lưu là một lĩnh vực khoa học cho phép thiết lập và kiểm soát dòng chất lỏng cỡ microlít (10^{-6}) đến picolít (10^{-12}) trong các kênh dẫn có kích thước từ hàng chục đến hàng trăm micromét. Công nghệ này được sử dụng trong nhiều lĩnh vực như vật lý, hoá học, sinh hóa học và công nghệ nano để thiết kế các hệ thống trong đó lượng chất lỏng sử dụng là thấp và khả năng tích hợp nhiều kênh dẫn trên cùng một chip [1-4]. Trong cảm biến sinh học, chip vi lưu thường được kết hợp để điều khiển dòng dung dịch vào buồng phản ứng thông qua hệ thống vi bơm nối với đường ống dẫn và van. Điều này dẫn tới việc tiêu tốn một lượng nguyên liệu đáng kể trên hệ thống ống dẫn này [5]. Để cải thiện khả năng phân tích thông qua giảm lượng hóa chất tiêu hao, giảm thời gian chế tạo và tăng độ lặp lại của cảm

biến, chúng tôi đã phát triển chip vi lưu quay ly tâm kết hợp với điện cực cảm biến. Chip vi lưu ly tâm có nhiều ưu điểm vượt trội hơn so với chip vi lưu thông thường như: i) Lực ly tâm tác dụng trực tiếp lên dòng chất lỏng, không cần sử dụng bơm xi lanh, vì vậy có thể loại bỏ hệ thống đường dẫn phức tạp; ii) Có thể thực hiện trên các máy quay ly tâm cỡ nhỏ sẵn có trong nhiều phòng thí nghiệm, hệ thiết bị có giá thành thấp; iii) Lực ly tâm lớn giúp ngăn cản sự hình thành bóng khí trong buồng phản ứng, đây là vấn đề hay gặp phải trong các hệ vi lưu sử dụng vi bơm thông thường. Thêm vào đó, sử dụng lực ly tâm để “bơm” chất lỏng cho phép thực hiện đồng thời nhiều mẫu trên cùng một động cơ quay ly tâm mà không làm tăng mức độ phức tạp của hệ.

Trong nội dung bài báo này, chúng tôi nghiên cứu thiết kế chip vi lưu ly tâm kiểu cấu trúc van xi phông sử dụng vật liệu Polydimethylsiloxane (PDMS). Chip vi lưu sau khi chế tạo được kết hợp với điện cực thương mại của hãng DropSens và máy quay ly tâm mini nhằm thực hiện các bước trong quy trình

* Địa chỉ liên hệ: Tel.: (+84) 902.158.851
Email: tram.dothingoc@hust.edu.vn

chế tạo cảm biến xác định kháng nguyên PSA thông qua tương tác đặc hiệu của nó với kháng thể đơn dòng được cố định lên bề mặt điện cực cảm biến bằng màng đơn lớp tự lắp ghép (SAM).

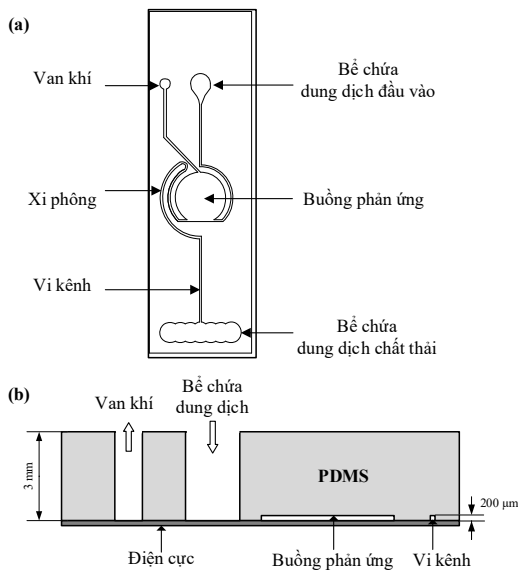
2. Thực nghiệm

2.1 Hóa chất

Chất cảm quang âm (SU8-2100) và chất hiện hình SU-8 do hãng Micro Chem sản xuất. Hóa chất Trichloro (1H, 1H, 2H, 2H-perfluorooctyl) silane, Polydimethylsiloxane (PDMS), Axit 16-mercaptohexadecanoic (MHDA), 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodimide (EDC), Ester N-hydroxysuccinimide (NHS), Tween 20, Fluorescein được cung cấp bởi hãng Sigma Aldrich. Kháng thể đơn dòng và kháng nguyên PSA của hãng Aviva Systems Biology (Mỹ). Dung dịch đệm muối photphat PBS (pH 7,4 bao gồm NaCl 8,00 g/L, KCl 0,20 g/L, Na₂HPO₄ 1,38 g/L và KH₂PO₄ 0,2 g/L), Ethanolamine, Ethanol, K₃[Fe(CN)₆] và K₄[Fe(CN)₆] do hãng Merck sản xuất.

2.2 Thiết bị và điện cực

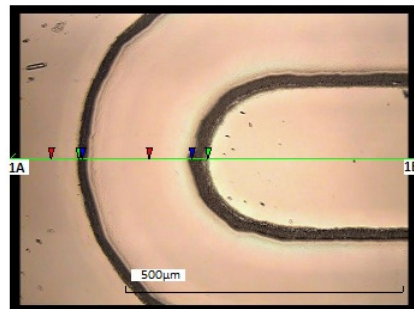
Thiết bị sử dụng trong nghiên cứu bao gồm hệ quay ly tâm của hãng Swing Man (ATT-101) có tốc độ quay tối đa là 2000 vòng/phút và hệ đo phổ tổng trở Vertex Ivium (Ivium Technologies BV, Hà Lan) được sử dụng trong phép đo trở kháng (có dải tần số hoạt động từ 50 mHz đến 100 kHz). Điện cực điện hóa thương mại của hãng DropSens (SPAuE) có cấu trúc dạng ba điện cực được tích hợp trên đế nhựa. Cấu trúc điện cực bao gồm điện cực làm việc (màng vàng), điện cực đối (mực in các bon) và điện cực so sánh (mực in Ag/AgCl). Diện tích của điện cực làm việc là 12,56 mm².



Hình 1. Cấu trúc thiết kế của chip vi lưu.

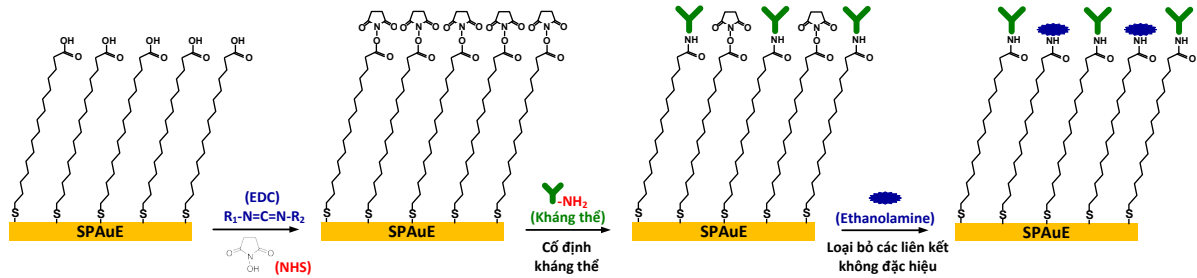
2.3 Chế tạo chip vi lưu

Chip vi lưu ly tâm có cấu trúc kênh dẫn như trong hình 1 được tạo bởi vật liệu PDMS bằng phương pháp đúc khuôn. Bề dày của chip vi lưu là 3 mm, độ sâu và bề rộng của kênh dẫn là 200 μm, thể tích buồng phản ứng là 4 μL. Trong nghiên cứu này, chúng tôi thiết kế chip vi lưu có cấu trúc gồm một đầu dung dịch vào (inlet) và một đầu dung dịch ra (outlet) được nối với buồng phản ứng bởi kênh dẫn vi lưu và van xi phông. Thiết kế này giúp cho dung dịch được lưu trữ lại trong buồng phản ứng (tương ứng với thời gian ủ mẫu của từng bước). Khi thể tích dung dịch đưa vào vượt quá thể tích của buồng phản ứng thì lượng dung dịch trong buồng phản ứng sẽ bị đẩy ra ngoài (tương ứng với quá trình rửa buồng phản ứng). Ngoài ra, trên mỗi chip còn thiết kế một van khí nối giữa buồng phản ứng với không khí bên ngoài giúp cân bằng áp suất trong và ngoài buồng làm cho dung dịch dễ dàng vận chuyển từ inlet vào buồng phản ứng.



Hình 2. Ảnh hiển vi quang học của vi kênh với độ rộng cỡ khoảng 200 μm.

Chip vi lưu sau khi thiết kế được chế tạo theo phương pháp quang khắc. Phiến Silic 4 inch được quay phủ lớp chất cảm quang âm (SU8-2100) với bề dày 200 μm và ủ sơ bộ tại nhiệt độ 95°C trong 60 phút. Tiếp theo, hình ảnh chip vi lưu trên mask được chuyển lên đế bằng cách chiếu tia cực tím với công suất 100 W trong 20 giây. Ủ đóng rắn chất cảm quang tại nhiệt độ 95°C trong 20 phút, hiện hình trong dung dịch SU-8 và hoàn thiện cấu trúc khuôn đúc. Monomer PDMS được trộn với chất xúc tác theo tỷ lệ 10:1 và đổ lên khuôn đúc với độ dày là 3 mm. Tiến hành ủ PDMS tại 75°C trong 90 phút và tách cấu trúc chip vi lưu khỏi khuôn. Sử dụng đục lỗ đường kính 2 mm đục thông qua chiều dày của khối PDMS để tạo bể chứa dung dịch hóa chất phản ứng (inlet) và bể chứa dung dịch thải (outlet). Các vị trí thông khí được đục lỗ bằng đầu kim loại 18 G. Chip vi lưu PDMS sau khi đục lỗ được làm sạch bằng cách rung siêu âm trong hỗn hợp dung dịch ethanol và nước, sẵn sàng cho bước kết hợp với điện cực cảm biến.



Hình 3. Quy trình công nghệ cố định kháng thể đơn dòng PSA lên bề mặt điện cực cảm biến thông qua nhóm chức carboxyl của MHDA.

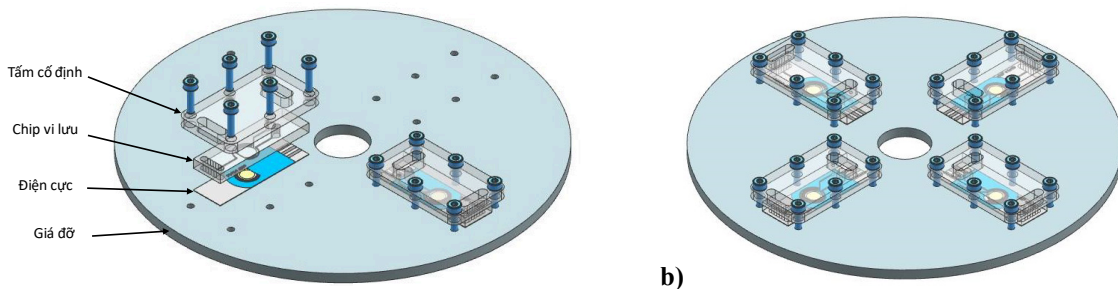
2.4 Cố định kháng thể đơn dòng

Trong cảm biến miễn dịch điện hóa, quá trình cố định kháng thể lên bề mặt điện cực cảm biến là yếu tố quyết định cho việc chế tạo thành công cảm biến. Trong nghiên cứu này, kháng thể đơn dòng PSA được cố định lên bề mặt điện cực cảm biến thông qua nhóm chức carboxyl của màng đơn lớp tự lắp ghép (SAM-Self assembled monolayer) của MHDA [7,8]. Hóa chất trong mỗi bước chế tạo cảm biến được đưa đến bề mặt điện cực thông qua hệ thống kênh dẫn của chip vi lưu kết hợp hệ quay ly tâm (CMF). Lượng dung dịch hóa chất trong mỗi bước chỉ tiêu tốn 5 μ L, ít hơn rất nhiều so với phương pháp nhỏ thông thường (100 μ L). Đầu tiên, 5 μ L dung dịch MHDA với nồng độ 1 mM được đưa vào buồng phản ứng và giữ trong 12 giờ tại nhiệt độ phòng. MHDA là axit hữu cơ chuỗi mạch dài 16 nguyên tử cacbon gồm một đầu là nhóm carboxyl (-COOH) và đầu còn lại là nhóm chức thiol (-SH). Trong thời gian này, nhóm thiol sẽ tương tác với màng vàng của điện cực hình thành lên màng SAM với nhóm chức -COOH. Tiếp theo, nước đề ion được sử dụng để loại bỏ MHDA không liên kết hoặc liên kết yếu với bề mặt điện cực. Bước rửa sử dụng 10 μ L dung dịch và lặp lại 5 lần. Sau đó, 5 μ L của hỗn hợp dung dịch chứa NHS 0,2 M và EDC 0,1 M được đưa vào buồng phản ứng và ủ trong 30 phút nhằm mục đích hoạt hóa nhóm

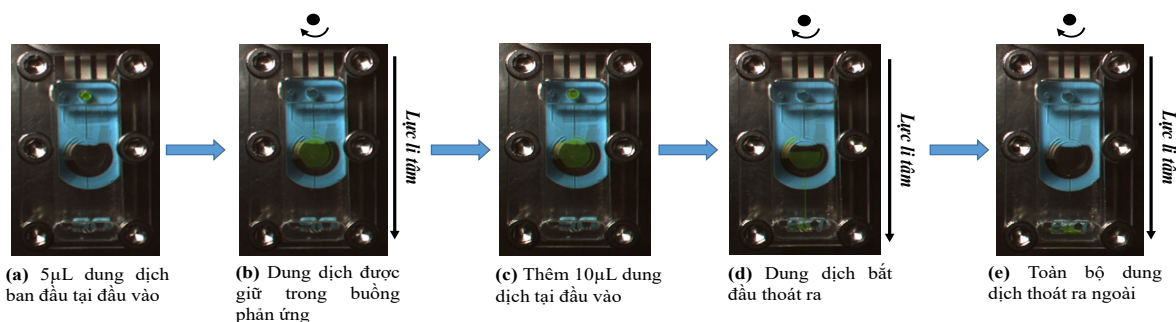
carboxyl của MHDA sang nhóm trung gian có khả năng phản ứng với nhóm amine (NH₂) của kháng thể. Lượng NHS và EDC dư thừa được loại bỏ qua bước rửa (lặp lại 5 lần) bằng dung dịch PBS 10 mM (pH 7,4). Cuối cùng, 5 μ L kháng thể đặc hiệu đơn dòng PSA được đưa vào buồng phản ứng và ủ trong một giờ tại nhiệt độ phòng. Tiến hành rửa bằng dung dịch PBS để loại bỏ kháng thể không liên kết hoặc liên kết yếu với bề mặt. 5 μ L dung dịch ethanolamine 100 mM được sử dụng để ngăn các liên kết không đặc hiệu xảy ra trên bề mặt. Sau bước rửa bằng PBS, điện cực sẵn sàng cho bước đo đặc phát hiện kháng nguyên PSA.

2.5 Phổ tổng trở điện hóa

Phép đo phổ tổng trở điện hóa được thực hiện tại nhiệt độ phòng trên hệ Vertex Ivium. Phép đo được thực hiện trong dải tần số từ 100 kHz đến 50 mHz với điện áp xoay chiều là 10 mV tại thế hở mạch OCP trong dung dịch đo gồm K₃[Fe(CN)₆] /K₄[Fe(CN)₆] 5 mM và 0,1 M KCl. Phổ tổng trở được khớp theo mạch tương đương Randles qua đó xác định phần tử mạch R_{CT} (điện trở truyền điện tích) trước và sau khi cho điện cực cảm biến tiếp xúc với kháng nguyên PSA tại các nồng độ xác định. Để đánh giá độ lặp lại của cảm biến, chúng tôi tiến hành chế tạo và đo đạc trên bốn điện cực độc lập.



Hình 4. Bản thiết kế giá đỡ gắn với trục quay của máy ly tâm bao gồm a) Thứ tự lắp ghép chip vi lưu và điện cực; b) Vị trí bốn hệ chip vi lưu-điện cực được cố định đồng thời trên giá đỡ.



Hình 5. Hình ảnh dòng dung dịch vận chuyển từ đầu vào qua kênh dẫn vào buồng phản ứng và dung dịch thoát ra ngoài theo thời gian quay ly tâm với tốc độ 1200 vòng/phút.

Bảng 1. Bảng so sánh sự thay đổi điện trở truyền điện tích của điện cực SPAuE và điện cực cố định kháng thể Mab PSA (Mab PSA/SAM/SPAuE) của 4 mẫu điện cực riêng biệt (đánh số M1 → M4) sử dụng cùng quy trình chế tạo. Sai số % được xác định theo công thức độ lệch chuẩn cho 4 mẫu.

	M1	M2	M3	M4
SPAuE	46,13	48,57	52,22	47,59
Mab PSA/SAM/SPAuE	1481,23	1453,18	1547,51	1587,67
ΔR_{CT} (Ω)	1435,10	1404,61	1495,29	1540,08
Sai số (%)	2,35	4,57	1,77	4,63

3. Kết quả và thảo luận

3.1 Khảo sát quá trình vận chuyển dung dịch trong chip vi lưu ly tâm

Chip vi lưu được ghép với điện cực điện hóa sao cho vị trí của buồng phản ứng tương ứng với vùng điện cực làm việc. Cố định đồng thời bốn hệ chip vi lưu-điện cực trên giá đỡ hình tròn có đường kính 12 cm được vít cố định đồng trục với trục của máy quay ly tâm (hình 4). Để khảo sát chuyển động của dòng chảy trong chip vi lưu, chúng tôi sử dụng dung dịch thuốc màu nhạy quang fluorescein có nồng độ 1mM. 5 μ L dung dịch này được nhỏ vào bể chứa inlet của chip vi lưu. Hệ ly tâm được gia tốc với tốc độ ban đầu là 100 vòng/phút cho đến khi đạt được tốc độ quay 1200 vòng/phút trong vòng 60 giây. Sử dụng hệ thiết bị Stroboscope ghi nhận hình ảnh chuyển động của chất lỏng trong chip vi lưu ly tâm. Trên hình 5a trình bày hình ảnh trạng thái ban đầu khi 5 μ L dung dịch thuốc màu nhạy quang được nhỏ vào bể chứa inlet. Khi hệ ly tâm được gia tốc đến tốc độ quay 1200 vòng/phút, dưới tác dụng lực ly tâm dung dịch chuyển động theo kênh dẫn đến buồng phản ứng. Xi phông được nối thông với điểm thấp nhất của buồng phản ứng, lượng dung dịch trong buồng phản ứng và trong nhánh xi phông cùng dâng lên với độ cao như nhau như trình bày trên hình 5b. Cấu trúc của xi phông cho phép giữ lượng dung dịch trong buồng phản ứng tương ứng với thời gian lưu giữ cần thiết trong mỗi bước chế tạo cảm biến. Sau 60 giây, tắt máy quay ly tâm và thực hiện bước thêm 10 μ L dung dịch nhạy quang vào bể chứa dung dịch inlet (hình 5c). Tiếp tục gia tốc máy ly tâm đạt đến tốc độ 1200 vòng/phút. Dưới tác dụng của lực ly tâm, dung dịch

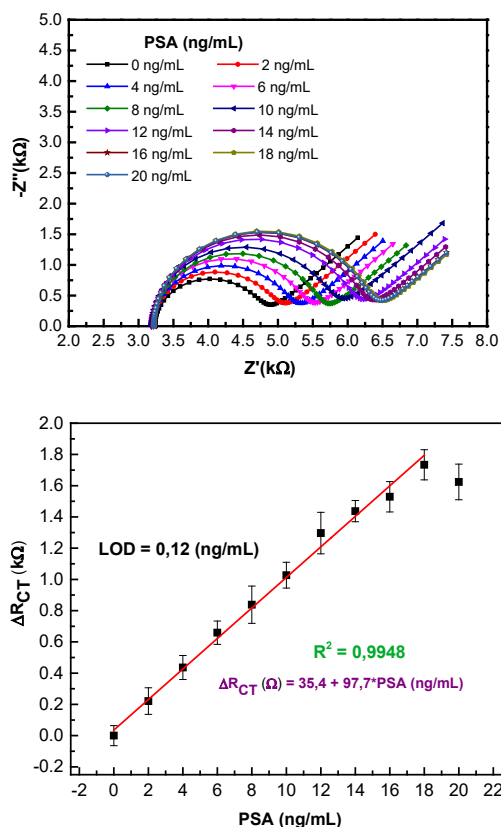
mới thêm vào này được vận chuyển đến buồng phản ứng và đẩy dung dịch trước đó trong buồng phản ứng ra ngoài (hình 5d). Nhờ cấu trúc của xi phông, toàn bộ dung dịch trong buồng phản ứng sẽ bị đẩy ra ngoài (xem hình 5e). Quá trình này tương ứng với bước rửa để loại bỏ dung dịch hóa chất ở bước công nghệ trước trong quy trình chế tạo cảm biến.

3.2 Khảo sát hoạt động của cảm biến

Hoạt động của cảm biến được khảo sát dựa trên phương pháp phổ tổng trở điện hóa. Nguyên lý cơ bản của phương pháp là dựa trên sự thay đổi trở kháng phức của hệ điện hóa khi xảy ra phản ứng miễn dịch đặc hiệu giữa kháng nguyên (chất cần phân tích) và kháng thể (cố định trên bề mặt điện cực của cảm biến). Khi kháng nguyên liên kết với kháng thể mỗi hiệu của chúng sẽ hình thành lên lớp màng điện môi ngăn cản quá trình truyền điện tích làm tăng giá trị điện trở truyền điện tích (R_{CT}). Phương pháp này đã được chúng tôi trình bày chi tiết trong các nghiên cứu trước [6,7].

Trên hình 6a trình bày đáp ứng phổ tổng trở EIS của cảm biến tại các nồng độ PSA khác nhau. Kết quả cho thấy đường kính của bán cung trong phổ EIS tăng khi nồng độ kháng nguyên PSA tăng. Khi khớp phổ EIS theo mạch tương đương Randles, chúng tôi xác định được giá trị R_{CT} . Trên hình 6b trình bày đường đặc trưng chuẩn thể hiện sự phụ thuộc của ΔR_{CT} (hiệu số giữa giá trị R_{CT} của cảm biến tại nồng độ kháng nguyên PSA xác định và giá trị R_{CT} của cảm biến khi chưa tiếp xúc với kháng nguyên PSA hay còn gọi là mẫu trắng). Giá trị R_{CT} tăng theo nồng độ kháng thể nằm trong khoảng từ 0 ng/mL đến 16 ng/mL. Tiến hành khớp tuyến tính trong dải nồng độ kháng nguyên từ 0 ng/mL đến 16 ng/mL, dựa vào giá trị độ

độc của đường đặc trưng và sai số của mẫu trắng xác định được giới hạn phát hiện LOD (Limit of Detection) của cảm biến là 0,12 ng/mL với diện tích của điện cực là 12,56 mm². Từ kết quả này cho thấy cảm biến đã chế tạo hoàn toàn đáp ứng yêu cầu phát hiện chỉ dấu sinh học kháng nguyên PSA trong vùng xám (từ 4 đến 10 ng/mL) trong chẩn đoán ung thư tiền liệt tuyến.



Hình 6. a) Đáp ứng phổ tổng trở của cảm biến tại các nồng độ kháng nguyên PSA từ 0 ng/mL đến 20 ng/mL (đường đo thực nghiệm được biểu diễn bằng các ký hiệu, đường nét liền biểu diễn đường cong khớp theo mạch tương đương Randles. b) Đường đặc trưng chuẩn của cảm biến miễn dịch điện hóa PSA. Giá trị tại mỗi điểm đo và sai số được lấy trung bình của 4 cảm biến chế tạo cùng lúc.

Độ lặp lại của cảm biến được đánh giá thông qua phần trăm sai số xác định theo công thức độ lệch chuẩn của bốn cảm biến riêng biệt chế tạo cùng lúc theo cùng một quy trình và được thể hiện dạng thanh sai số (error bar) trên hình 6b. Kết quả cho thấy sai số có giá trị nhỏ hơn 5% chứng tỏ cảm biến chế tạo có độ lặp lại cao. Hơn nữa, số liệu trên bảng 1 cũng cho thấy hiệu quả của việc sử dụng chip vi lưu quay ly tâm trong việc cải thiện đặc tính lặp lại của quy trình chế tạo cảm biến.

4. Kết luận

Nhóm nghiên cứu đã thành công trong việc thiết kế và chế tạo chip vi lưu ly tâm sử dụng vật liệu PDMS ứng dụng trong chế tạo cảm biến. Việc tối ưu trong thiết kế cấu trúc xi phông của chip vi lưu đảm bảo yêu cầu lưu trữ dung dịch trong buồng phản ứng trong buồng phản ứng ra ngoài sau bước rửa điện cực. theo yêu cầu trong mỗi bước biến tính bề mặt điện cực cũng như khả năng đẩy toàn bộ lượng dung dịch. Ngoài ra, chip vi lưu còn thể hiện tính ưu việt trong việc giảm lượng hóa chất tiêu hao và thời gian chế tạo cảm biến. Các cảm biến được tiến hành trong cùng một điều kiện thực nghiệm cho độ lặp lại cao với sai số dưới 5%. Kết quả nghiên cứu là tiền đề cho hướng nghiên cứu phát triển chip vi dòng cho phép tự động hóa các bước trong quy trình biến tính đối với cảm biến sinh học.

Lời cảm ơn

Công trình này được thực hiện với sự hỗ trợ về kinh phí của đề tài cấp trường mã số T2016-PC-214.

Tài liệu tham khảo

- [1] K. P. Valente, S. Khetani, A. R. Kolahchi, A. Nezhad, A. Suleman, M. Akbari, Microfluidic technologies for anticancer drug studies, *Drug Discov. Today*. 22 (2017) 1654-1670.
- [2] C. Rivet, H. Lee, A. Hirsch, S. Hamilton, H. Lu, Microfluidics for medical diagnostics and biosensors, *Chem. Eng. Sci.* 66 (2011) 1490-1507.
- [3] Y. J. Kim, J. E. Jones, H. Li, H. Yampara-Iquise, G. Zheng, C. A. Carson, M. Cooperstock, M. Sherman, Q. Yu, Three-dimensional (3-D) microfluidic-channel-based DNA biosensor for ultra-sensitive electrochemical detection, *J. Electroanal. Chem.* 702 (2013) 72-78.
- [4] Y. J. Yoon, K. H. H. Li, Y. Z. Low, J. Yoon, S. H. Ng, Microfluidics biosensor chip with integrated screen-printed electrodes for amperometric detection of nerve agent, *Sensors Actuators, B Chem.* 198 (2014) 233-238.
- [5] Mark, D., Haerberle, S., Roth, G., Von Stetten, F. & Zengerle, R, Microfluidic lab-on-a-chip platforms: Requirements, characteristics and applications, *Chem. Soc. Rev.* 39 (2010) 1153-1182.
- [6] T. T. N. Lien, Y. Takamura, E. Tamiya, M. C. Vestergaard, Modified screen printed electrode for development of a highly sensitive label-free impedimetric immunosensor to detect amyloid beta peptides, *Anal. Chim. Acta.* 892 (2015) 69-76.
- [7] T. T. N. Do, T. Van Phi, T. P. Nguy, P. Wagner, K. Eersels, M. C. Vestergaard, L. T. N. Truong, Anisotropic In Situ-Coated AuNPs on Screen-Printed Carbon Surface for Enhanced Prostate-Specific Antigen Impedimetric Aptasensor, *J. Electron. Mater.* 46 (2017) 3542-3552.

