

RAPORT STIINTIFIC SI TEHNIC

Aplicarea de tehnici laser pentru fabricarea de biosenzori pe baza de sisteme microfluidice de detecție in timp real (SOLE)

Etapa II: Realizarea tehnologiei de laborator pentru procesul de fabricare al laboratorului pe un cip ce permite implementarea procedurilor de detecție a ADN-ului de interes.

Denumire etapa: Etapa II/2015 intermediara cu activitățile:

1. *Fabricarea dispozitivului microfluidic: scrierea directa cu laserul a micro-canalelor.*
2. *Fabricarea si caracterizarea elementelor de încălzire integrate: Depunere prin PLD si RF-PLD de filme subțiri de nichel si carbura de siliciu.*
3. *Caracterizarea morfologica (Microscopie de Forța Atomica AFM si Microscopie Electronica cu Baleiaj SEM) si structurala (Difracție de raze X XRD, Spectrometrie de Masa a Ionilor Secundari SIMS) a filmelor subțiri de nichel si carbura de siliciu depuse prin PLD.*
4. *Proiectarea modelului experimental si optimizarea principalilor parametrii pentru reacțiile PCR si PCR in timp real ce va fi implementata in noul dispozitiv.*
5. *Proiectarea sistemului electro-optic pentru măsurarea fluorescenței din probele de ADN.*
6. *Diseminarea rezultatelor in reviste internaționale/naționale de specialitate si participarea la conferințe naționale si internaționale; respectarea dreptului de proprietate intelectuala.*
7. *Realizarea unei secțiuni dedicate proiectului SOLE in pagina web a grupului PPAM: ppam/inflpr.ro.*
8. *Integrarea tuturor elementelor pe aceeași platforma (elementele de încălzire si microcanalele) - primele studii folosind un substrat flexibil (PDMS).*
9. *Implementarea sistemului electro-optic in platforma microfluidica (primele teste, evaluarea alinierii optice si cuplării mecanice).*
10. *Evaluarea sensibilitatii metodei de amplificare cu dispozitivul microfluidic prin folosirea de probe biologice cu diferite concentrații de bacterii - primele teste.*

Valoarea alocata proiectului de la bugetul de stat pentru 2015: 366.471 lei.

Rezumat

Domeniul de cercetare al dispozitivelor microfluidice este intr-o continua dezvoltare si se bazează pe procese de fabricație alternative, inovative si cu costuri mici de producție precum si pe dezvoltarea unor aplicații noi in domeniul biotehnologiei.

In cadrul acestei etape de execuție a proiectului „Aplicarea de tehnici laser pentru fabricarea de biosenzori pe baza de sisteme microfluidice de detecție in timp real” am investigat si optimizat procesele de microfabricare a dispozitivelor microfluidice, sensorului electro-optic cat si modelele experimentale pentru identificarea bacteriilor la nivel de specie prin real-time PCR, varianta TaqMan. La elaborarea acestui proiect au participat toți partenerii implicați in proiect.

Astfel, in cadrul acestei etape am obținut următoarele rezultate:

- Pentru realizarea dispozitivului microfluidic au fost fabricate micro-canale de diferite dimensiuni (lungimi între 2-4 mm, latime între 50 – 200 μm , și înălțime între 100 nm – 4 μm) prin scrierea directă cu laserul (ArF, 193 nm) în substraturi de polidimetilsiloxan (PDMS).
- Filme subțiri de nichel și carbura de siliciu au fost depuse prin PLD și RF-PLD.
- Filmele subțiri de Ni și SiC au fost caracterizate din punct de vedere morfologic (Microscopie de Forță Atomică AFM și Microscopie Electronică cu Balanță SEM), structural și compozițional (Difracție de raze X XRD, Spectrometrie de Masă a Ionilor Secundari SIMS, EDS, TEM).
- Atât filmele subțiri de Ni cât și cele de SiC au o aderență excelentă la substraturile de PDMS. Pentru ambele materiale, scăzând fluența laser rugozitatea filmelor depuse scade. În plus, filmele de Ni depuse la lungimea de undă de 193 nm sunt nanostructurate. Deoarece filmele sunt depuse la temperatura camerei (sau temperaturi reduse) sunt amorfe, ceea ce scade dramatic performanțele filmelor ca elemente de încălzire. Aceste activități (de depunere și caracterizare de filme subțiri de Ni și SiC) se continuă în anul 2016 unde urmărim optimizarea performanțelor elementelor de încălzire (dependența rezistenței de temperatură).
- În această etapă a fost proiectat și verificat modelul experimental pentru identificarea bacteriilor la nivel de specie prin real-time PCR, varianta TaqMan. Modelul a fost optimizat pentru două specii frecvent izolate din infecții umane: *Escherichia coli*, bacterie Gram negativă și *Staphylococcus aureus*, bacterie Gram pozitivă. Atât pentru *E. coli* cât și pentru *S. Aureus* sensibilitatea de detecție a fost de 10 copii genomice per reacție.
- Pentru proiectarea sistemului electro-optic pentru măsurarea fluorescenței din probele de ADN ne interesează domeniul de lungime de undă de la 490nm la 560 nm.
- Pentru această fază am realizat un studiu privind receptoarele de detecție a radiației de mare sensibilitate și am descris detaliat elementele componente: amplificatorul, preamplificatorul, etc.
- Diseminarea rezultatelor s-a realizat prin participarea la două conferințe internaționale (EMRS și COLA) și acceptarea spre publicare a unui articol în revista Applied Surface Science care este cotate ISI.
- Secțiunea din website-ul grupului PPAM dedicată proiectului a fost actualizată.
- De asemenea, s-au planificat activități aferente etapei a treia din anul 2016, respectiv:
 - Continuarea depunerii prin PLD și RF-PLD de filme subțiri de Ni și SiC precum și caracterizarea acestora;
 - Integrarea tuturor elementelor pe aceeași platformă;
 - Implementarea sistemului electro-optic în platforma microfluidică și caracterizarea performanțelor acestuia;
 - Testarea sistemului construit prin evaluarea amplificării ADN-ului din probele de interes;
 - Măsurarea semnalului de fluorescență cu senzorul electro-optic;
 - Evaluarea sensibilității, specificității și reproductibilității metodei cu platforma fabricată;
 - Depunerea unei cereri de brevet precum și diseminarea rezultatelor.
- În concluzie, se poate afirma că obiectivele celei de-a treia etape au fost atinse.