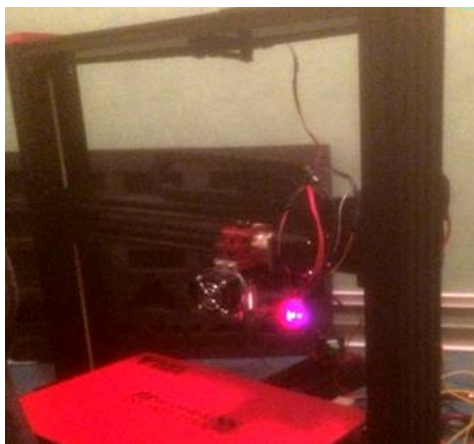


LAB-ON-A-DISH RAPID PROTOTYPING AND MICROSCOPIC INVESTIGATIONS OF LAB-ON-A-DISH GEOMETRIES (INCLUDING DYE DIFFUSION STUDIES)

P.A. Nasirov (3D printing), INEPCP RAS
O.V. Gradov (microscopy), ICP RAS

Система должна представлять собой активную «лабораторию на чипе» с наличием в ней флюидного микрорельефа (и микрорельефа поверхностно-активных сенсоров), обеспечивающего оптимальные биоадгезивные, сорбционные и биоинтерфейсные процессы, а, во-вторых, быть биосовместимой, что, в данном случае, является эквивалентным отсутствию в ней источников артефактов, поскольку любые не-биосовместимые материалы и технологии в случае биологического мониторинга в естественных условиях будут вполне очевидным образом влиять на источник аналитического сигнала, смещая его («негативная реактивность» вследствие действия ксенобиотиков и физических факторов, связанных с гидрофобностью / гидрофильностью, импедансом и т.п. характеристиками, которые должны подбираться для комплекса «сенсор-образец-среда-сенсор», исходя из предварительного анализа литературы и модельных мультифизических вычислений). Исходя из технологий, обеспечивающих как возможность модифицирования поверхности, так и быстрое прототипирование рельефных структур на ней, предположительно, не повреждающих клетки, было принято «тактическое решение» об использовании 3D-принтированных чипов на базе полимеров, являющихся, по данным литературы, биологически-совместимыми и нецитотоксичными.



Фиг. 1: Собранный 3D-принтер для печати прототипов чипов на больших поверхностях.

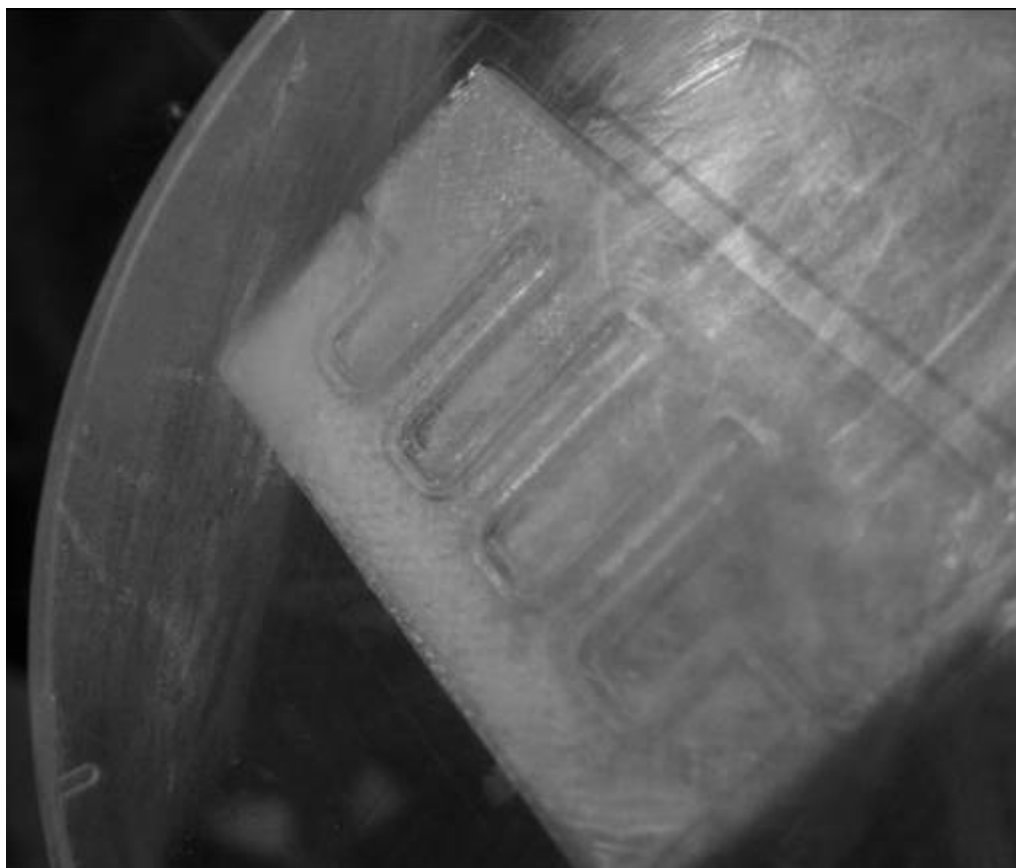
Нами был использован 3D-принтинг на системе стандартного типа с подогреваемым столом (инженер по 3D-печати Ф.А. Насиров), показанной на фиг. 1. К сожалению, сопла стандартных промышленных 3D-принтеров выходили из строя при работе с функциональными композитами, которыми мы пытались для придания специализированных свойств поверхности печатать указанные структуры. Однако на стандартных пластиках (ABS, PL и др.) процесс шел достаточно эффективно. Видео печати структур-прототипов, на которых, с учетом критериев подобия, исследовались потоки, сорбционные и биоадгезивные свойства в топологии каналов, приведено на ресурсах:

- <https://vimeo.com/273508210> (фиг. 5-а);
- <https://vimeo.com/273508513> (фиг. 5-б);
- <https://www.youtube.com/watch?v=tlb2jtr7Wqo> (фиг. 5-а);
- <https://www.youtube.com/watch?v=HapB97OMiGc> (фиг. 5-б);

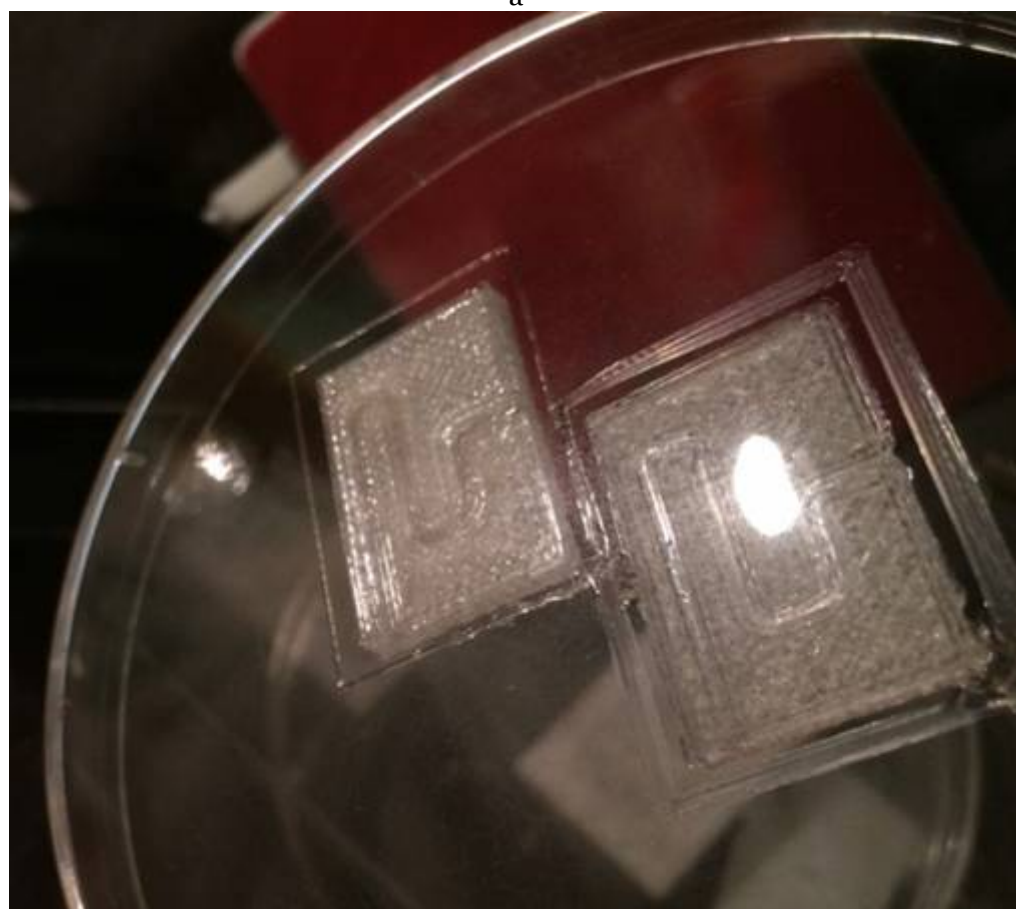
а также распространено путем микроблогинга на ресурсе лаборатории:

- <https://twitter.com/Lab005/status/954308076315783168> (фиг. 5-а);
- <https://twitter.com/Lab005/status/979402936580296704> (фиг. 5-б);

Фото двух структур-прототипов lab-on-a-dish приведены на фиг. 2.



а



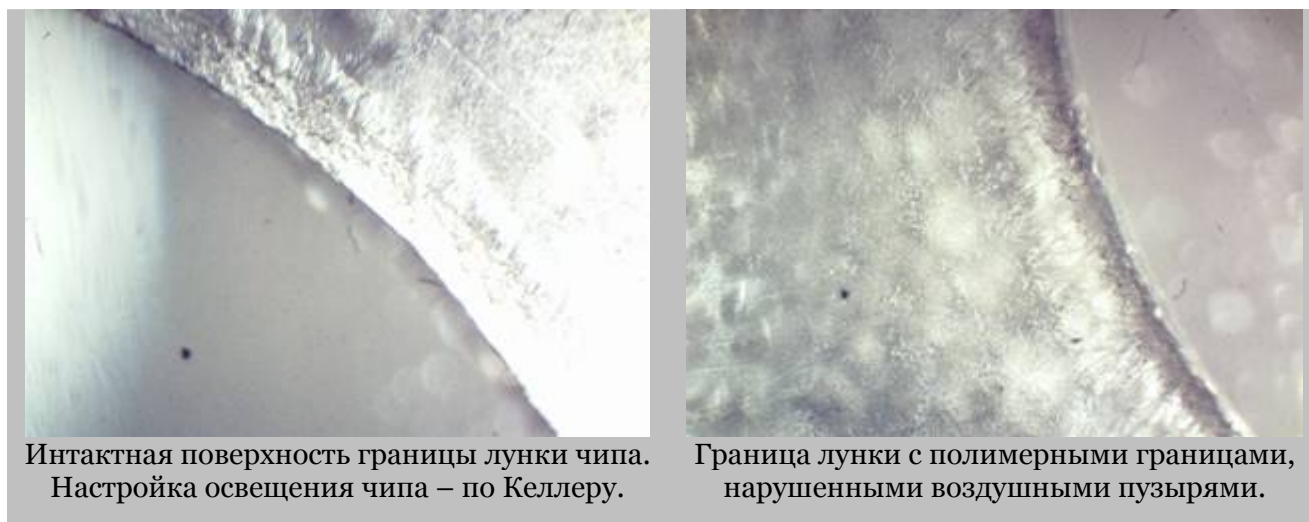
б

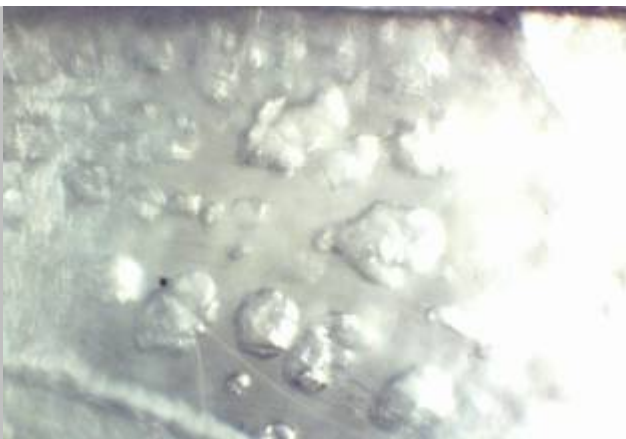
Фиг. 2: Фото двух топологий структур-прототипов lab-on-a-dish.

Как было позиционировано ранее, ключевым принципом для изготовления описываемых чипов – прототипов является совместимость поверхности и субповерхностной структуры чипов с естественной средой. Поэтому после изготовления чипов вышеописанным методом возникла очевидная проблема микроскопической характеристики как поверхности, так и субповерхностной структуры чипов. Были исследованы два типа чипов:

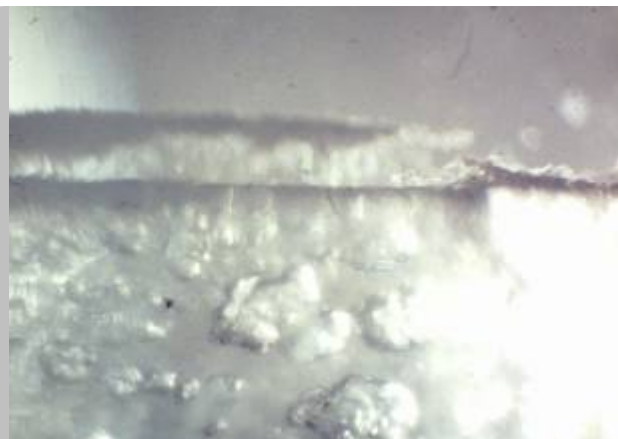
- Чип с ячейками, по геометрии подобный стандартному «геночипу» (Таблица 1). Исследование показало неоптимальность данной конфигурации для измерений (в силу плохой адгезии, формирования царапин и микротрещин, фаций-свилей и проникновения воздушных пузырей на границу подложки и полимера за счет наличия развитой системной перфорации (ячеек), понижающей надежность).
- Он же, но после введения флуоресцентных визуализирующих веществ (обычно – тетрапиррольных красителей), флуоресцирующих под действием лазеров, так как в работе предлагается «гибридизация» лазерно-флуоресцентного подхода (FRAP) с лазерной матрично-опосредованной десорбцией-ионизацией (MALDI). Флуоресцентная визуализация лунок / ячеек чипа при различных длинах волн, углах иллюминации и точках пространственного позиционирования лазерного пучка (при использовании цейтраферной оптоволоконной спектроскопии субнанометрового разрешения, данные которой приведены в Таблице 2) в районе лунок, с использованием полимерной матрицы (частично – как волновода или полупланарного оптического световода) показана в Таблице 3.
- Чип с полуячейками, сформированными путем 3D-принтинга в текстуре (класса волокнисто-тканых материалов) из стандартного субпрозрачного ABS-пластика (Таблица 4). Чип этого типа до исследований пористости структуры и сорбции (с использованием красителей типа родамин-6G) показал идеальные свойства: как по критерию удержания микроорганизмов, так и по развитости поверхности.
- Он же, но после введения флуоресцентных визуализирующих веществ (здесь это родамин-6G), флуоресцирующих под действием лазеров, так как нами в работе предлагается «гибридизация» лазерно-флуоресцентного подхода (FRAP, FLIP) с лазерной матрично-опосредованной десорбцией-ионизацией (MALDI и другими LDI). Несмотря на то, что данный тип чипов показал высокие метрологические и структурные характеристики на предварительном этапе, при введении в него красителя, индицирующего все неоднородности поверхности и микроструктуры внутреннего полимерного слоя, являющиеся продуктом механики и алгоритмов 3D-принтинга (обеспечивающих «псевдо-тканую» структуру), обнаружил целый ряд структурных дефектов. Краситель попадал в них как диффузионным путём, так и через щели и топологические отверстия, вследствие чего использование на практике такого типа чипов привело бы к полному заселению его микрофлорой, а не только фиксации её в целевых областях ROI (см. Таблицу 5).

Таблица 1: Микроскопическое исследование чипа с ячейками.

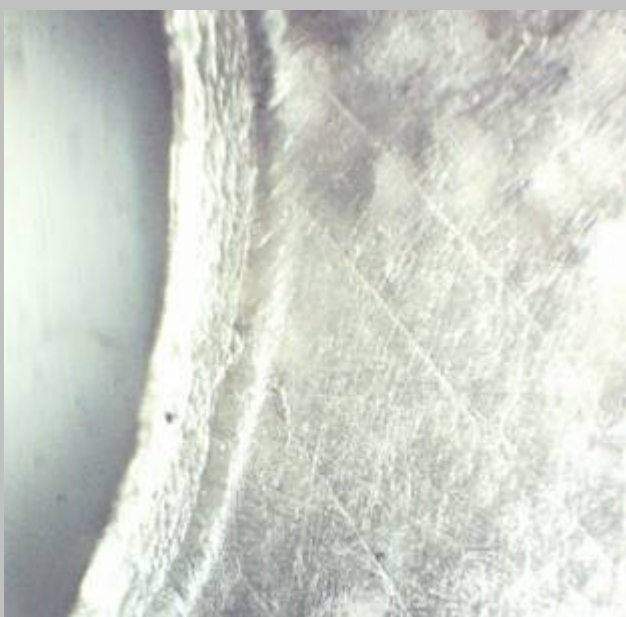




Воздушные пузыри в полимерном чипе под границей взаимодействия между подложкой и полимерным слоем после адгезии.



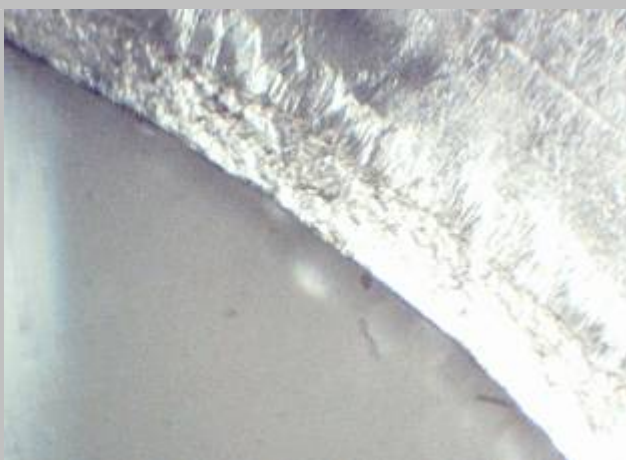
Воздушные пузыри в полимерном чипе на границе полимерной стенки лунки и среды, в которой находится детектируемый аналит.



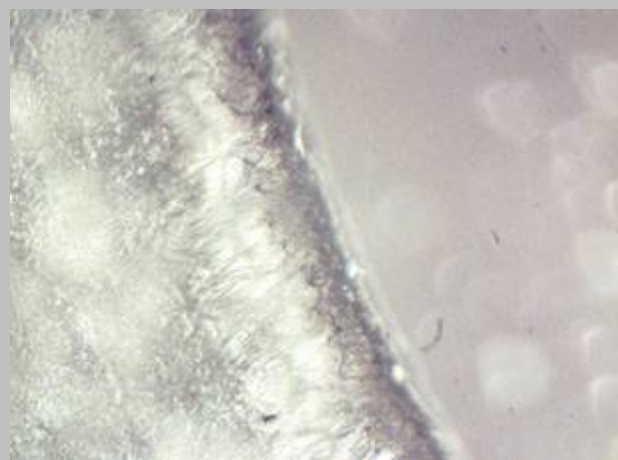
Микроцарапины / прекурсоры микротрещин на поверхности полимерного покрытия чипа в полимерном слое, не покрытом лаком или иным контр-абразивным покрытием.



Наблюдение формирования групп и цепочек воздушных пузырей в полимерном слое чипа непосредственно под гладкой поверхностью, часть которой абразивно повреждена.



Формирование сколов и фациальных свилей в приграничной зоне при прорезании чипа в одном из методов его подготовки к работе.



Формирование сколов и фациальных свилей в приграничной зоне при прорезании чипа. Видны также пузыри в зоне плохой адгезии.

Таблица 2: Примеры машинограмм (регистраграмм) спектров высокого разрешения.

Дальний УФ-спектр высокого разрешения (фрагмент)		Ближний ИК-спектр высокого разрешения (фрагмент)	
293.510	528.000	993.900	688.000
293.670	527.000	994.120	656.000
293.840	536.000	994.340	679.000
294.010	529.000	994.550	661.000
294.180	530.000	994.770	676.000
294.350	525.000	994.990	681.000
294.510	520.000	995.210	683.000
294.680	537.000	995.430	660.000
294.850	528.000	995.640	707.000
295.020	547.000	995.860	672.000
295.190	541.000	996.080	690.000
295.350	528.000	996.300	679.000
295.520	522.000	996.510	705.000
295.690	540.000	996.730	675.000
295.860	528.000	996.950	694.000
296.030	532.000	997.170	688.000
296.190	525.000	997.380	706.000
296.360	528.000	997.600	664.000

Таблица 3: Флуоресцентная визуализация лунок / ячеек чипа при различных длинах волн, углах иллюминации и точках пространственного позиционирования лазерного пучка.



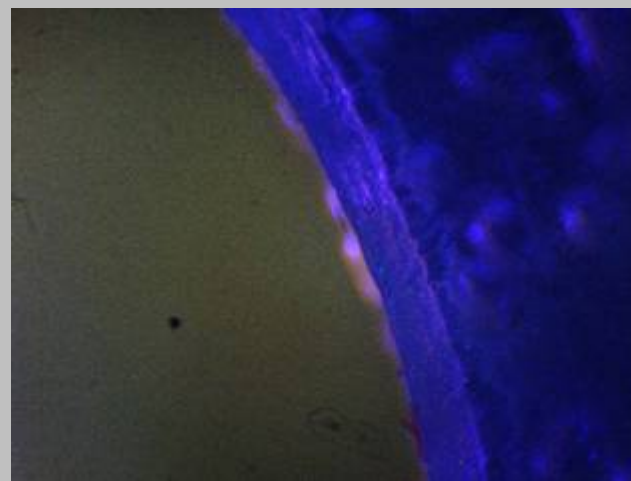
DPSS-лазер 405 нм.



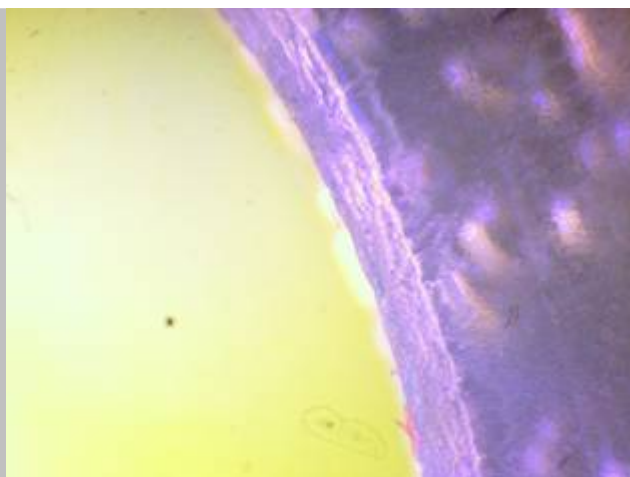
DPSS-лазер 405 нм.



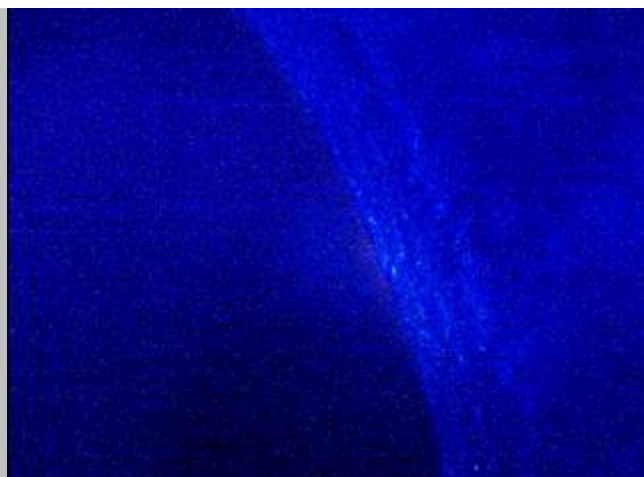
DPSS-лазер 405 нм.



DPSS-лазер 405 нм.



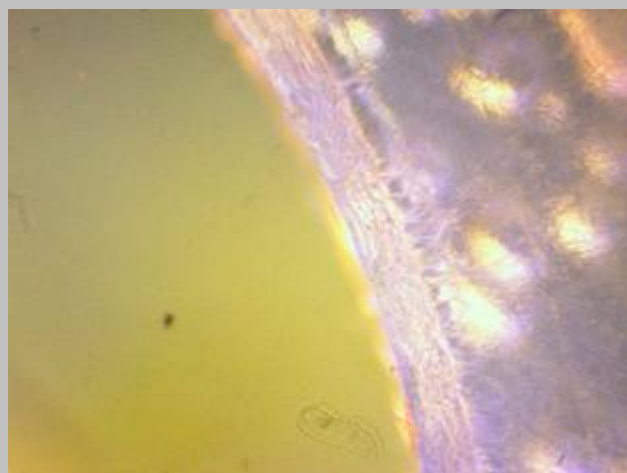
DPSS-лазер 405 нм.



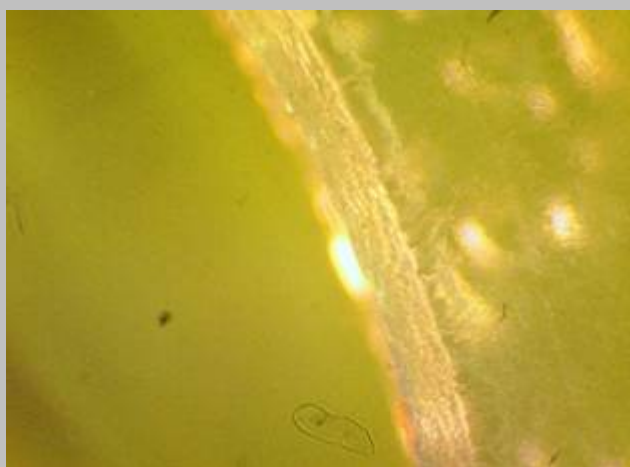
DPSS-лазер 405 нм.



DPSS-лазер 405 нм.



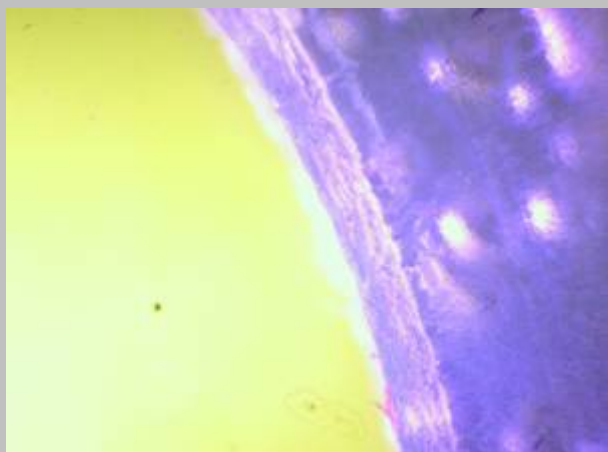
DPSS-лазер 405 нм.



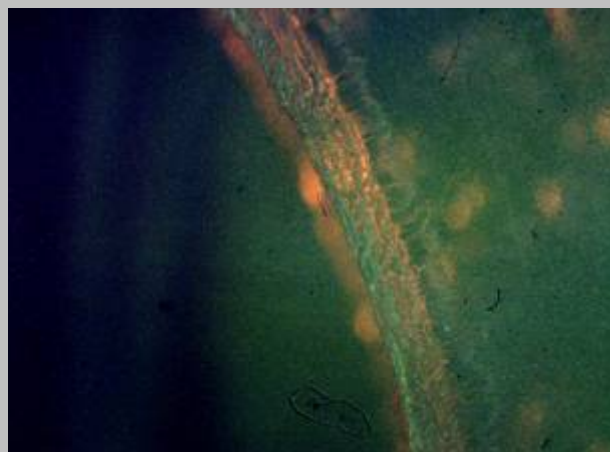
DPSS-лазер 405 нм.



DPSS-лазер 405 нм.



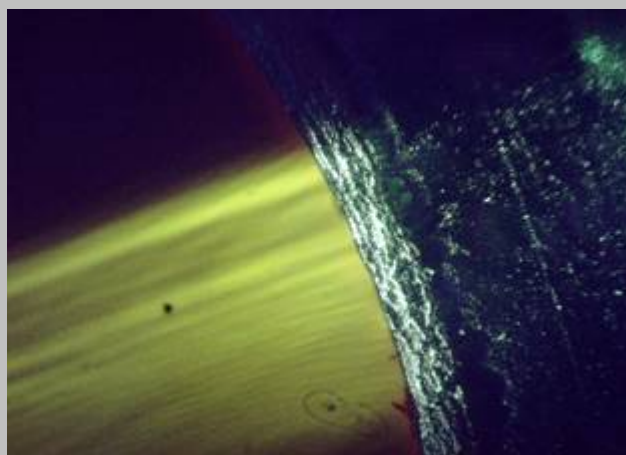
DPSS-лазер 405 нм.



DPSS-лазер 532 нм.



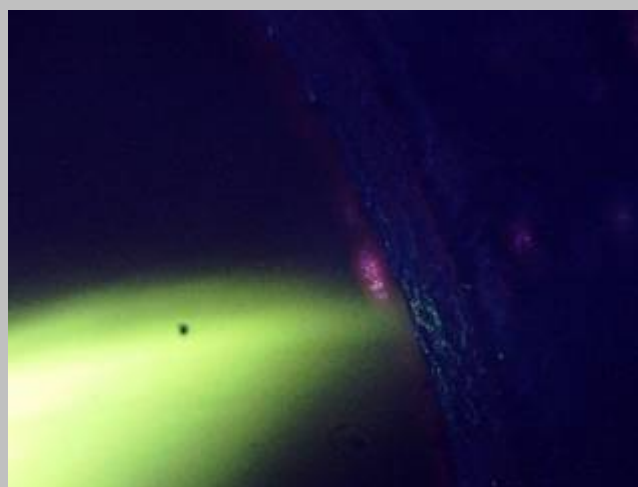
DPSS-лазер 532 нм.



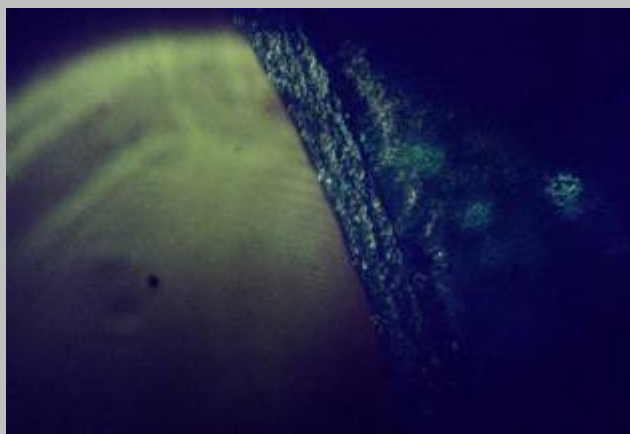
DPSS-лазер 532 нм.



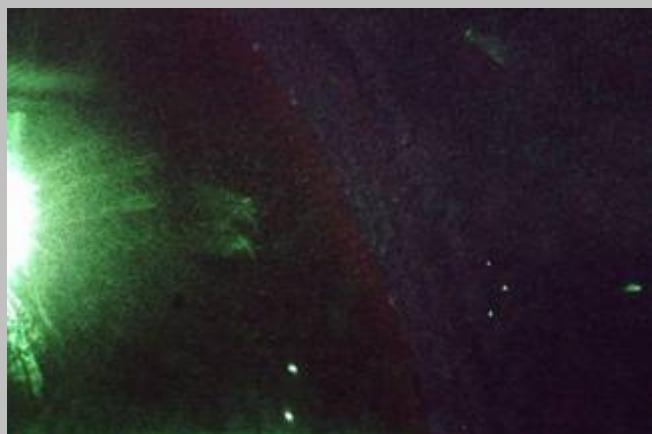
DPSS-лазер 532 нм.



DPSS-лазер 532 нм.



DPSS-лазер 532 нм.

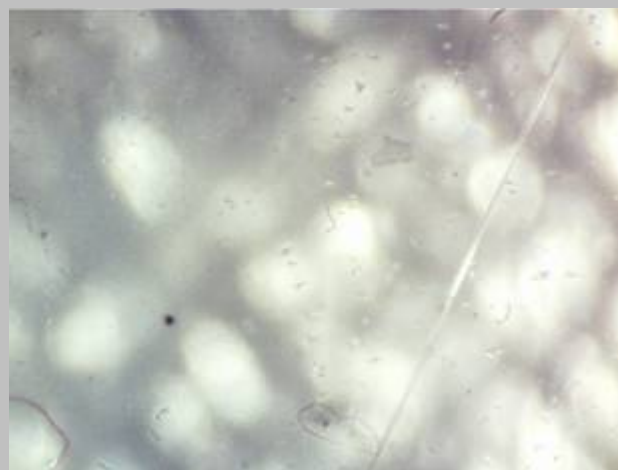


DPSS-лазер 532 нм.

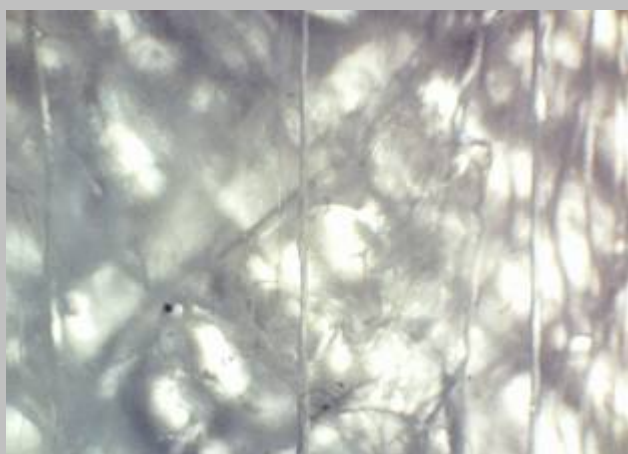
Таблица 4: Микроскопическое исследование чипа с полуячейками, сформированными путем 3D-принтинга в текстуре (класса волокнисто-тканых материалов) из стандартного субпрозрачного ABS-пластика.



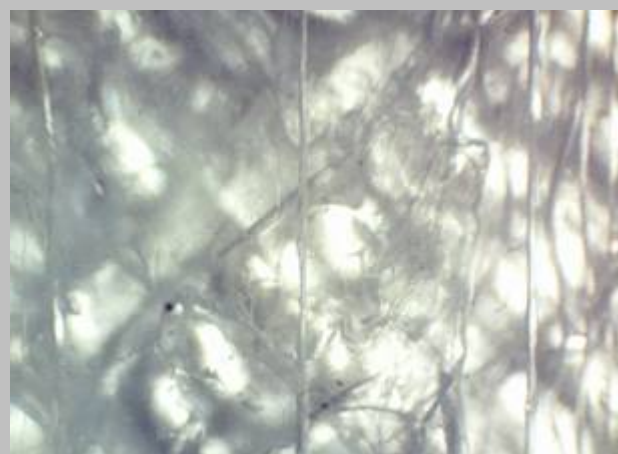
1-й слой фокусирования столом с ЧПУ



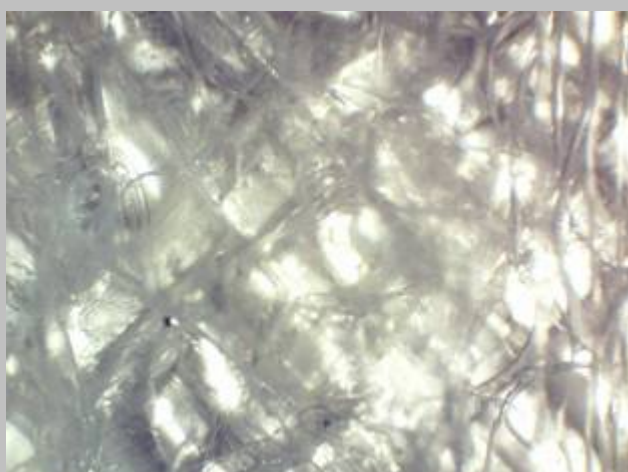
2-й слой фокусирования столом с ЧПУ



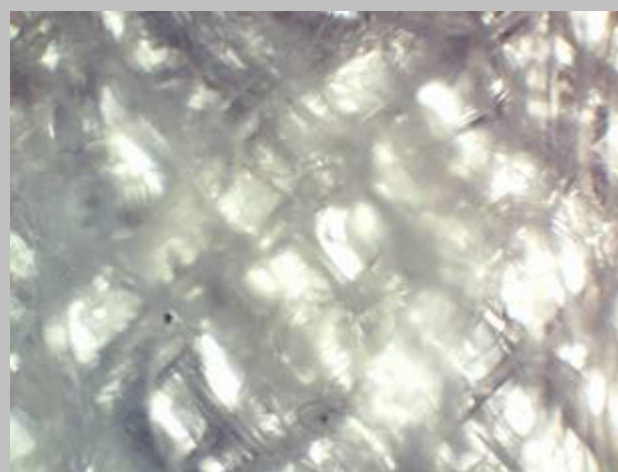
3-й слой фокусирования столом с ЧПУ



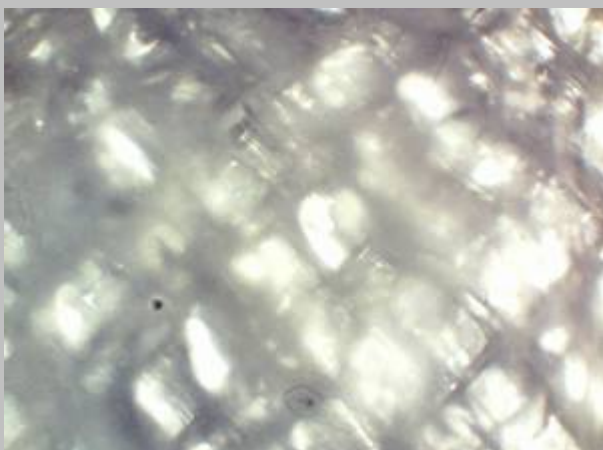
4-й слой фокусирования столом с ЧПУ



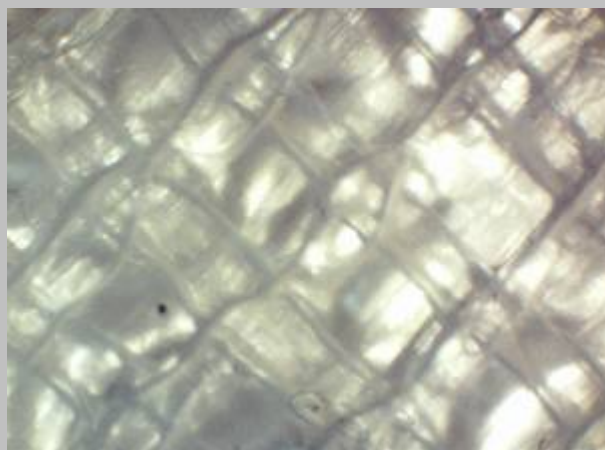
5-й слой фокусирования столом с ЧПУ



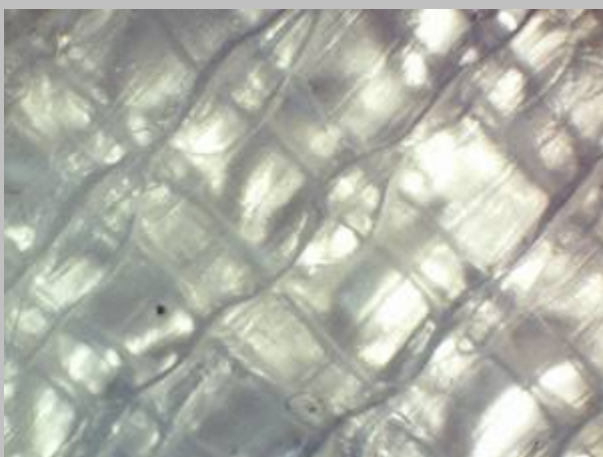
6-й слой фокусирования столом с ЧПУ



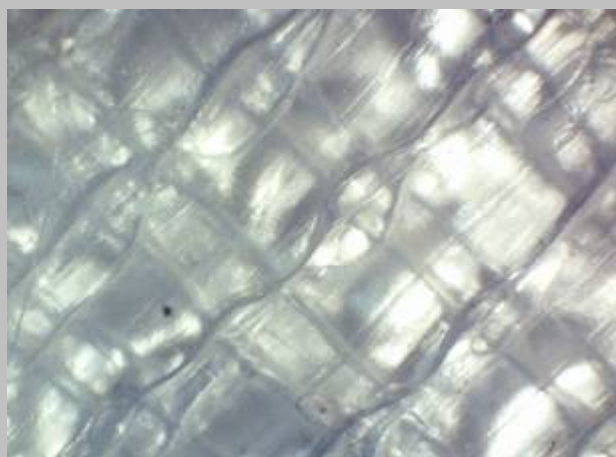
7-й слой фокусирования столом с ЧПУ



8-й слой фокусирования столом с ЧПУ



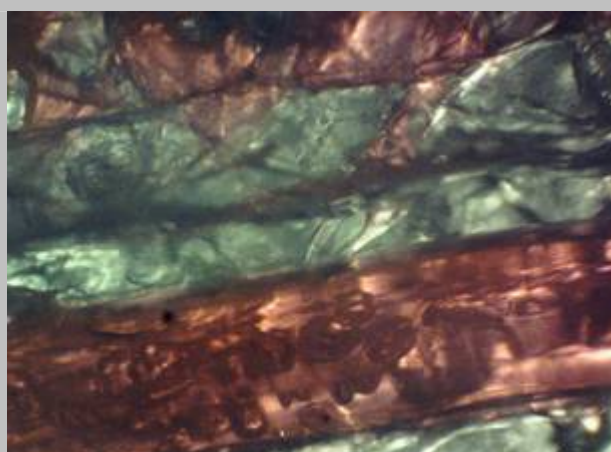
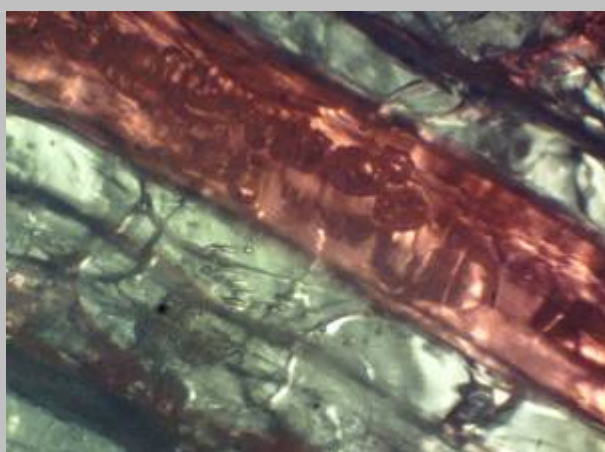
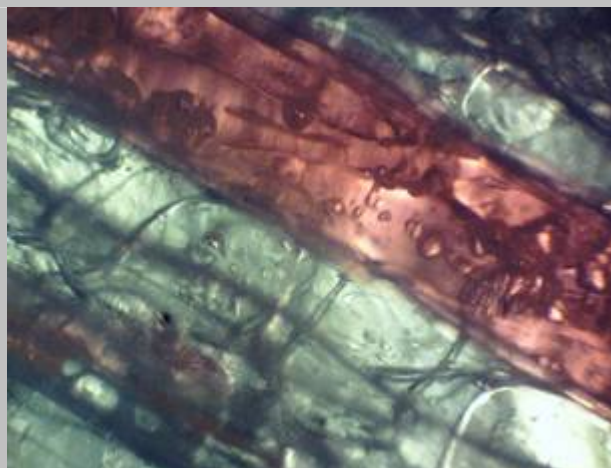
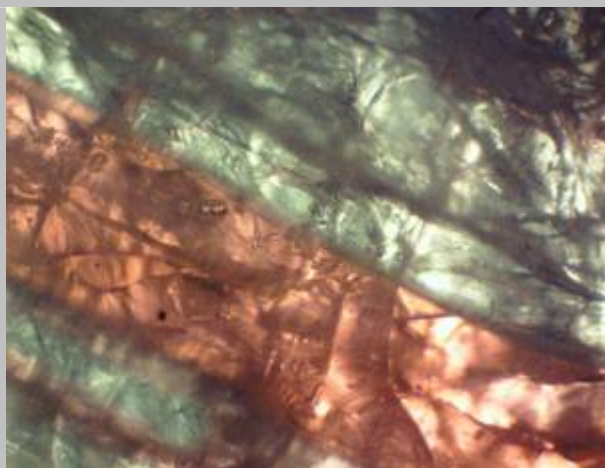
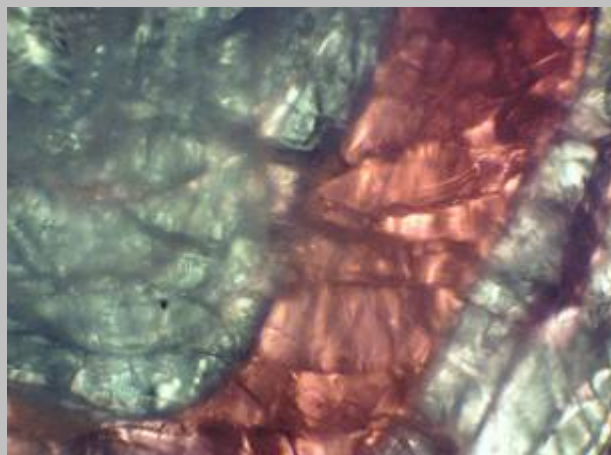
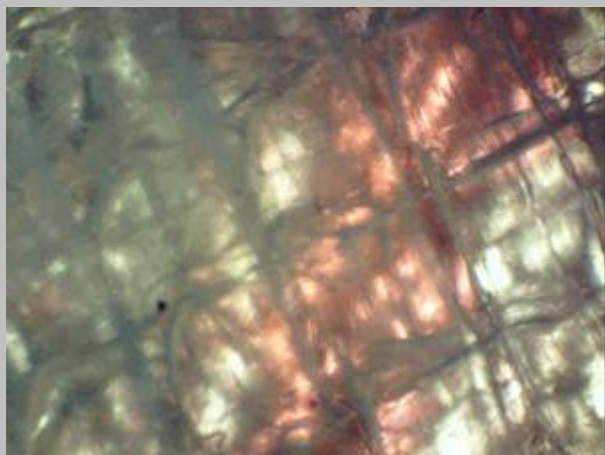
9-й слой фокусирования столом с ЧПУ



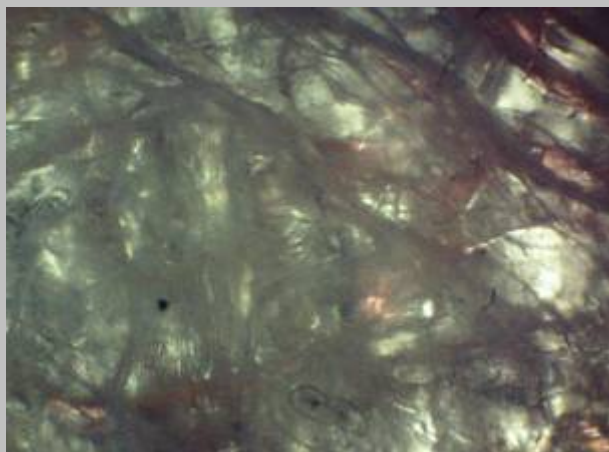
10-й слой фокусирования столом с ЧПУ

Таблица 5: Индикация структуры псевдо-тканого чипа с помощью красителя и DPSSL.

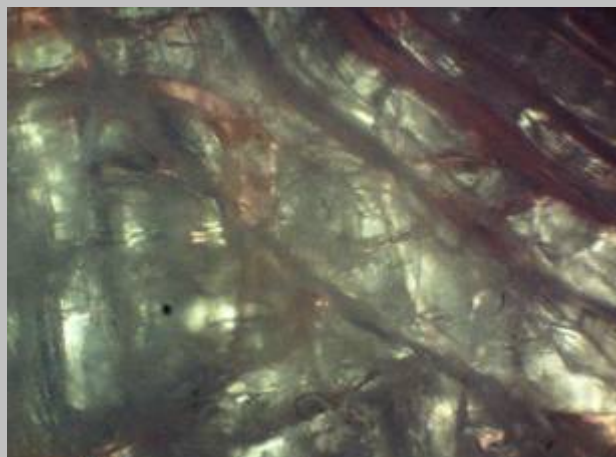
***Визуализация мезофлюидных каналов прототипов почвенных чипов
с использованием красителя родамин-6G.***



Проникновение красителя в микроструктуру чипа.



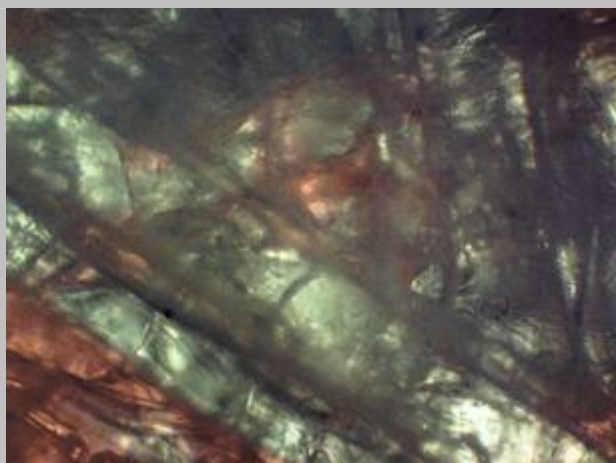
Взаимодействие с фибриллярной текстурой псевдо-тканого 3D-принтированного чипа.



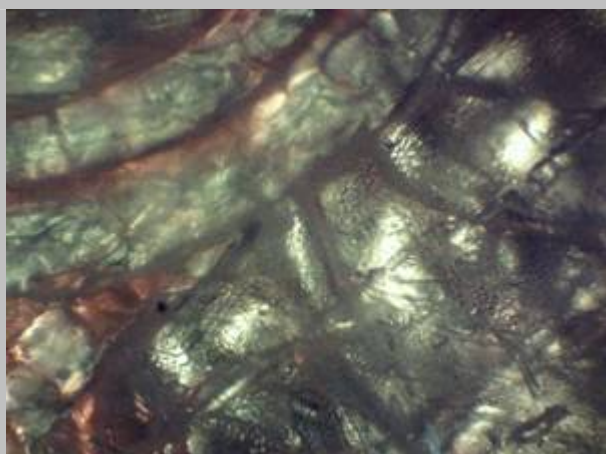
Взаимодействие с фибриллярной текстурой псевдо-тканого 3D-принтированного чипа.



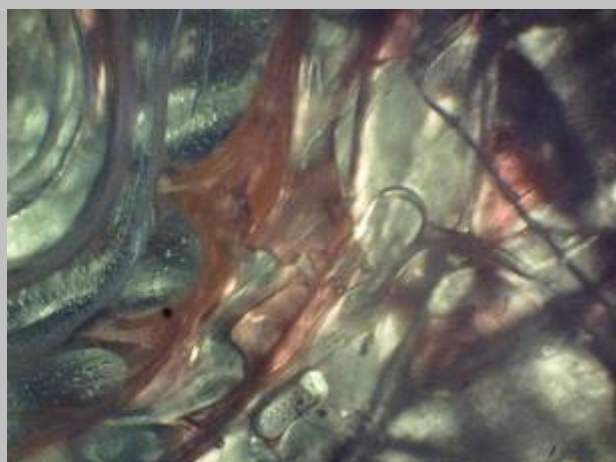
Взаимодействие с фибриллярной текстурой псевдо-тканого 3D-принтированного чипа.



Взаимодействие с фибриллярной текстурой псевдо-тканого 3D-принтированного чипа.



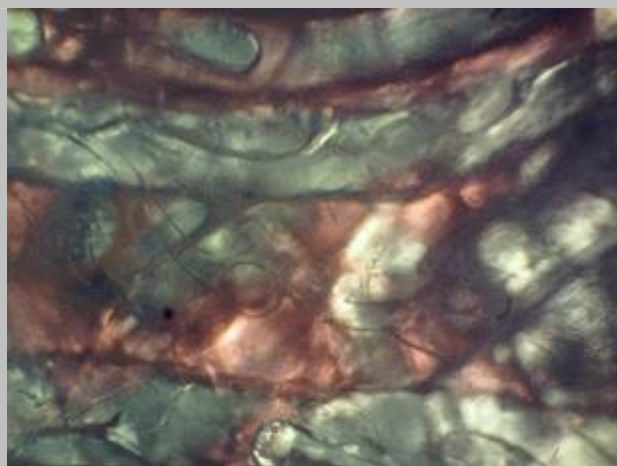
Помимо проникновения красителя можно наблюдать эффекты взаимодействия чипа с пузырьками воздуха.



Помимо проникновения красителя можно наблюдать эффекты взаимодействия чипа с пузырьками воздуха.



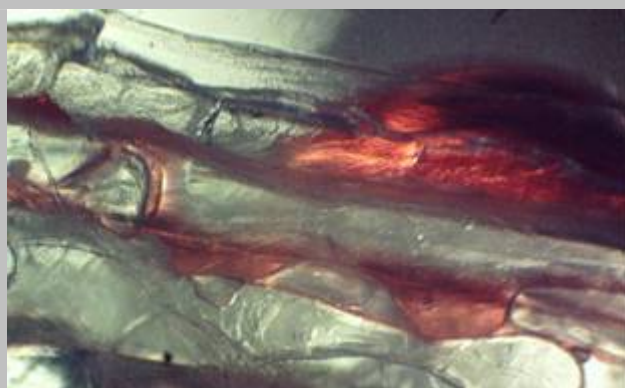
Помимо проникновения красителя можно наблюдать эффекты взаимодействия чипа с пузырьками воздуха.



Помимо проникновения красителя можно наблюдать эффекты взаимодействия чипа с пузырьками воздуха.

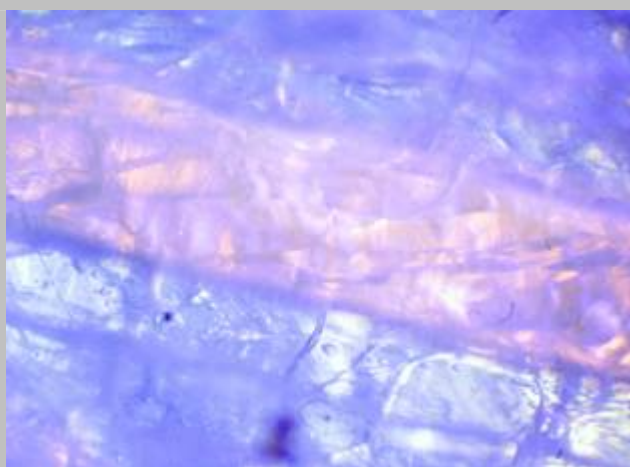


Помимо проникновения красителя можно наблюдать эффекты взаимодействия чипа с пузырьками воздуха.



Помимо проникновения красителя можно наблюдать эффекты взаимодействия чипа с пузырьками воздуха.

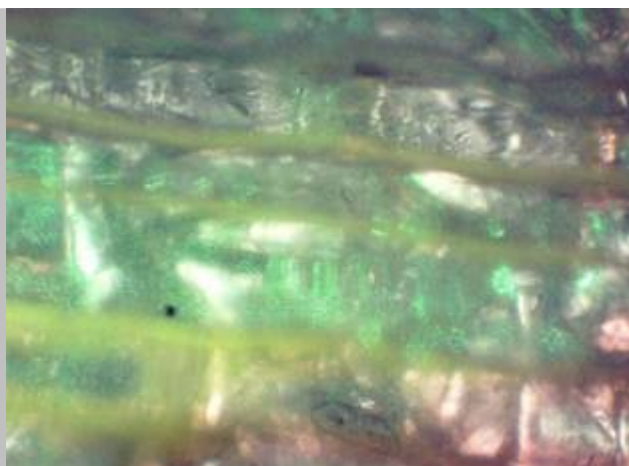
Лазерные флуоресцентные и лазерно-проекционные спекл-визуализации.



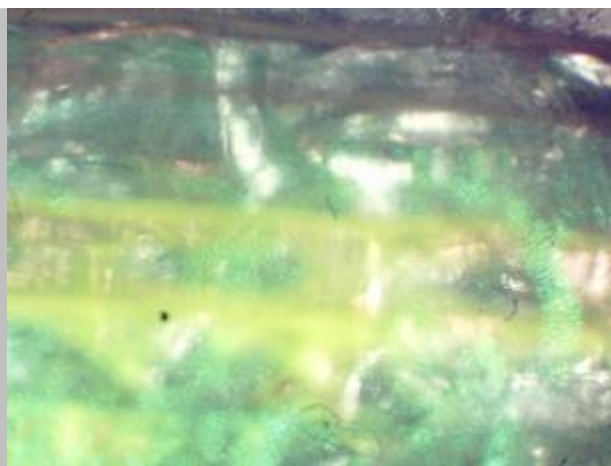
DPSS-лазер 405 нм. Флуоресценция.



DPSS-лазер 532 нм. Флуоресценция.



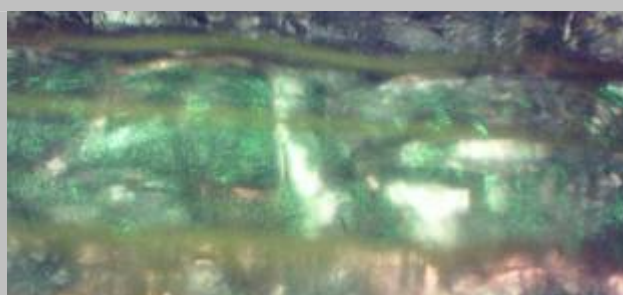
DPSS-лазер 532 нм. Флуоресценция
и элементы стекл-структры.



DPSS-лазер 532 нм. Флуоресценция
и элементы стекл-структры.



DPSS-лазер 532 нм. Флуоресценция
и элементы стекл-структры.



DPSS-лазер 532 нм. Флуоресценция
и элементы стекл-структры.

Bibliography

- G. Jablokow, P. A. Nasirov, F. K. Orekhov, and O. V. Gradov. “MALDI-FLIP-on-a-chip” and “MALDI-FRAP-on-a-flap”: Novel Techniques for Soil Microbiology and Environmental Biogeochemistry. Part II – Polymer Chip Prototyping. *Biogeosystem Technique*, 5(1):3–56, 2018. DOI: 10.13187/bgt.2018.1.3