

Univerzita Jana Evangelisty Purkyně v Ústí nad Labem

Studijní opory

BIOSENSORY A MIKROFLUIDNÍ SYSTÉMY

Mgr. Jan Malý, Ph.D.



EVROPSKÁ UNIE
Evropské strukturální a investiční fondy
Operační program Výzkum, vývoj a vzdělávání



Studium, výzkum a inovace - rozvoj přírodovědných a technických doktorských programů na Univerzitě J. E. Purkyně v Ústí n. L., Reg. č.: CZ.02.2.69/0.0/0.0/16_018/0002735.

Obsah

| | |
|--|----|
| Historie vzniku a vývoje mikrofluidních systémů | 4 |
| BioMEMS..... | 4 |
| Lab-on-a-chip a Micro Total Analysis systémy..... | 4 |
| Základní materiály pro výrobu mikrofluidních systému pro bioaplikace..... | 5 |
| Anorganické materiály | 5 |
| Polymery | 5 |
| Papírové mikrofluidní čipy..... | 6 |
| Hydrogely | 7 |
| Kompozitní materiály | 7 |
| Další materiály..... | 7 |
| Základní výrobní procesy a techniky přípravy mikrofluidních zařízení | 8 |
| Litografie | 8 |
| Laminování..... | 8 |
| Replica molding (soft litografie) | 9 |
| Microtransfer molding (μ TM) | 9 |
| Micromolding v kapilárách (MIMIC) | 9 |
| Solvent-Assisted micromolding (SAMIM)..... | 9 |
| Decal-transfer microlithography | 9 |
| Koloidní litografie | 9 |
| Injection molding | 9 |
| Hot embossing | 10 |
| 3D tisk: FDM..... | 10 |
| 3D tisk: Stereolitografie..... | 10 |
| 3D tisk: Multi jet modelling (MJM) | 10 |
| 3D tisk: Dvoj fotonová polymerizace (two-foton polymerization, 2PP)..... | 10 |
| Nanofabrikace | 11 |
| Extrémní ultrafialová litografie (EUV) | 11 |
| Electron beam lithography (EBL)..... | 11 |
| Nanoimprint lithography (NIL) | 11 |
| Anodic Aluminium Oxidation (AOO) | 11 |
| Screen printing | 11 |
| Samoskladné vrstvy..... | 12 |
| Microcontact printing (μ CP)..... | 12 |
| Mikroobrábění | 12 |
| Papírové čipy | 14 |
| Další metody, které je možné využít při tvorbě mikrosystémů..... | 14 |
| Základní techniky biopatterningu a přípravy bioaktivních povrchů..... | 15 |
| Základy fyzikálních principů využívaných v mikrofluidice pro oblast biotechnologií..... | 18 |
| Biosenzory, základní principy a typy biosenzorů pro detekci biologických a biochemických signálů. | 22 |
| BioMEMs v biologických a biomedicínských aplikacích, Lab-on-a-chip a Micro total analysis systems - pro oblast bioanalytiky..... | 27 |
| BioMEMs v biologických a biomedicínských aplikacích, Lab-on-a-chip a Micro total analysis systems - pro oblast buněčných technologií a tkáňového inženýrství..... | 30 |
| Další biologické aplikace mikrosystémů a BioMEMS. | 34 |
| Ukázkové protokoly pro samostatnou práci studentů. | 35 |
| Protokol 1. kultivace buněk v mikrosystémech..... | 35 |
| Protokol 2. Výroba mikrosystému v PDMS metodou rozpouštění 3D tisku..... | 37 |

Historie vzniku a vývoje mikrofluidních systémů

Jako MEMS jsou označovány mikroelektromechanické systémy. MEMS jsou jak technologie s typickými výrobními procesy výroby zařízení s mikro až nano přesností, tak hotové systémy, které jsou velké od několika mikrometrů po milimetry.

BioMEMS

Bio-mikroelektromechanické systémy (BioMEMS) jsou součástí MEMS, zaměřené na biologické aplikace. Ne všechny obsahují elektromechanické části. Možné rozdělení na: mikrofluidní systémy pro bioaplikace (jednoduché mikrofluidní systémy, micro Total Analysis Systems (μ TAS), a Lab-on-a-Chip (LOC). Dále na senzorskou část pro medicínu včetně implantovaných systémů (senzory - teploměry, tlakoměry..., implantáty - ušní, oční, kardiostimulátory...) A nakonec na mikronástroje (chirurgické nástroje) [1].

- První zmínky: 1967 S. B. Carter použil palladiové ostrůvky pro zachycení buněk [1], 1985 těhotenský test ClearBlue od společnosti Unipath Inc. jakožto první komerčně dostupný mikrofluidní čip na trhu [1].
- Důvody a hnací motory rozvoje μ TAS a BioMEMS: Human genom Project, vysoké ceny chromatografických analýz a vojenské využití pro analýzu chemických látek na bitevním poli (USA DARPA) [2].
- První MEMS nebyly biokompatibilní z důvodu použitých materiálů pro mikrofabrikaci a fotolitografii. 1993 objev mikrofabrikace založené na PDMS umožnil masivní rozmach BioMEMS [1] např. 1991 oligonukleotidový čip [3], 1998 první pevné mikro jehly pro administraci léčiv [4], 1998 první mikrofluidní čip pro PCR [5], 1999 demonstrace vystavení buněk různým heterogenním laminárním tokům v mikrokánálcích [6].

Lab-on-a-chip a Micro Total Analysis systémy

Micro Total Analysis systémy (μ TAS) a Lab-on-Chipsystémy (LOC) jsou systémy, které mají na čipu integrovaných více aplikací, jako například filtrování, mixování pumpování analýza/detekce vzorku. Přičemž mikrofluidika je základní technologií. Postaveny na principech miniaturizovaného zařízení pro chemickou analýzu vzorků. μ TAS jsou převážně orientované spíše na chemickou analýzu LOC na biologické aplikace [1, 7].

- 1954 vynález mikrotechnologií a integrovaných semikonduktorů, 1966 tlakové senzory, rozvoj mechanicky pohyblivých struktur i zařízení pro práci s kapalinami (mixéry, kapilární kanálky, pumpy, kohouty.
- 1979 1. LOC plynová chromatografie [8].
- 1990 první použití termínu μ TAS [1].
- 1990-1999 masivní rozvoj díky vojenské podpoře DARPA (DNA microarray, kapilární elektroforéza, genomové aplikace)
- dnes rozvoj v oblastech miniaturizace a biologických aplikací jako jsou DNA labyrinty, single-cell detekce a analýzy, nanosensory pro detekci biomolekul [9, 10].

Kontrolní otázky: Co jsou to MEMS? Na jaké aplikace jsou orientovány μ TAS a na jaké LOC?

Základní materiály pro výrobu mikrofluidních systému pro bioaplikace.

V závislosti na aplikaci čipů (detekce patogenů, elektroforéza, DNA analýza, tkáňové systémy...) je nutné zvolit jak vhodný design samotného čipu, tak i vhodný materiál s adekvátními vlastnosti k zamýšlenému použití čipu. Prvními materiály, které byly pro výrobu čipů využívány, byly silikon a sklo. Rozvoj nových technologií umožnil využití i pokročilejších materiálů jako jsou polymery, nebo papírové kompozity. U materiálů používaných k výzkumu a vývoji je často kladen důraz na všestrannost použití, zatímco u materiálů určených pro masovou výrobu a komercializaci je kladen důraz na cenu, spolehlivost a snadnost zpracování. Výběr materiálu také ovlivňuje fyzikální vlastnosti samotných čipů, pokud je nutné dosáhnout určitého stupně hydrofobicity, povrchových funkčních skupin, teplotní a elektrické odolnosti, pružnosti a pevnosti, optické čirosti... [11, 12].

Anorganické materiály

Silikonové čipy: první použité materiály, ačkoliv byli rychle nahrazeny sklem a posléze polymery. Transparentní, s $-Si-OH$ skupinami na povrchu, vysoce elastický 130-180 GPa avšak nevhodný pro použití s nebezpečnými chemikáliemi. Čipy využívající silikon jsou často vyráběny technikami mokrého a suchého leptání, nebo aditivními metodami. Využití například pro droplet PCR [11, 12].

Skleněné čipy: již dříve byly používány skleněné a křemenné kapiláry pro chromatografii a elektroforézu. Opticky transparentní, elektricky nevodivé, amorfní a biokompatibilní. Často zpracováváno pomocí suchého nebo mokrého leptání. Protože sklo není porézní, není možná ani výměna plynů, mezi kapalinou uzavřenou v čipu a okolním prostředím a tudíž není vhodné pro dlouhodobé buněčné kultivace. Využití například pro elektroforézy, chemické reakce na čipu, extrakce solventu... [11, 12].

Keramické čipy: LTCC (low temperature co-fired ceramic) technologie jsou velice dobře rozvinuty a optimalizovány jak za účelem nízkých objemů a vysokého výkonu tak pro vysoké objemy ale nízké náklady. LTCC se vyznačuje dobrými elektrickými a mechanickými vlastnostmi a vysokou mírou spolehlivosti. Keramický materiál využívá často jako základ oxid hlinitý. Využití často v elektromechanice, micro-opto elektromechanice, senzorech... [11, 12].

Polymery

Elastomery: propletené crosslinkované polymerní řetězce. Mohou se natáhnout nebo stlačit a opět se vrátit do původní podoby.

Elastomery – PDMS čipy: široce rozšířené pro rapidní prototypování díky jejich jednoduché výrobě. Silně se přichytávají na sklo, mají dobré optické a elastomerní vlastnosti, jednoduše se implementují a jsou levné. V dnešní době nejvíce rozšířené. Často odlévány pomocí různých forem. Nízký elastický modulus (300-500 kPa) tudíž jsou vhodné pro použití v různých kohoutech, přepínačích. Jsou permeabilní pro plyny a biokompatibilní, tudíž jsou vhodné pro buněčné kultivace. Nevýhodou jsou nespecifické interakce a zachytávání hydrofobních molekul na svém povrchu, stejně tak jako bobtnání v nepolárních rozpouštědlech [11–13].

Elastomery - Thermoset polyesterové (TPE) čipy: opticky transparentní, nerozpustné, vysoce mechanicky odolné, netaví se, neobtnají ale nepropustné pro plyny a drahé. Využití ve 3D fotopolymerizaci [11, 12].

SU-8: negativní fotocitlivý polymer na bázi epoxidu. Části polymeru exponované UV zářením polymerují. Neexponované části se dají rozpustit v průběhu procesu fotolitografie. Používá se jako forma pro odlévání, vyrábí se z něj mikrokanálky, slouží jako maska pro leptání abrazivní obrábění, templát pro galvanickou depozici kovů, izolant... [14, 15].

Thermoplasty: vysoce crosslinkované polymery, které mohou být i opakovaně taveny a modelovány. Po vychladnutí si udržují svůj vymodelovaný tvar. Opticky čiré, rigidní, nepermeabilní pro plyny. Zpracovávají procesem thermo molding. Často využívané v komerční sféře, díky jednoduché výrobě a velice nízkým finančním nákladům, ale nevhodné pro prototypování.

Thermoplasty – polystyrenové (PE) čipy: opticky transparentní, biokompatibilní, inertní rigidní, ale nákladné na výrobu. Vyráběny procesy injection molding a hot embossing. Využívány pro koncepty organ-on-chip [11, 12, 16–18].

Thermoplasty – polykarbonátové (PC) čipy: tepelně vysoce odolné, transparentní ale náchylné k organickým rozpouštědlům. Pro výrobu čipů využíván proces hot embossingu. Využití v PCR, lýze vzorků, enzymatické amplifikace, izolace nukleových kyselin, detekce patogenů, elektrochemické biosensory [11, 19, 20].

Thermoplasty – Poly-methyl methacrylátové (PMMA) čipy: levný, nejméně hydrofobní z běžně užívaných plastů, rigidní, výborná optická čirost. Velice často používaný v komerční sféře pro jednorázové čipy. Tepelně rozložitelný a odbouratelný. Čipy často vyráběny pomocí laserového řezání. Využíváno pro mixovací čipy, DNA sekvencování, elektroforézy [21, 22].

Thermoplasty – Polyethylene glycol diacrylátové (PEGDA) čipy: materiál podobný PDMS v stabilitě ve vodě a optické propustnosti ale má vyšší odpor k permeaci malých hydrofobních molekul než PDMS. Považován za biologicky inertní s dobrými mechanickými vlastnostmi. Často využíván jako 3D scaffold ve tkáňovém inženýrství ale neumožňuje buněčnou adhezi. Používán také pro výrobu kohoutů a pump. Výroba čipů je velice podobná výrobě čipů z PDMS [11, 23].

Thermoplasty – čipy vyrobené z teflonů a perfluorinovaných sloučenin (PFEP, PFA, PFPE): výborná resistance k rozpouštědlům, extrémně inertní, opticky transparentní a mechanicky měkké s vysokou tavicí teplotou, propustné pro plyny. Použití všude, kde je nutné zamezit nežádoucím, nespécifickým interakcím kapalin nebo buněk s povrchem [11, 12, 24].

Thermoplasty – Polyurethanové (PU) čipy: vysoká mechanická odolnost, a odolnost vůči abrazi ale problematická optická čirost. Čipy často vyráběny pomocí metod injection moulding, imprinting, plasmové leptání. Využití pro koncepty umělého srdce, intra-aortální balónky, izolace kardiostimulátorů, srdeční chlopně, hemodializační membrány [13, 25].

Papírové mikrofluidní čipy

Papír je flexibilní materiál založený na celulóze. Lze ho lehce modifikovat, je lehce dostupný a může být lehce odstraněn prostým spálením nebo přirozenou degradací. Může být použit pro biochemické analýzy a medicínské nebo forenzní diagnostiky. Detekce analytů může probíhat na

základě kolorimetrie, elektrochemie, chemiluminiscence a elektrochemiluminiscence. Kapalina je skrz čipy poháněna pomocí kapilárních sil [11].

Hydrogely

Hydrogely jsou 3D síť hydrofilních polymerních řetězců situovaných ve vodním médiu. Jsou vysoce porézní s kontrolovatelnou hustotou pórů a jsou často nepřilnavé. Díky těmto vlastnostem ale nedokáží udržet silnější vrstvu buněk a rovnoměrně ji vyživovat. Mikrostruktury v hydrogelech jsou omezeny na mikrometrové rozměry na rozdíl od polymerů, které umožňují až nanometrové rozměry struktur. Často vyráběny metodami direct writing (LDW) a channel sealing [12].

Kompozitní materiály

Čipy z cyclic-olefin copolymerů (COC): vlastnostmi podobné PC a PMMA. Levné a snadné na výrobu, výborné optické vlastnosti, biokompatibilní, chemicky odolné ale velmi křehké [26–28].

Hybridní čipy z papíru a polymeru: postaveny na principu papírových čipů se snahou omezit jejich negativní vlastnosti. Umožňují rapidní imobilizaci biomolekul a nabízejí vysokou kontrolu toku látek, což by v klasických papírových čipech nebylo možné. Využíváno například pro mikro-ELISA [29].

Další materiály

Pro výrobu čipů mohou být použity i další materiály řazených převážně mezi plasty, jejichž využití najde uplatnění ve 3D tisku ale i jinde. Těmito materiály mohou být ABS, ABS-T, PLA, PETG, Nylon, různé druhy fotopolymerů... [30–32].

Z pohledu BioMEMS jsou důležité i obecné vlastnosti materiálů. Důležité vlastnosti materiálů je možno rozdělit na [33, 34]:

mechanické vlastnosti: vztah mezi namáháním, napětím a strukturálními změnami materiálů vedoucí k poškození materiálu. Mechanické vlastnosti jsou závislé na teplotě. Elastické vlastnosti, pevnost materiálu, únava materiálu.

termální vlastnosti: důležité z důvodu použití vhodné výrobní technologie (opracování za tepla) a zejména pro možné změny velikosti a tvaru. Bod tavení, teplota skelného přechodu, koeficient tepelné roztažnosti, specifická tepelná kapacita, tepelná vodivost

elektrické vlastnosti: rezistence, dielektrická konstanta, dielektrická síla

optické vlastnosti: refrakční index, transmise, autofluorescence

magnetické vlastnosti: magnetická permeabilita

chemická odolnost: možno ji rozdělit na kompatibilitu s louhy, kyselinami, organickými rozpouštědly

mezi další fyzikální vlastnosti patří: hustota materiálu, hydrofobicita, absorpce vody...

Kontrolní otázky: Jaké vlastnosti materiálů jsou důležité pro výrobu BioMEMS? Co jsou to termoplasty? Jaké jsou výhody PDMS čipů?

Základní výrobní procesy a techniky přípravy mikrofluidních zařízení

Výrobní techniky lze obecně dělit na: top down procesy (z velkých objektů se vytváří menší) a Bottom up procesy (z malých objektů se vytváří větší objekty). Výrobní procesy je možné dělit na: **Mikroobrábění:** výrobní procesy pro výrobu BioMEMS. Patří mezi ně procesy sloužící k výrobě integrovaných obvodů. Vyznačuje se paralelním procesem, v průběhu kterého je možné vyrobit několik tisíc elementů na jednom substrátu a ve stejném čase je možné obrábět více substrátů najednou.

Mikrofabrikace: proces, který slouží k výrobě zařízení velkých od jednotek mikrometrů po milimetry. Mikrofabrikaci lze dále dělit na - měkké a tvrdé techniky (dle materiálů a procedur, které se používají), aditivní a subtraktivní techniky (zda dochází v průběhu procesu k depozici materiálu nebo jeho eliminaci, a litografické techniky [35]).

Litografie

Jako technika používaná u mikrotechnologií je soubor technik, které se používají k opracování definovaných oblastí povrchu substrátu prostřednictvím projekce definovaného vzoru na substrát. Často se používá projekce prostřednictvím: EM záření, části UV oblast (UV fotolitografie), Elektronového svazku (elektronová litografie – electron beam lithography EBL), Iontového svazku (Ion beam lithography IBL). Fotolitografie vyžaduje 3 základní kroky: nanosení fotorezistu na substrát (vytvoření tenké vrstvy z fotocitlivé emulze), Expozice rezistu skrz masku, Vyvolání rezistu v takzvaném developeru (dojde k odstranění požadovaných částí fotorezistu z povrchu substrátu). Pro optickou expozici je možné využít 3 různé způsoby: kontaktní – maska se dotýká rezistu. Nevýhodou je nižší životnost masky, protože se může poškodit, případně dochází k otiskům masky na rezist substrátu. Proximitní – maska se rezistu nedotýká a je vzdálená 20-50 μm od rezistu. Rozlišení je limitováno Fresnelovou difrakcí. Projekční – maska se přenáší bez kontaktu. Je zapotřebí optický projekční systém. Fotorezist je polymer, často na bázi pryskyřice, který obsahuje UV citlivý fotoinicátor a solvent. Solvent určuje viskozitu a tím i sílu nanosené vrstvy. Tloušťka se pohybuje od několika jednotek až desítek nanometrů až po stovky mikrometrů. Rezisty existují ve dvou hlavních typech: Pozitivní – přenesený obraz je stejný jako obraz na masce a negativní – obraz je opačný (reverzní). Litografické techniky možno různě dělit. Obecně je k nim možno zařadit: fotolitografie, UV litografie, deep UV litografie, soft x-ray litografie, X-ray litografie, elektronová litografie, litografie iontovým svazkem, litografie skenovací sondou, STM litografie, AFM litografie, templátová litografie – struktury se vytváří na základě deponovaného templátu, koloidní litografie, nanostencil (shadow mask) lithography, laser Interference lithography (LIL). [36–40]

Laminování

Skládáno z nezávisle řezaných vrstev. Využití například pro PCR, hematologie. Levná, rychlá, dostupná a jednoduchá výroba, škálovatelnost, v pásové výrobě desítky až tisíce čipů za minutu. Jednorázové čipy, princip většiny komerčních čipů. Omezení struktur na 50-200 μm . Plasty a termoplasty, adhezivní transferové pásky, polykarbonáty, PMMA, COC. Postup: Výběr materiálu, řezání, skládání (lepení). Řezání nožovým plotterem nebo CO₂ laserem. Problematické lepení, nerovnosti, nestejnorožé vrstvy, zarovnání, bubliny v termoplastech. [41–44]

Replica molding (soft litografie)

Pomocí fotolitografie vytvořená master forma ze které je čip odléván. Odléváno z PDMS nebo silikonů obecně. Na formu je nejčastěji používán negativní SU8 fotorezist (vysoké rozlišení a odolnost). Odlitek musí být dále kombinován se sklem/jiným polymerem. Dnes považováno za standart. Ve „špinavých místnostech“ rozlišení do 10um, v „čistých místnostech“ pod 15nm. Zahrnuje také microtransfer molding (razítka a otisky). Dobře mimikuje vnitřní prostředí organismů, nejčastěji využíváno v buněčných kulturách včetně 3D kultivací a scaffoldů, biomedicíně. Omezením je deformace patternů, undercut.... Nejvíce používáno ve výzkumu díky „jednoduché“ výrobě, biokompatibilitě, dlouhé výdrži, možnostem integrace ale postupně je nahrazována levnějšími materiály a technologiemi. Dostupné i komerčně. [45–49]

Microtransfer molding (μ TM)

Pomocí této techniky je možné vytvářet trojrozměrné struktury. Mikrostruktury jsou často tvořeny organickými polymery. Často jsou vytvářené s využitím PDMS formy [50].

Micromolding v kapilárách (MIMIC)

Tato technika je podobná technice microtransfer molding, kde se vzor vytvoří v PDMS, například pomocí fotolitografie. PDMS se položí na substrát a k otvorům v PDMS se nanese prepolymer (polyurethane (PU), polyacrylate, epoxy) s nízkou viskozitou. Ten se pomocí kapilárních sil nasaje dovnitř vytvořené struktury v PDMS. Polymerací (polymerace se může indukovat teplem, UV zářením) se vytvoří požadovaný vzor [51].

Solvent-Assisted micromolding (SAMIM)

Tato technika se podobá technikám lisování za tepla. Rozdílem je to, že změkčení polymerního materiálu dochází ne za tepla, ale použitím rozpouštědla. Připraví se substrát s polymerem, připraví se forma se solventem, otiskne se razítko, které obsahuje solvent pro polymer na substrátu, odpařením solventu je struktura připravena (otisknuta) [52].

Decal-transfer microlithography

Tato technika je založená na možnostech otisku struktury elastomeru na vhodný substrát. Dochází zde k silné adhezi elastomeru k substrátu a v určitých oblastech k jeho utržení. Tím se přenese struktura na substrát a zůstane jeho součástí [53].

Koloidní litografie

Koloidní litografie využívá koloidní roztoky obsahující monodisperzní mikro/nano částice, které jsou schopny samoorganizace na povrchu substrátu. Tím se vytvoří dvourozměrné pole, které tvoří masku pro samotné procesy litografie. Mezi výhody patří cenová dostupnost koloidních roztoků, malý objem pro vytvoření masky, jednoduchý proces vytvoření masky skrz samoorganizaci (dip/spin coating), rozměry je možné upravovat dle velikosti použitých koloidních částic, možno vytvářet 3D struktury [54].

Injection molding

První zmínky 1980. Sesterské technologie hot embossingu, používá termoplasty. Microinjection molding: roztavení termoplastu do komory, 2 poloviny formy jsou stlačeny k sobě a termoplast je vstříknut a vyplní formu, vyhlazení termoplastu a vyjmutí. Formy pro vstřikování ze silikonu i kovů,

rozlišení závisí na formě, je nutné dávat pozor na undercut. V dnešní době snaha snižovat cenu a čas výroby, a vyrábět superhydrofobní čipy pro celou krev. Slibná technologie do budoucna ale je vykoupená vysokou počáteční cenou, vysokou cenou výroby, nevhodnost pro masovou produkci. Předpokládá se silná kompetice s 3D tiskem. [55–58]

Hot embossing

Využívá termoplasty PMMA, polykarbonát, COC, PET. Termoplastická fólie je umístěna mezi 2 formové inserty, potom je komora vyčerpána, zahřáta a stlačena, forma je vychlazena a slave vyndán. Efektivní a precizní, vhodné pro masovou výrobu, tudíž používáno společnostmi. Výhody nad microinject molding, malé cestovní vzdálenosti pro horký plast (snížení stresu), menší tepelná roztažnost plastu zabraňuje deformaci, nižší cena než microinjection molding. Nevýhody, obtížná tvorba 3D struktur. Využití hlavně pro DNA analýzy, nanoelectroforéza... Předpokládá se vyšší využití metody v laboratořích do budoucna. [59–61]

3D tisk: FDM

Nejrozšířenější masově rozšířený 3D tisk. Začátek 2002. Velice problematický ale potenciál tisknout hydrogely, bakterie nebo tkáně... Využití immunohip Kadmisetty. [62–65]

3D tisk: Stereolitografie

Optický proces po vrstvách. SLA nebo DLP. DLP závisí na výšce objektu nikoliv jeho 2D rozměrech. Princip polymerizace fotopryskalice (photoiniciátor + photopolymer), často přes UV ale i delší vlnové délky. SLA používá LED diodový laser galvanické zrcadlo (často komerční tiskárny). DLP pattern maskovaný DMD (digital micromirror display). Lze tisknout free surface nebo constrained surface (více používán). Problémem mohou být odtrhávající síly. Recentní nový přístup CLIP technologie využívané společností Carbon3D, jedná se o bezodtrhovou technologii (inhibice polymerace na povrchu desky). Tak jako tak časté problémy s biokompatibilitou. Většina věcí jsou jen proof of concept, není vyloženě žádné převratné uplatnění na trhu. [66–69]

3D tisk: Multi jet modelling (MJM)

Také nazýváno polyjet. Photoresin je vystřikován tryskou ve formě kapek na již dříve zpolymerovanou vrstvu a okamžitě vytvrzeno světlem. Vysoká přesnost a možnost tisknout více materiálů v rámci 1 tisknutého objektu. Nutný tisk s podporami jako je například vosk. Tiskárny jsou drahé a mají problém s rozměry pod 1 mm. [70–72]

3D tisk: Dvoj fotonová polymerizace (two-foton polymerization, 2PP)

Základ vychází z DLW (direct femtosecond laser writing) až pro nanometrové struktury. Extrémně drahé tiskárny a materiály. Singlephoton nebo multiphoton polymerizace. Photoiniciátor absorbuje 2 fotony najednou, aby zahájil polymeraci nebo jeden foton pro mezi stav a pak druhý pro polymeraci. Často nutnost 2 zdrojů světla, uplatňuje se princip nelineární intensity. Světlo ve femtosekundových záblescích produkované Ti:safírovými lasery nebo fs-lasery. Stage pohybována piezoelektrickými akutátory (1nm) a galvanickými zrcadly. Velice pomalý tisk. Technologie stále hodně ve vývoji, ale má největší 3D tiskový potenciál díky kvalitě a až nm rozměrům. [73–75]

Nanofabrikace

2 přístupy: top-down a bottom-up. Top-down mají dobrou kvalitu distribuce vzoru a jeho velikosti a často zahrnují nějakou formu fotolitografie. Fotolitografie je serializovaná a pomalá, náchylná na defekty masky. Bottom-up spoléhá na samoskladné vrstvy atomárních a molekulárních bloků, tvoří tak vysoce opakovatelné a periodické struktury. [76]

Extrémní ultrafialová litografie (EUV)

Jako standartní fotolitografie ale využívá světlo o délce 13nm. Princip xenonové plasmly iluminované laserem. Ta svítí, světlo zachycováno zrcadly a směřováno na masku ve formě paprsku (řádově dvojciferné nm šířky). Použití v mikrofluidice je vzácné ale je možné dělat například nanosloupy. V praxi industriálně využíváno pro tvorbu mikročipů a tištěných spojů, PCB desek atd. Využívají například firmy IBM a Intel. [77–79]

Electron beam lithography (EBL)

Odvozeno od vývoje SEM, využívá zaměřený paprsek elektronů přímo do rezistu. Velmi pomalá metoda. Extrémně malé struktury, méně než 10 nm. Na rozdíl od klasické fotolitografie nejsou optické prvky, a tudíž nenarazí na difrakční minimum. Nepravděpodobná adopce do výroby, moc se nevyužívá, když už, tak jen na konkrétní části nebo struktury většího celku. [80–82]

Nanoimprint lithography (NIL)

Technika, která byla vyvinuta jako alternativa k hot embossing technice pro vytváření nanopaternů do termoplastických materiálů. Obecně je využívána pevná forma z křemíkového waferu, na kterém je vytvořen vzor, který se otiskne do polymeru. Polymer je zahřátý na vyšší teplotu, aby změkkl a měl možnost dostat se všude do oblasti formy. Tlak se udržuje na hodnotě tak, aby se vytvořila ještě reziduální vrstva polymeru, která se následně leptá pomocí RIE, aby se odkryl substrát. NIL je podobná s fotolitografií, ale její výhodou je, že překovává nevýhody difrakce a rozptylu světla a že umožňuje paralelní proces s výrobou nanostrukturovaných povrchů. NIL se rozlišuje na: T-NIL – použití termoplastického materiálu, který se musí zahřát (thermo-NIL), UV-NIL – použití křemenného krystalu jako formy a UV citlivého polymeru, Soft UV-NIL – použití elastomeru jako formy a UV citlivého polymeru. [83–86]

Anodic Aluminium Oxidation (AOO)

Vhodné pro membrány, nebo samoskladné opakované patterny pilířů. Aplikace je limitovaná ale potenciál existuje pro nanofluidiku. Hliník je vložen do kyselého elektrolytu s procházejícím proudem, pak se na hliníku na anodě začnou vytvářet hexagonální póry, poté je naprášena na hliník vrstva jiného kovu (např. zlata) a zalita rezistem, vzniknou tak sloupky. Na membrány používá např. GE Whatmann. [87–91]

Screen printing

Tlustovrstevné technologie využívají technologie sítotisku k produkci vzoru na různých typech substrátů. Častým materiálem je pasta obsahující různé materiály (Au, Ag atd.), případně koloidní roztok, pomocí kterých se vytvářejí vrstvy silné několik jednotek až desítek mikrometrů. Pro srovnání, u tenkovrstevných technologií dosahují deponované vrstvy několik jednotek až stovek nanometrů. Tlustovrstevné technologie se využívají zejména pro výrobu různých typů senzorů [92].

Samoskladné vrstvy

Koncept samoskladných struktur se hodně studuje v biologických procesech. Příkladem je folding proteinů, vytváření helixu u DNA, vytváření membránových dvouvrstev z fosfolipidů. Samoskladnost je spontánní organizace molekul nebo malých objektů dostabilní, dobře definované struktury, prostřednictvím nekovalentních interakcí. Pro mikro a nano technologie je důležitým hnacím mechanismem výroba sofistikovaných povrchů s požadovaným tvarem. K tomu se často využívá samoorganizace molekul na kovových površích. Příkladem mohou být alkanetioly na površích zlata nebo stříbra a alkylsiloxany na površích Si/SiO₂. Jednoduchost přípravy, dobrá stabilita, nízký výskyt defektů [93].

Microcontact printing (μCP)

Metoda, při které se elastomer využívá jako razítko. Elastomer se pokryje materiálem, který má být otisknut, podobně jako klasické razítko. Otiskem elastomeru se materiál přenáší na substrát dle vytvořeného reliéfu [94].

Mikroobrábění

Lze dělit na subtraktivní a aditivní procesy.

Subtraktivní procesy: používají se, když je na substrát přenesen požadovaný vzor a je potřeba ubrat materiál. Rozlišujeme zejména procesy leptání: suché leptání, mokré leptání. K procesům suchého leptání můžeme zařadit procesy využívající: elektrický výboj (plasma etching – PE), reaktivní iontové leptání (Reactive ion etching - RIE), hluboké reaktivní iontové leptání (Deep reactive etching - DRIE) / Boshův process, fyzikální naprašování (physical sputtering – PS), iontový svazek (Frézování iontovým svazkem (Ion beam milling – IBM), reactive ion-beam etching – RIBE, chemical assisted ion-beam etching – CAIBE). Důležité pro leptání jsou profily leptání: isotropický (výsledkem je možnost podleptání masky) a anisotropický (výsledkem kolmé stěny).

Mokré leptání je subtraktivní isotropní proces, který se často využívá pro leptání kovových tenkých vrstev nebo leptání základního materiálu (křemíkový wafer, sklo...). Pro leptání křemíkového waferu se využívá kombinace: kyseliny dusičné a fluorovodíkové, hydroxidu draselného a vody, TMAH (trimethylanilinium hydroxide). Pro leptání skla se často využívá kyselina fluorovodíková [95].

Rozprašování je proces, kdy jsou atomy pevného materiálu vyražené prostřednictvím vysokoenergetických (velká kinetická energie) částic - iontů (například inertní plyny Ar) dopadajících na materiál. Tento proces často probíhá v plazmatu a dochází při něm k erozi materiálu. Používá se v procesech suchého leptání nebo také depozice tenkých vrstev materiálů (naprašování). Podmínky jsou nízký tlak a delší dráha letu částic erodujícího materiálu [96].

Reaktivní iontové leptání RIE je technika, která patří k technikám suchého leptání. Plasma je vytvořena ve směsi plynů pomocí radiofrekvenčního zdroje, tím se vytvoří z plynu ionty. Ty jsou akcelerovány směrem k povrchu obráběného materiálu, na povrchu kterého dochází k chemické reakci a dochází tím k leptání a vytváření nových produktů. Fyzikální část RIE se podobá procesu naprašování v plasmě. Proces RIE má mnoho parametrů, aby chemická a fyzikální část byly v určité rovnováze [97].

Variantou je hluboké reaktivní iontové leptání DRIE, pomocí kterého je možné leptat až několik stovek mikrometrů materiálu. Tento proces vychází z patentovaného Boshova procesu.

Používá se Inductively coupled plasma ion etcher (ICP/RIE), který kontroluje plasmu dvěma způsoby. Magneticky – magnetické pole (energie plasmy – atomární částice plasmy) a elektricky – elektrické pole (poskytuje částicím hybnost). Magnetická indukce napomáhá zvyšovat hustotu plasmy při nízkém tlaku. Výhodou je leptání bez ohledu na orientaci krystalu [98, 99].

Mezi subtraktivní techniky založené na fokusovaném svazku patří: laserové obrábění (laser ablation/laser machining). Obrábění fokusovaným iontovým svazkem – (focused ion beam (FIB) milling). Podstatou těchto technik je, že využívají fokusovaný svazek (laser, iontový svazek), který má definované vlastnosti [100].

Techniky mechanického opracování materiálů jsou založeny na mechanickém smykovém napětí a zlomu materiálu. Obvyklé rozměry tohoto typu opracování jsou větší než rozměry molekul (plazmové subtraktivní techniky). Patří mezi ně: precizní strojové mikroobrábění nebo abrazivní tryskové frézování (Jet milling/powder blasting) - metoda, která využívá proud abrazivních mikročástic (pod tlakem) k povrchovému frézování materiálu [101].

Aditivní procesy: jsou charakteristické přidáváním materiálu v průběhu procesu. Mohou deponovat materiál na celý povrch substrátu, nebo jej deponovat selektivně. K tomu se využívají různé přístupy. Mezi tyto procesy patří depozice odpařením z pevné fáze – physical vapor deposition (PVD), chemická depozice z plynné fáze – chemical vapor deposition (CVD), oxidace, galvanická depozice.

Epitaxe je proces, který znamená růst (vytváření nebo vrstvení) tenkých vrstev nad vrstvou, která má pevně danou krystalickou strukturu. Samotné slovo znamená uspořádání na základě nějakého vzoru. Je to aditivní metoda, která se využívá pro růst krystalického křemíku, jehož základem je křemíkový wafer (ten již má pevně danou krystalickou strukturu) - homoepitaxe. Epitaxní vrstva je typicky 1-20 μm tlustá. Proces epitaxe může být prováděn z plynné nebo kapalné fáze. U křemíku to je často z plynné fáze (chemical vapour deposition - CVD). Například produkce plošného tranzistoru typu NPN [102, 103].

Tepečná oxidace je proces, při kterém dochází k růstu oxidu na povrchu waferu. Proces probíhá při vysokých teplotách (850-1150 $^{\circ}\text{C}$) za přítomnosti O_2 nebo vodních par [104, 105].

Metoda Physical vapor deposition (PVD) umožňuje deponovat materiál z terčíku nebo jiného zdroje, ze kterého se požadovaný materiál uvolňuje. Nejvyužívanější metody zahrnují: odpařování (evaporation), naprašování (sputtering), materiál se uvolňuje z povrchu zdroje dopadem iontů, pulzní depozice laserem (Pulse laser deposition PLD) [106].

Chemical vapour deposition (CVD) metoda je vhodná v případě, že vyžadujeme přesnou stechiometrii deponovaného materiálu. Výhodou ve srovnání s oxidací je, že materiál se deponuje a neroste. Využívá se směs chemicky reaktivních plynů, která se zahřeje na vysokou teplotu 900 – 1100 $^{\circ}\text{C}$. Reakční složky jsou přiváděny v plynné fázi. Deponovaná vrstva vzniká na povrchu substrátu heterogenní reakcí [107].

Depozice tenkých filmů s tloušťkou více než 1 mikrometr je neefektivní. Proto se k depozici kovů využívají techniky galvanického pokovování – electroplating. Dosahuje se tím tloušťky několika jednotek až stovek mikrometrů materiálu. Jedná se o proces, u kterého se ionty kovu z roztoku deponují na povrch elektrody. Oxidace atomu kovu na jedné elektrodě a přechod do roztoku a redukce atomu kovu na druhé elektrodě z roztoku. Pokovování z roztoku může probíhat i bez

elektrodepozice (electroless plating). Nevýhoda je pomalá depozice vrstvy kovu. Pro electroplating se využívají jako masky rezisty. Fotorezist vytvoří pattern v oblasti, která má být pokovená. Před nanesením rezistu se často deponuje tenká vrstva kovu jako takzvaná seed layer [108].

Lithographie Galvanoformung Adformung(LIGA) je proces, který má několik kroků. Součástí je electroplating. Původní proces využívá rentgenová litografie v kombinaci s PMMA – X-ray LIGA. Výhodou je produkce vysokých struktur. UV-LIGA – využívá tenký rezist (například SU-8) v kombinaci s UV litografií [109].

Spájení substrátů se využívá při kompletaci a balení hotových výrobků. Mikrosystémy často sestávají z mnoha částí, které jsou navzájem spojeny. Pro spájení se využívá vícero technik a to v závislosti na typu materiálu, aplikace... Fusion bonding – spájení křemíkových substrátů. Nutnost vysoké planarity substrátů. Anodic bonding – spájení křemíku a skla bohatého na sodík, případně křemenného skla. Low temperature glass bonding – spájení různých typů skel při teplotě blízké se teplotě tání skla. Také nutnost vysoké planarity substrátů. Eutectic bonding – využití eutektického chování, kde je spájení dosaženo difúzí dvou materiálů za vzniku slitiny. Takto je možné vytvářet stálé hermetické spoje. Například při použití zlata je eutektická teplota 363°C (zlato 1064°C, křemík 1410°C). Nutností je specifický poměr obou prvků. Adhesive bonding – použití lepidel. Nejjednodušší metoda spájení. Nemožno dosáhnou hermetického utěsnění (lepidla jsou polymery). Spoje jsou méně stálé, v čase mohou měnit své vlastnosti. Využívají se například epoxidové pryskyřice, UV citlivá lepidla a jiné organické materiály [110–112].

Papírové čipy

Skládání do 3D prostoru jednotlivých vrstev na sebe. Vrstvy vyráběny metodami [113–116]:

Wax printing: rychlé, levné, tisknutí vosku na nitrocelulózu.

Inkjet printing: tištění hydrofobních a hydrofilních chemikálií na papír, možné nasprejovat i polovodičové můstky.

Fotolitografie: fotolitografie za použití hydroxypropyl celulózy.

Flexographic printing: roll-to-roll přístup tisku polystyrenového ohraničení na papír.

Ošetření plasmou: papír pokryt octadecyltrichlorsilanem pak přes masku ošetřen plasmou.

Ošetření laserem: nanesen fotopolymer, pak vytvrzen laserem.

Mokrý leptání: papír napuštěn trimethoxyoctadecylsilanem, poté je přes masku penetrován roztokem NaOH.

Screen printing: karbonové elektrody jsou přímo natištěny na celulóžový papír.

Wax screen printing: natištění vosku přímo na papír, pak zahřátí aby se vsákl do papíru.

Další metody, které je možné využít při tvorbě mikrosystémů

Při výrobě mikrosystémů je možné využít i mnoho dalších metod, které ovšem nejsou v takové hojnosti využívány nebo jsou omezeny na konkrétní aplikaci, případně využívají konceptu „do-it-yourself“. Mezi tyto metody můžeme zařadit např. water jetting, zalití 3D tisknutého pozitivu do PDMS a jeho rozpuštění, tavení drátů do vosku... [33].

Kontrolní otázky: Vyjmenujte alespoň 3 metody výroby papírových čipů. Popište princip litografie. Popište výhody a nevýhody 3D tisku.

Základní techniky biopatterningu a přípravy bioaktivních povrchů.

Interakce mezi povrchem a biomolekulou.

Biomolekuly vždy interagují s povrchem pevné látky a to zejména způsobem, že se k němu vážou, adsorbují na pevný povrch. Tyto interakce mohou způsobit změnu tvaru molekuly, která v krajních případech může vést až ke ztrátě její bioaktivity, denaturaci. Adsorpce může být způsobena: fyzikálními silami – fyzisorpci (nestabilní interakce, interakce se může měnit s povrchem v závislosti na prostředí), chemickou vazbou mezi molekulou a povrchem – chemisorpci.

Fyzisorpce: důležitá přítomnost prostředí obsahující vodu. Samotný jev je způsoben různými silami a to: Van der Waalsovými silami – predikce ve vakuu je jednodušší, v přítomnosti vody a případně dalších složek roztoku je situace komplikovanější. Elektrostatickými silami – biomolekuly jsou různě nabitě molekuly a interakce s povrchem může být ovlivněna koncentrací biomolekul, iontovou silou roztoku, pH, funkčními skupinami samotného povrchu. Ve fyziologickém roztoku se tyto interakce složité predikují, protože je ve hře mnoho proměnných. Vodíkovou vazbou a hydrofóbními/hydrofilními interakcemi. Existují také jevy, které fyzisorpci znesnadňují. Patří mezi ně: eluce, opačný jev, při kterém molekula opouští povrch pevné látky. Je způsobena termodynamickou fluktuací molekul a může být vyvolána například změnou rozpouštědla (etanol za vodu), kdy se naruší vodíkové můstky a elektrostatické interakce. Nebo pokud existuje jiná molekula, na kterou povrch pevné látky působí větší silou a ta se váže na povrch s větší preferencí. Fyzisorpce je vždy přítomna při interakci mezi biomolekulou a povrchem pevné látky a nevyžaduje zvláštní postupy či vybavení pro stimulaci, využívá se pro úpravu mnoha známých povrchů látek jako je sklo nebo polystyren, předem nevyžaduje povrchové úpravy materiálu, i když ve skutečnosti je lepší vlastnosti povrchu materiálu, na který látka adsorbuje upravit (například využitím plasmy). Na rozdíl od fyzisorpce, chemisorpce vyžaduje: speciální substrát nebo úpravu jeho povrchu pro vytvoření kovalentní vazby, vyžaduje speciální vybavení pomocí kterého možno provádět reakce na povrchu pro jeho modifikaci, případně vyžadující chemické reakce (odtah, odpad), výhodou je, že chemisorpce vytváří stabilní ukotvení biomolekuly k povrchu, ale mnoho molekul může adsorbovat na ukotvené molekuly a tím upravovat povrch, případně znemožnit vytvoření „monovrstev“ a tím ovlivňovat celkovou stabilitu povrchu a vzhledem k tomu, že je obvykle zapotřebí použít víc než jednu funkční skupinu pro chemickou vazbu, může docházet k vazbě i jiných molekul, než těch které jsou požadované a případně vázané molekuly mohou navzájem crosslinkovat. I když je pevně kovalentně vázaná molekula na pevný povrch, může přirozeně degradovat a tím měnit požadované vlastnosti na povrchu hydrofilní a hydrofobní interakce. Jednou ze základních vlastností povrchu materiálu pro interakci s biomolekulou je jeho hydrofilní (smáčivý povrch) / hydrofobní (nesmáčivý povrch) charakteristika. Tyto vlastnosti je možné charakterizovat interakci kapky vody s povrchem materiálu. Kvantitativní stupeň hydrofilicity/ hydrofobicity měříme tzv. kontaktním úhlem. Ani jeden extrém, maximálně hydrofilní / hydrofobní, neurčuje sklon biomolekuly k fyzisorpci na povrch látky. Obecně, pro fyzisorpci biomolekul na různé typy povrchů je nejvhodnější mírně hydrofobní povrch (vlastnost zejména organických polymerů). [117–122]

Příprava povrchů – zabránění fyzisorpci: předpokladem pro definované patternování substrátu je nejenom tvorba oblastí umožňujících fyzisorpci, ale strategií je také vytváření oblastí, které nejsou prospěšné pro fyzisorpci (blokování povrchu). Příkladem mohou být imunotesty. Protilátky jsou schopné vázat se nejenom na antigeny, ale také k různým povrchům mohou při testech vykazovat signál i u testů, které nijak nesouvisí s jejich interakcí a antigenem, nebo naopak. Důvodem může

být jejich nespecifická vazba na povrch, kde se nenachází antigen. Proto je vhodné při podobných typech testů povrchy blokovat. Častým blokátorem je protein albumin nacházející se v krevní plasmě. Protože se získává ze skotu, označuje se jako BSA. Mezi další známé blokátory povrchu patří acetát celulózy, agaróza, PEG, polymery fluorokarbonu, PVA. [123, 124]

Příprava povrchů – SAMs: některé organické molekuly jsou schopné vytvářet na površích velmi kompaktní monovrstvu, které říkáme samoskladná. Vzniká interakcí mezi povrchem a skládáním organických molekul z roztoku tak, aby minimalizovali volnou energii povrchu formování tenké monovrstvy (struktura podobná krystalu). Tento proces se děje na povrchu spontánně, proto je nazýván samoskladný. Nejčastější molekuly jsou alkantioly, alkansilany (siloxany), alkanfosfát, alkanisonitrily, alkankarboxylové kyseliny... Vytváření monovrstev může sloužit k tomu, abychom zavedli reaktivní skupinu na požadovaný povrch nebo abychom modifikovali vlastnosti povrchu jako například adhezi, smáčivost, adsorpci vybraných molekul apod. [125–127]

Příprava povrchů – využití croslinkerů: pro biopatterning je důležitý nejenom vhodný povrch, nejčastěji v podobě SAMs, ale také funkční molekula, která způsobuje vazbu biomolekuly k modifikovanému povrchu. Molekulu, která má funkci mostu mezi kotvenou molekulou a povrchem v podobě chemické vazby nazýváme croslinker. [128]

SAMs micropatterning: formování SAMs při vytváření mikropatternů probíhá na molekulární úrovni. Vytvářené vzory jsou závislé jenom na oblasti již vytvořených SAMs. Mezi hlavní přístupy vytváření mikro vzorů pomocí SAMs možno zařadit využití fyzických bariér (fotorezist, stencil maska, mikrokanálky) nebo patternování již vytvořeného mikro vzoru (například pokovené oblasti na substrátu). Molekuly vytvářející SAMs tak reagují jenom s jedním typem materiálu a je možné tak na velké ploše vytvořit mikrovzory SAMs. Možno například potahovat zlaté elektrody na skle tioly. Nastavením silného redukčního potenciálu možno selektivně formovat SAMs z různých materiálů. Mikro otisk razítky využívá elastomerní razítka, pomocí kterých dochází k přenosu molekul na substrát. Děje se tak kontaktem se substrátem a to jenom v oblastech, kde dochází ke kontaktu substrátu a razítka. Možno využít tioly (například z roztoku etanolu) na zlatě, silany (nevhodné je vlhké prostředí) na křemíku a jeho oxidech, fosfoniové kyseliny na hliníku a podobně. Kvality SAMs vytvořených otiskem je podobná jako SAMs vytvořené přímo z roztoku. Selektivní odebrání SAMs po jejím celoplošném formování (například zářením) může být provedeno, ablací laserem, iontovým svazkem, degradací elektronovým svazkem, elektrochemickou desorpcí pomocí hrotu STM, mechanickým narušením hrotem AFM, leptáním v plasmě pomocí masky. [129, 130]

Mikropatterny proteinů: je možno vytvářet několika různými přístupy. Využitím UV nebo fotolitografie, microstampingem, využitím mikrofluidních kanálků nebo využitím SAMs. [131–133]

Mikropatterny pomocí fotolitografie: využití UV záření pro vytváření mikrovzorů na povrchu substrátu možno rozdělit na přístupy využívající fotolitografické metody v kombinaci s tvorbou SAMs a přístupy využívající fotoreaktivní skupiny vázané na proteiny. Fotoreaktivní proteiny však není snadné vyrobit. [134]

Mikropatterny pomocí razítek (microstamping): vytváření mikro vzorů pomocí razítek je nazýváno microcontact printing (microstamping). Jako materiál se využívá PDMS. Možné problémy při otisku vzorů: molekuly mohou postranně difundovat a měnit tvar vzoru. Manuální tlak na razítko způsobuje distorzi tvaru, v případě nutnosti velké čistoty povrchu může být problémem přenos molekul PDMS na substrát. [135–137]

Mikropatterny pomocí mikrofluidních kanálků: uspořádáním mikrokanálků nad konkrétním povrchem, zejména z PDMS, je další z možností tvorby mikropatrnů. Problémem může být možná ztráta proteinů, které adsorbují na povrch kanálků nebo neproniknou do jeho celé hloubky. Nerovnoměrné pokrytí povrchu v celém rozsahu kanálku. U kapilárního vztlínání není vždy jednoduché promýt a vyměnit médium. Je poměrně složité vytvořit síť vhodných kanálků, které mohou vytvořit vhodné 2D uspořádání. [138]

Ukotvení buněk k povrchům: adheze buněk k povrchům je zprostředkována membránovými receptory na povrchu buněk. Tyto receptory rozeznávají substráty jako vhodné nebo nevhodné pro přichycení buňky k povrchu. U mnoha buněk jsou právě signály o množství adheze k vhodnému substrátu determinující život buňky. V případě, že se buňka nemůže uchytit k substrátu, často umírá. Integriny jsou transmembránové proteiny vázané na cytoskelet v cytoplasmě buňky, rozeznávají specifické peptidové sekvence ve fibrilární struktuře proteinů a polysacharidů známé jako extracelulární matrix (ECM). Vytvářejí tak mechanické propojení mezi buněčnou membránou a ECM (protože jsou vázané na cytoskelet, tak tedy také mezi cytoskeletem a ECM). Integriny jsou schopné organizovaně agregovat do struktur, které umožňují různé typy buněčných spojů, mezi které patří například fokální adheze. Integriny rozeznávají typické peptidové sekvence odpovědné za uchycení buněk k povrchu například arginin-glycine-asparticacid (RGD) přítomné v kolagenu a fibronectinu nebo tyrosine-izoleucine-glycine-serine-arginine (YIGSR) přítomné v lamininu. [139]

Kontrolní otázky: Co je to fyziosorpce? Jaké jsou nevýhody mikropatternování pomocí razítek? Jakým způsobem je možné ukotvit buňky k povrchu.

Základy fyzikálních principů využívaných v mikrofluidice pro oblast biotechnologií.

V mikrofluidice se na hmotu stále nahlíží z pohledu kontinua. Znamená to, že i navzdory nízkým objemům kapaliny, která se vyskytuje v kanálcích je jí stále dostatek k tomu, abychom na kapalinu nenahlíželi jako na jednotlivé molekuly, ale jako na celek. To znamená, že ve všech místech má stejné vlastnosti. Vztah mezi mikro a nano měřítkem se vyjadřuje tzv. Knudsenovým číslem, které určuje, kdy ještě teorie kontinua pro kapaliny může být použita. V mikroměřítku dosahuje nízké hodnoty a kapalina je považována jako jeden systém bez rozlišování systému na jednotlivé diskrétní prvky, molekuly. Obecně: $Kn < 0,01$, pro popis dynamiky kapalin, je vhodná aproximace kontinua, $Kn \approx 1$ a $Kn > 100$, pro popis dynamiky kapalin je vhodnější aplikovat modely diskrétní a použít statistické metody. Základní vlastnosti kapalin: tlak – dynamická proměnná (síla na jednotku plochy). V mikrofluidice je statický tlak hybnou silou kapalin v mikrokanálcích. Hustota – hmotnost na jednotku objemu. Mění se s teplotou a tlakem. Kapaliny jsou nestlačitelné, proto vykazují konstantní hustotu. S hustotou souvisí hydrostatický tlak. Teplota – teplotou možno kvantifikovat vnitřní energii kapaliny. Teplotní gradient způsobuje přenos tepla a může souviset s pohybem kapaliny. Viskozita – schopnost odolávat pohybu v závislosti na smykovém napětí. Důsledkem je rychlostní gradient v průřezu kapalinou. Tepelná vodivost – v systému se může vyskytovat tepelný tok. Tepelná vodivost je také závislá na teplotě a tlaku podobně jako viskozita. Povrchové napětí – soudržné síly umožňují molekulám kapaliny udržovat jejich objem a tak vytváří rozhraní (analogie membrány na povrchu). Young-Laplaceova rovnice vyjadřuje rozdíl tlaku mezi vnitřním a vnějším prostředím kapaliny. Kontaktní úhel – úhel na rozhraní solid/liquid/gas. Hydrofobní a hydrofilní vlastnosti povrchů.

Proudění kapaliny: režimy proudění kapaliny se obecně popisují jako: laminární - proudnice jsou rovnoběžné a nemísí se. Částice proudí po sobě po vrstvách a nepromíchávají se. Dochází k vnitřnímu tření jednotlivých vrstev a popisuje se Newtonovým zákonem viskozity. Přechodové proudění – představuje přechod mezi laminárním prouděním do turbulentního proudění. Turbulentní proudění – proudnice se navzájem promíchávají. Rychlost částic se nepravidelně mění. Pro určení vlastnosti proudění se používá bezrozměrné Reynoldsovo číslo, které představuje poměr mezi setrvačnými a vazkými silami. Nízké Reynoldsovo číslo představuje laminární proudění, vysoké turbulentní. V mikrofluidice dosahuje hodnoty menší než 0,5. Za těchto podmínek je možné uplatňovat Stokesovo pravidlo při popisu vlastností kapaliny.

Mísení kapalin v mikrofluidice: je problematické, proudění kapaliny je laminární. Mísení tedy obvykle probíhá: difúzí nebo konvekcí. Difúze je stochastický proces, který souvisí s pohybem částice v daném prostředí a je možno ho jednoduše popsat jako náhodný termální pohyb každé přítomné částice. Konvekce je vzájemný pohyb celé skupiny částic, které se navzájem mísí. Vztah mezi konvekcí a difúzí se vyjadřuje Sherwoodovým číslem, které vyjadřuje poměr mezi konvektivním a difuzním přenosem hmoty. V makroměřítku je Sherwoodovo číslo velké a znamená, že konvektivní transport dominuje nad difuzním. V mikrofluidice, kde jsou malé rozměry, je toto číslo malé a difuzní vlastnosti začínají mít poměrně velký vliv na mísení kapalin, separaci...

Povrchové síly v mikrofluidice: při změně rozměrů se také projevuje změna chování kapaliny ve vztahu k přítomnosti povrchového napětí. Tento vztah popisuje Bondovo číslo, vyjadřuje vztah mezi gravitační silou působící na kapalinu a povrchovým napětím. Se zmenšujícími rozměry se Bondovo číslo zmenšuje. V mikroměřítku tedy pro chování kapalin nabírají na významu vlastnosti

povrchového napětí. Důsledkem jsou různé kapilární projevy kapaliny, vlastnosti smáčivosti povrchů.

Kapilární vlastnosti: jsou charakterizovány kapilárním číslem, které vyjadřuje poměr mezi viskózními silami a povrchovým napětím. Kapalina v nádobě se díky kapilárním jevům chová tak, že buďto smáčí stěny nádoby, částice kapaliny jsou přitahovány ke stěně nádoby nebo nesmáčí stěny nádoby, částice kapaliny jsou přitahovány od stěny nádoby. Pro kanálky velmi malých rozměrů je problematické tlakem nechat proudit kapalinu. U těchto rozměrů má kapilarita velký význam a proto je lepší využívat kapilární síly. Smáčivost je určena stykovým (kontaktním) uhlím. Zakřivení kapaliny mění tlak v kapalině (kapilární tlak).

Kapilární tlak: pro kanálky velmi malých rozměrů je problematické tlakem nechat proudit kapalinu. U těchto rozměrů má kapilarita velký význam a proto je lepší využívat kapilární síly.

Smáčivost: o smáčivosti hovoříme v případech, kdy jsou přítomná 3 rozhraní, například, mezi látkami v pevném kapalném a plynném skupenství (kapka vody na podložce). Všechna tři rozhraní jsou charakterizována povrchovým napětím. Vlastnosti povrchového napětí se významně využívají v tzv. droplet nebo digital mikrofluidice, kde se používají nemísitelné kapaliny pro tvorbu kapiček, ale také ve změnách smáčivosti kapalin vyvolaných elektropotenciálem (elektrowetting), v termokapilárním pumpování... Poměr setrvačných sil k povrchovému napětí vyjadřuje Weberovo číslo, pomocí kterého můžeme předvídat, kdy dojde k porušení rozhraní na základě velikosti setrvačných sil. Silné povrchové napětí udržuje kapičku jako samostatný objekt s konvexním rozhraním rozhraní. V případě velkého nárůstu setrvačných sil se stane povrch kapičky konkávní, až se úplně naruší.

Transportu kapalin: v kanálku je možno dosáhnout obvykle změnou tlaku na vstupu a výstupu případně dalšími jevy jako jsou difúze, elektrokinetické jevy (elektroosmóza, elektroforéza, dielektroforéza) změna povrchového napětí v závislosti na elektrickém potenciálu podél kapalného/pevného rozhraní, magnetoforéza.

Difúze: je proces samovolného rozptylování částic v prostoru. Veškeré látky mají tendenci přecházet z prostředí se svou vyšší koncentrací do prostředí s nižší koncentrací. Přirozenou vlastností látek je, že pokud se její částice mohou pohybovat (molekuly v nehybném roztoku se pohybují na základě náhodného pohybu), tak se rozptylují do celého prostoru, kterého mohou dosáhnout, a postupně ve všech jeho částech vyrovnají svou koncentraci.

Elektroosmóza: pohyb tekutiny vyvolán vnějším elektrickým polem. Používá se pro pumpování elektrolytů a pufrů v mikrosystémech. Tento způsob pumpování není vhodný pro systémy v makroměřítku, ale jednoduchý a elegantní pro použití v miniaturizovaných systémech. Jednou z výhod elektroosmózy je možnost vytvořit prostorově homogenní rychlostní pole tekutiny podél celého mikrokanálku. Proto je tento jev hodně využíván v oblasti separace. Elektroosmotické čerpání bylo integrováno v prvním komercializovaném LOC zařízení, a často se využívá v miniaturizovaných zařízeních pro elektroforetickou separaci.

Elektroforéza: když je nabitá částice (povrch) ponořena (v kontaktu) do elektrolytu, její náboj způsobí, že se vytvoří lokální elektrické pole a v blízkém okolí částice dojde k reorganizaci mobilních iontů a vytvoří difúzní dvojvrstvu. Elektroforéza je pohyb nabitých částic v elektrickém poli, kde jejich mobilita závisí na vlastnostech částic. V případě, že se jedná o efekt separace, hovoříme o elektroforetické separaci. Elektroforéza v mikrosystémech se využívá hlavně jako kapilární

elektroforéza. Představuje dělení ionizovaných molekul, které jsou připravené pro migraci podél kapiláry různými rychlostmi. Výhodou je hlavně malý objem potřený pro separaci a krátký čas. Proto je velmi významná v oblasti mikrosystémů.

Kapilární elektroforéza: v kombinaci s hmotnostní spektrometrií je důležitá například v oblasti proteomiky (tj. analýza proteinů v daném systému). Kapilární elektroforéza je zavedená, jako důležitá separační technika a používá se například pro určování genotypů, otcovství, identifikace jamek, a identifikaci GMO (geneticky modifikované organismy). Mezi výhody mikrofluidní elektroforézy patří možnost práce s velmi malými objemy kapalin, možnost integrace do různých zařízení, možnost paralelního dělení/detekce, možnost zkrácení času analýzy

Kapilární elektrochromatografie: je technikou kombinující chromatografii a elektroforézu. Podmínkou je vyplněná kapilára (mikrokanálek) separačním matrixem, který bude vystaven dlouhodobému elektrickému poli. Na začátek se aplikuje vzorek, který putuje kanálkem a na základě interakce s matrixem a vlastností daných zeta potenciálem je možno docílit separaci jednotlivých komponent vzorku. Výsledkem je lepší citlivost než u běžných chromatografických metod. Proto je využitelná pro separaci DNA nebo proteinů.

Dielektoforéza: v případě, že se jedná o neutrální částici, coulombovská síla na ní působící je nulová. V případě, že se částice bude nacházet v gradientu elektrického pole, objeví se dielektoforetická síla. Neutrální částice ve vnějším elektrickém poli vytváří dipól, polarizuje se. V případě přítomnosti gradientu elektrického pole, začne na částici působit síla, která způsobí její pohyb ve směru k maximu elektrického gradientu. V případě, kdy je polarizovatelnější kapalina, ve které se částice nachází, dojde k pohybu částic kapaliny, které sebou nesou částici k minimu elektrického gradientu. Dielektoforézu lze využít k manipulaci neutrálních částic v mikrokanálcích a tato vlastnost se využívá hlavně pro vyvolání pohybu buněk, jejich zachytávání nebo selekce (separace). V mikrokanálcích lze pomocí dielektoforézy také pumpovat kapalinu. Princip dielektoforézy je možné využít i pro mixování.

Electrowetting: Lippmannův zákon popisuje změny povrchového napětí kapky kapaliny na pevném povrchu za přítomnosti elektrického pole. Význam spočívá v tom, že kontaktní úhel kapky je možné měnit a změnou elektrického potenciálu podél kapičky je možné kapičkou pohybovat (vytváří se smáčivostní gradient).

Magnetoforéza: elektrokinetické jevy (například dielektoforéza) působí na všechny částice. Z důvodu specifity působící síly se hledají další možnosti působení na používané částice a jednou z velmi využívaných možností je využití magnetického pole působícího na magnetické částice.

Mixování v mikrofluidice: v mikroměřítku se u tekutin obvykle vyskytuje laminární tok, dochází k mixování hlavně díky volné difuzi. Protože difúzní proces je poměrně pomalý, problematika mixování je v mikrofluidice poměrně komplikovaná. 2 hlavní způsoby mixování tekutin: pasivní – neobsahuje mechanicky se pohybující části. K mixování dochází prostřednictvím difuze, přičemž se obvykle musí zvětšit kontaktní plocha mezi kapalinami a čas kontaktu mezi nimi a prostřednictvím advekce (efekt chaotického mísení), ke které dochází při různé manipulaci s laminárním tokem. Aktivní – na mísení se podílí aktivní části systému (elektrody, piezoelektrické aktuátory...) a obvykle se využívá efektu mísení na základě perturbace mikrofluidního toku kapaliny. Je možné využít i pohyblivé části, které musí být implementovány do čipu.

Kapitola čerpána z [140–144].

Kontrolní otázky: Jakým způsobem probíhá mísení a mixování kapalin v mikrofluidních kanálcích?
Co je to elektroforéza? Kde může najít uplatnění electrowetting?

Biosenzory, základní principy a typy biosenzorů pro detekci biologických a biochemických signálů.

BioMEMS jsou systémy, kde je důležitá složka biologická komponenta. Obvykle je nějakým způsobem analyzována jenom konkrétní složka, měřená její aktivita nebo probíhá komplexnější měření vlastnosti biologického systému. V oblasti BioMEMS, kde je důležitá analýza a měření vzorků jsou dostupné nové typy senzorů a často jsou kombinované s mikrofluidní platformou (součástí jsou mikrokanálky, mikropumpy, mikromixéry, atd.). Mezi nejdůležitější aplikace založené na BioMEMS patří biochemická a biologická analýza, MicroTotal analysis systems, Lab-on-Chips. Velkou výhodou BioMEMS je zejména nízký objem vzorků určených k analýze, snížený počet kroků určených k manipulaci se vzorky pro konkrétní analýzu, „lepší“ data jak po stránce kvalitativní, tak po stránce kvantitativní, snížení nákladů a času určeného k měření, zlepšení citlivosti a specifity prováděných analýz, proto BioMEMS možno v určitém smyslu chápat i jako senzorické systémy. BioMEMS mohou obsahovat celou řadu senzorů (mikrosenzorů), které se využívají v Labs-on-Chip (LOC), micro Total Analysis systems (μ TAS), implantovaná mikrozařízení, Point-of-care diagnostika, terapeutické nástroje...

Senzory: prostřednictvím senzoru probíhá konverze jedné formy energie na jinou. Senzor proměňuje měřenou veličinu na signál, který nese informaci. Tímto procesem senzor a sděluje informaci o různých stimulech: fyzikálních (akustických, elektrických, magnetických, optických, mechanických, tepelných, radiačních), chemických, biologických. K funkci senzoru je obvykle potřebná energie, případně senzor energii sám produkuje. Dle tohoto kritéria rozdělujeme senzory jako: aktivní senzory – vytvářejí elektrický signál (proud nebo napětí) na základě vnějších stimulů. Nepotřebují žádný další zdroj energie, aby mohli fungovat. Patří mezi ně například termoelektrický článek, piezoelektrický detektor. A pasivní senzory – ke své funkci potřebují vnější zdroj energie.

Druhy senzorů: různé druhy senzorů můžeme charakterizovat jako: smart sensor (inteligentní senzor) – mechanicky, elektricky a funkčně uzavřený celek (integrované zařízení), který v sobě obsahuje detekční část (samotný senzor), elektroniku (mikroelektronické obvody), řízení a případnou komunikaci s dalšími zařízeními v jediném celku. Senzorová pole – obsahují několik stejných nebo podobných senzorových struktur (částí) se stejnou nebo podobnou funkcí. Multisenzory – obsahují několik senzorových struktur (částí) s rozdílnými funkcemi. Multifunkční senzor – zařízení (integrovaný senzor), který může realizovat několik rozdílných snímacích funkcí za různých podmínek. Biosensor – analytické zařízení, které obsahuje biosenzorickou (senzor biologického původu) a převodníkovou část (převádí detekovaný signál na měřitelný signál).

Dělení senzorů dle různých kritérií: dle měřené veličiny: geometrické veličiny (poloha, posun...), mechanické veličiny (mechanické napětí, tlak, síla), teplotní veličiny (teplota, tepelný tok), elektrické veličiny (proud, napětí, odpor), magnetické veličiny, vyzařování (elektromagnetické v různých spektrech), chemické veličiny (různé koncentrace), biologické veličiny (afinitní reakce). Dle výstupní veličiny: elektrický signál (odpor, indukce), optický signál (barva), mechanický signál (posunutí). Dle typu převodníku: analogový, digitální. Dle principu převodu detekované veličiny na detekovatelný signál: fyzikální převod, chemický převod (chemická reakce), biochemický převod (biochemická reakce). Dle styku s prostředím: kontaktní, bezkontaktní. Dle transformace signálu: aktivní, pasivní.

Vlastnosti senzoru: ideální senzor může pracovat nepřetržitě a měřenou veličinu nijak neovlivňuje (je zde jednoznačná závislost výstupní veličiny na veličině měřené). Senzor má odpovídající, co možno nejvyšší citlivost. Senzor je rychlý, přesný a časem se jeho vlastnosti nemění. Senzor má vysokou selektivitu vůči měřené veličině, vysoký poměr signálu k šumu a jeho chování je reverzibilní. Senzor má předpověditelnou odpověď (lineární nebo nelineární). Senzor má vysokou spolehlivost. Je kompaktní a má jednoduchou obsluhu a údržbu (zaškolení obsluhy, kalibrovatelnost). Je odolný vůči okolnímu prostředí (vlastnosti okolního prostředí neovlivňují měřitelnost měřené veličiny). Je levný při pořízení i v nákladech na provoz.

Charakteristiky a parametry senzorů: možno rozdělit na statická a dynamické. Ze statických vlastností senzoru možno jmenovat: citlivost – nejmenší možná detekovatelná změna odpovědi senzoru vyvolaná změnou vstupního stimulu. Limit detekce (práh citlivosti nebo dolní detekovatelná mez) – nejnižší hodnota měřené veličiny, detekovatelná senzorem. Plný rozsah (horní detekovatelná mez) – maximální hodnota měřené veličiny, detekovatelná senzorem. Dynamický rozsah – interval dolní a horní hranicí měřícího rozsahu (rozdíl mezi limitem detekce a maximálním signálem). Linearita (chyba linearity) – maximální odchylka kteréhokoliv kalibračního bodu od odpovídajícího bodu na ideální statické přenosové charakteristice. Hystereze – maximální rozdíl ve výstupu při jakékoliv měřené hodnotě v daném rozsahu, ke kterému se hodnota přibližuje nejprve zvyšováním intenzity a následně snižováním intenzity stimulu. Rozlišení – je nejmenší inkrement výstupu senzoru, který senzor zaznamená při změně vstupu. Odpovídá absolutní nebo relativní chybě senzoru. Reprodukovatelnost – je dána odchylkou mezi naměřenými hodnotami, které byly měřené při neměnné vstupní veličině a neměnných rušivých vlivech v krátkém časovém sledu.

Dynamická charakteristika senzoru vyjadřuje časovou závislost odpovědi senzoru na měřené podněty, včetně dynamické chyby (rozdíl mezi referovanou hodnotou a skutečnou hodnotou stimulu v době kdy byl stimul zaznamenán). Senzor někdy potřebuje i tzv. zahřívací dobu – čas nutný k tomu aby senzor měřil hodnoty dle své specifikace. Frekvenční odezva určuje, jak rychle dokáže senzor reagovat na změnu vstupního stimulu. K dynamickým vlastnostem se obecně zařazuje zejména: přechodová charakteristika – průběh výstupní veličiny v závislosti na čase při skokové změně vstupní veličiny. Frekvenční charakteristika – závislost přenosu a fázového úhlu na frekvenci, tj. rozdíl amplitudy a fáze výstupního signálu oproti signálu vstupnímu v závislosti na frekvenci.

Další vlastnosti senzorů: mrtvé pásmo je rozsah hodnot stimulu, na které není senzor citlivý. Excitační energie je elektrický signál potřebný k činnosti aktivního převodníku. Zaměnitelnost je maximální možná chyba měření, kdy je senzor zaměněn za jiný, ale stejný typ v průběhu měření. Životnost je doba, po kterou zůstává senzor citlivý na stimuly, za předpokladu normálních podmínek. Opakovatelnost a reprodukovatelnost je schopnost senzoru reprodukovat měřený výstup za podmínek, kdy je stejný stimul měřen stejnou hodnotou měřené veličiny za stejných podmínek. Doba odezvy je čas, který je potřebný, určitá hodnota odezvy (většinou 90% konečné hodnoty). Výstupní impedance je elektrická impedance, která se dosahuje mezi senzorem a jeho elektrickým obvodem. Bod nasycení je bod, při kterém zvyšováním stimulu nepozorujeme nárůst měřených hodnot. Selektivita je potlačení rušení prostředí, například teplotou. Posun v senzitivitě je změna sklonu kalibrační křivky. Nulová hodnota měřené veličiny je nulový výstup, který musí senzor dosahovat, když není stimulován. Nulový posun nebo drift je změna nulového výstupu za specifických podmínek (teplota, dlouhodobé skladování, dlouhodobé užívání...). Biokompatibilita.

Základní rozdělení senzorů: senzory se tedy obvykle dělí dle energie primárního vstupu: tepelné senzory (teplota, tepelný tok a tepelnou vodivost), elektrické senzory, senzory pro měření radiace

(radiaci, jejich elektrický výstup je proporcionální naměřené radiaci), mechanické senzory (mechanické změny v materiálech, často deformaci, nebo posun mechanických částí senzoru), magnetické senzory (měří napětí/proud), chemické nebo biochemické senzory.

Využívané fyzikální jevy v senzorech: u senzorů a mikrosenzorů se využívají téměř všechny známé fyzikální a případně biochemické jevy. Vzhledem k možnostem jejich využití jsou vytvářené různé typy mikrosystémů, které jsou schopny tyto jevy zachycovat, sledovat a případně interpretovat. Mezi nejvyužívanější fyzikální jevy u mikrosenzorů možno zařadit: piezoelektrický jev – mechanická deformace krystalu působí dipólový elektrický moment. Vzniká elektrická polarizace materiálu. Piezoodporový jev – při mechanické deformaci vykazuje změnu elektrického odporu. Bolometrický jev – infračervené záření způsobuje změnu odporu polovodiče. Magnetoodporový – vnější magnetické pole kolmé k proudovým siločarám vyvolává stáčení magnetizačního vektoru v magnetoodporovém materiálu a tím i proudových siločar. To způsobuje změny ohmického odporu materiálu. Hallův jev – založen na interakci pohybujícího se elektrického náboje a vnějšího magnetického pole. Dochází k indukci Hallového napětí, kterého polarita je závislá na směru průtoku proudu a směru magnetické indukce. Seebeckův jev – dva vodiče z různých elektricky vodivých materiálů v uzavřeném obvodu se spojí s různou teplotou - obvodem protéká elektrický proud. Peltierův jev – umožňují proměnu elektrické energie na tepelnou a naopak. Pyroelektrický jev – schopnost pyroelektrického materiálu generovat elektrický náboj jako odezvu na tepelný tok. Teplotní závislost polarizace materiálu, kde se náhodně orientované elektrické dipóly materiálu mění působící teplotou. Magnetostrikční jev – působením magnetického pole dochází ke změnám geometrických rozměrů. Podobný piezoelektrickému jevu. Elektrostrikční jev – působením elektrostatických sil vyvolaných volným nábojem na povrchu materiálu dochází ke geometrické deformaci materiálu.

Prvním biosenzorem byl glukóza oxidázový amperometrický biosensor publikovaný roku 1962 Clarkem a Lyonsem. Tento typ biosenzoru byl také prvním komerčně dostupným biosenzorem [145].

Biosenzory dle bioreceptoru: můžeme rozdělit na dvě velké skupiny, a to na biosenzory využívající biokatalytické rekogniční části – využívají například enzymy, buňky, tkáně. Afinitní rekogniční části - bioreceptor rozeznává a váže specifickou cílovou látku s vysokou afinitou. Tyto biosenzory pracují na základě interakcí mezi biomolekulami a látkami přítomnými v analytech (často interakce protilátky antigenu, proteinových receptorů, které nemají imunitní původ nebo vazebné interakce nukleových kyselin. Značené – používají značky (enzymy, fluorescenční barviva, nanomateriály). Neznačené – bez značek

Dle konkrétního typu bioreceptoru: se biosenzory dělí také na: enzymatické biosenzory, imunoafinitní biosenzory, interakce nukleových kyselin, buněčné biosenzory, biosenzory využívající interakce biomimetických materiálů (syntetické bioreceptory)

Imobilizační techniky: nejvhodnější poloha biorekogniční části je v co nejbližším místě, kde je převodník, případně přímo na něm. Způsob umístění biorekogniční části biosenzoru se nazývá imobilizace. Pro imobilizaci je důležité, aby si biorekogniční část zachovala stabilní formu s dostatečnou aktivitou a rekogničními vlastnostmi pro citlivou detekci i po imobilizaci. Rozeznáváme několik typů imobilizačních technik, a to imobilizace: fyzikální nebo chemická adsorpce – jde o adsorpci, nejčastěji k pevnému substrátu prostřednictvím van der Waalových sil, hydrofilních/hydrofobních interakcí (slabší vazba), nebo iontových vazeb (silnější vazba). Tento způsob imobilizace je jednoduchý, levný a velkou výhodou je také fakt, že nedochází k chemické modifikaci biomolekuly. Nevýhoda je možná desorpce. Kovalentní imobilizace – představuje vazbu

biomolekuly k substrátu prostřednictvím chemické vazby. Výhodou je pevná vazba. Nevýhodou, že dochází k chemické modifikaci a možné ztrátě biokatalytických nebo rekogničních vlastností biomolekuly. Imobilizace crosslinkováním (cross-linking) – biomolekuly se nevážou k substrátu, ale chemicky mezi sebou pomocí bifunkčního činidla. Často využívaný způsob imobilizace. Imobilizace uchycením/zachycením do imobilizačního suportu/matrixu (entrapment) – nedochází k chemické modifikaci a měla by být zachována nativní konformace. Často například do sol-gel matrixu nebo kapky (v nemísitelných roztocích) apod.

Kapitola čerpána z [146–150].

Elektrochemické senzory: jejich detekční metody rozeznáváme jako: amperometrické senzory – kontinuálně se měří proud, který vzniká často z oxidoredukčních dějů na elektrodě. Proud je proporcionální množství měřené látky. Nejznámějším senzorem je Clarkova kyslíková elektroda – funguje na principu redukce kyslíku na platinové pracovní elektrodě při daném potenciálu v přítomnosti Ag/AgCl referenční elektrody. Proud je proporcionální koncentraci kyslíku. Amperometrie – proud se měří při konstantním potenciálu. Voltametrie – proud se měří při kontrolovaných změnách potenciálu. Potenciometrické senzory – měří akumulaci náboje jako potenciál na pracovní elektrodě při nulovém proudu. Měření je potenciál ve srovnání s referenční elektrodou v elektrochemické cele. Poskytuje informace o iontové aktivitě při elektrochemické reakci. Konduktometrické senzory – měří schopnost analytu nebo média vést elektrický proud (elektrická vodivost) mezi dvěma elektrodami. Je zaměřen na změny elektrického proudu související se změnami napětí v roztoku elektrolytu. Používá se střídavé napětí na elektrodách. Kromě napětí je možné měnit i frekvenci. Měří se proud a jeho fázový posun. [151–153]

Optické biosenzory (SPR): povrchové plazmony jsou hromadné excitace elektronů vázaných na rozhraní mezi vodičem a izolantem. Vybuzení povrchových plazmonů lze uskutečnit v planární multivrstvě či na periodickém rozhraní, tedy mřížce. Při dopadu lineárně polarizovaného paprsku na rozhraní dvou prostředí s rozdílnými indexy lomu vzniká povrchová (evanescentní) vlna. Je nutné, aby úhel dopadu paprsku na rozhraní mezi optickým hranolem a přímo kovem nebo ultratenkou dielektrickou vrstvou byl větší než tzv. mezní úhel dopadu, pak dochází k totálnímu odrazu a vzniku evanescentní vlny. Evanescentní vlna, nazývána též tlumená či zhasená, interaguje s povrchovými plazmony kovové vrstvy a vzniká povrchová plazmonová vlna. Rezonance povrchových plazmonů závisí na vlnové délce, polarizaci a úhlu dopadu paprsku na rozhraní. Jestliže je na povrch senzoru navázána biomolekula, dojde ke změně indexu lomu tohoto prostředí a měřením změny úhlu, při němž dochází ke vzniku SPR, lze tuto látku detekovat. [154, 155]

Optické biosenzory (TIRF): celková vnitřní reflexe závisí na reflektivních charakteristikách dvou opticky transparentních médií o rozdílném refrakčním indexu. [156, 157]

Spektroskopická elipsometrie: využívá šikmý dopad monochromatického světla a je založena na změně polarizace světla po odrazu na rozhraní dvou různých prostředí. Zpracování elipsometrických experimentálních dat je velmi složité a vyžaduje užití počítačové techniky. [158]

Povrchové akustické vlny (SAW): u senzorů, které detekují povrchové akustické vlny se snímá rychlost (frekvenční nebo fázové vlastnosti vlny) nebo amplituda akustických vln. Principem je proměna elektrického signálu na mechanický signál, který se znovu promění na elektrický. Ten se vyhodnotí a změna mezi oběma signály je měřená „veličina“. Změna mezi vstupním a výstupním signálem je podmíněna rozdílnými vlastnostmi materiálu (nejčastěji povrchu), ve kterém se šíří

mechanická vlna. K buzení a záznamu elektrického signálu se obvykle tzv. „interdigitated“ elektrody. Jako substrát se využívá piezoelektrický materiál. [159, 160]

Chemomechanický biosenzor: princip spočívá ve změně povrchové volné energie, která může způsobit deformaci materiálu. U biosenzoru je to způsobeno chemickou nebo biochemickou reakcí na jednom z povrchu nosníku. Energetické změny, ke kterým dojde v důsledku reakce na jeho povrchu, způsobí změnu mechanického napětí a důsledkem je jeho vychýlení, které je možné relativně přesně změřit (opticky, využívá se vlastnost piezorezistivity, kapacitní vlastnosti materiálu...). Specifita a citlivost je závislá zejména na povrchových vlastnostech dosažených funkcionalizací povrchu SAMs. [161, 162]

Kalorimetrické biosenzory: detekce je založená na detekci exotermické reakce. Měří se množství uvolněného tepla. Množství tepla je proporcionální množství produktů reakce. Předpokladem je dostatečné množství tepla uvolněné při reakci, které může být spolehlivě změřeno. Množství uvolněného tepla se měří změnou teploty systému. Reakce probíhá na funkcionalizovaném povrchu spojeném s termistorem. Kanál musí být teplotně izolován (disipace tepla). Množství tepla je detekováno jako změna teploty detekována termistorem. [163, 164]

Kontrolní otázky: Jaké jsou charakteristiky a parametry sensorů? Je nutná pro funkci sensorů externě dodávaná energie? Popište optický biosenzor SPR.

BioMEMS v biologických a biomedicínských aplikacích, Lab-on-a-chip a Micro total analysis systems - pro oblast bioanalytiky.

Využití mikrofluidních BioMEMS v oblasti bioaplikací zahrnuje několik základních oblastí: molekulární biologie, genomika a proteomika, buněčné systémy, biosenzory a tzv. Point-of-Care diagnóza, vývoj léčiv, syntéza biomateriálů a tkáňové inženýrství, implantáty.

Molekulární biologie: v mikrosystémech účinněji umožňuje: mobilitu testů v Point-of-Care, sníženou spotřebu reagensů, snížení využití zvířat, zvyšuje možnost využívání vzorků které jsou dostupné ve velmi omezených množstvích (CTC, biopsie...)

Mikroeseje: poskytují více informací v poměru k ceně testu, proto mají velký význam v biologických aplikacích: mikrosystémy umožňují získávat nové poznatky biosystémů a mohou poskytovat významně více funkcí (u buněčných kultur kokultury, 3-D kultury apod.) což umožňuje lepší predikci esejí v *in vivo* uspořádání. Důležitou skutečností je, že při testování biologických vzorků (sliny, moč, krev) je minimální koncentrace konkrétní látky vyskytující se v organismu pevně daná. Proto mikrosystémy (mikrofluidní systémy), ve srovnání s nanosystémy, mají pro biologické aplikace mnohem větší význam v praktickém užití.

Příprava vzorků: testované vzorky (krev), sliny, moč obsahují kromě biomolekul i celé buňky, bakterie... Velikost buněk se pohybuje v řádu jednotek až desítek mikrometrů. Proto je důležitá úprava vzorků před jejich testováním. K testování potřebujeme materiál bez buněk nebo s buňkami. Nejčastěji využívané postupy čištění vzorků od buněk jsou síta (2D filtry, jejich účinnost závisí na mnoha vlastnostech (velikosti a množství separovaných částic, rychlosti toku)). Často je nutné retenát znovu nechat projít filtrem. Největším problémem obecně je možnost ucpání filtru. Při analýze vzorků s buňkami jsou využívány dva přístupy: analyzují se buňky, které jsou v neporušeném stavu – význam spočívá v tom, že existují buňky vícero typů, buňky mohou existovat v různých stádiích vývoje v různém počtu nebo stavu a dle informací získaných o buňkách je možné určovat diagnózu pacienta. Buňky je možné použít pro jejich následnou kultivaci, ale nejdůležitější a nejčastěji využívaná metoda pro kvantitativní, ale i pro kvalitativní stanovení vlastnosti buněk je průtoková cytometrie. Nebo buňky, u kterých je důležité získat samotný obsah – musí dojít k lýzi buněk a následně se obsah separuje, upravuje a určují se jeho vlastnosti. Pro biochemickou analýzu je potřebná separace obsahu vzorků. Obvykle využívané metody představují filtraci, centrifugaci, chromatografii, elektroforézu. Mezi přístupy využívané k separaci látek na čipu možno zařadit zejména: kapilární elektroforézu – tok je vyvolán externí silou působící na separaci, separaci založenou na kontinuálním toku dvou roztoků (někdy s různým průtokem), kde na roztoky mohou působit různé typy sil pod různým úhlem na směr toku. Vzorky se následně sbírají a je možné je analyzovat přímo na čipu nebo v jiných zařízeních k tomu určených.

Kapilární elektroforéza: podstatou je dlouhý mikrokanál, který se naplní materiálem na separaci a dochází k elektroosmotickému toku. Výsledkem je separace obsahu na konci kanálku (čím tenčí kanálek, tím lépe). [165]

Separace v kontinuálním toku: příkladem může být elektroforéza, kdy se aplikuje elektrické pole kolmo na směr toku, isoelektrická fokusace, kdy dochází k separaci vzorku na základě různých

izoelektrických bodů látek obsažených ve vzorku – princip je podobný elektroforetické separaci, magnetická separace, u které je použit stejný princip jako u metod nahoře popsaných s rozdílem, že hnací silou separace je magnetické pole a vzorek obsahuje magnetické částice, které interagují se vzorky, gravitační, optická, ultrazvuková separace... [165]

Molekulární filtrace: princip spočívá tom, že se použijí v kanálku překážky. Různě velké molekuly mohou přes ně procházet, ale při kritické velikosti překážky větší molekuly budou procházet přes překážky pomaleji než menší molekuly. [165]

Isoelektrická fokusace: separace na základě isoelektrického bodu. Charakteristickou vlastností proteinů je jejich isoelektrický bod, což je pH, při kterém se jejich molekuly nepohybují v elektrickém poli. Princip isoelektrické fokusace spočívá v dělení směsi proteinů na nosiči se stabilním gradientem pH. [165]

Dále je možné využívat například magnetickou separaci [166], Lateral Displacementu [167] nebo On chip immunoblotting [168].

Genomické a proteomické analýzy: využití mikrofluidních zařízení má pro oblast studia DNA/RNA a proteinů velký potenciál v různých oblastech: syntézy DNA/RNA, hybridizační studie pomocí mikroarrays nebo funkcionalizovaných povrchů, proteinové microarrays, elektroforetická separace na čipu, polymerázová řetězová reakce (PCR) a DNA rekombinantní technologie, krystalizace proteinů... Do BioMEMS se často obecně také zařazují technologie jako: microarrays s imobilizovanými fragmenty/komplementárními DNA (oligonukleotidové čipy a DNA microarrays), systémy pro purifikaci DNA, systémy pro syntézu DNA, PCR technologie (PCR čipy), možnosti imobilizačních technik pro sekvenaci, DNA microarray... [169]

Výhody/nevýhody DNA microarrays: cDNA imobilizovaná na skleněné podložce, rozlišení cca 100 μm, méně nákladná výroba než DNA čipy, kvantitativní detekce, mohou být využity i proteiny a jiné molekuly. [170]

Proteomika a proteinové čipy: obecně proteomika zahrnuje zejména tyto oblasti: proteomiku určující zastoupení proteinů v živých tkáních v souvislosti se specifickými podmínkami jako zdraví, nemoc apod. Buněčné mapování – objevuje a popisuje mezibuněčné signální dráhy a regulační sítě, které jsou v buňkách zastoupeny prostřednictvím interakcí mezi proteiny. Strukturální proteomika – studuje zastoupení aktivních a funkčních domén proteinů s cílem vysvětlit vlastnosti proteinů jako je jejich stabilita, specifická funkce, interakce s dalšími proteinovými a jinými komplexy apod. V oblasti proteomiky jsou BioMEMS využívány pro: izolaci proteinů, jejich purifikaci, separaci, mikroarray eseje sloužící k určení vlastnosti a funkcí proteinů, případně pro bioanalytická stanovení. [171]

Proteinové microarray čipy: princip podobný jako u DNA microarrays. Je to systém malých spotů, které jsou umístěny na pevné podložce. Spoty obsahují imobilizované molekuly, které mají sloužit k interakci s jinými cílovými molekulami. Mezi imobilizované molekuly možno zařadit: purifikované rekombinantní proteiny, protilátky, aptamery, peptidy nebo komplexní proteinové extrakty. Výhodou podobného systému je paralelizace a multiplexní způsob charakterizace cílových molekul. Jeden čip umožňuje charakterizovat jeden nebo až několik tisíc cílových molekul v jednom experimentu. Nevýhodou proteinových čipů ve srovnání s DNA čipy je zejména v tom, že biochemické vlastnosti proteinů jsou rozmanitější a komplexnější než u DNA. Produkce proteinů je komplikovanější než DNA. Proteiny je složitější udržet v nativním stavu (mohou denaturovat –

zejména například membránové proteiny, a degradovat v různém prostředí). Na základě způsobu využití je možné proteinové microarrays rozdělit na: analytické microarrays – obsahují dobře charakterizované molekuly se specifickou vazebnou aktivitou a slouží k identifikaci více složek v komplexních biologických vzorcích (sérum apod.) nebo k zjištění, zda vzorek obsahuje jeden specifický protein. Možno je využít ke screeningu exprimovaných proteinů, identifikaci biomarkerů, v klinické diagnostice, analýze látek v životním prostředí. Takzvané antibody microarrays – imobilizované, jsou protilátky a slouží k detekci interakce protilátky/antigen. Funkční microarrays – obsahují velké množství pročištěných proteinů, které slouží k tomu, aby se zjišťovali biochemické vlastnosti a aktivitu těchto proteinů. Možno vyselektovat proteiny z organismu a vytvořit na čipu celý proteom. Je možné využít je k identifikaci (vážou se na imobilizované proteiny) proteinů, lipidů, malých molekul, DNA/RNA ke zjišťování imunitní odpovědi atd. Proteinové arrays jsou principiálně podobné DNA, ale liší se v tom, že je zde potřeba zachytit velký rozsah koncentrace analytu. Ve vzorcích se mohou vyskytovat další látky a je potřeba eliminovat jejich možnou interferenci s amplifikační chemií. Cílem imobilizace je efektivní depozice hustých polí malých kapiček, obsahujících molekuly sondy. Technika by měla být co nejlevnější, používat co nejmenší objem molekul, předcházet kontaminaci čipu a být schopna udržet funkční stav imobilizované molekuly. Proteinové microarrays umožňují simultánní analýzu velkého množství parametrů v průběhu jednoho experimentu. [172]

Microfluidní immunoeseje: nejpoužívanější diagnostické nástrojů jsou immunoeseje. Dnes se využívají na detekci jakékoliv látky. Použití pro detekci hladiny léčiv v organismu, hladina hormonů v tělních tekutinách, diagnóza infekčních nebo autoimunitních chorob, diagnóza a monitoring rakoviny... Podstatou je možnost vyselektovat nebo vytvořit molekulu protilátky nebo její část, která má schopnost vázat se s cílovou molekulou (malé nebo velké molekuly) co nejpevněji a s co nejvyšší specifitou. Výhoda mikrofluidních esejí spočívá zejména ve zvětšení poměru plochy k objemu – zvýšení rychlosti interakce, snížení objemu reagentů a vzorku, možnosti automatizace práce s kapalinami zlepšuje reprodukovatelnost a výstup s více informacemi. Výsledkem je kvalitnější výstup a snížení ceny eseje. Immunoeseje jsou také podstatou imunochromatografických testů, tzv. LFIA (lateral flow immunoassays) – papírové imunostripy založené na interakci protilátek s cílovou molekulou v chromatografickém papíře. Lze uvést LFIA pro detekci hCG jako příklad. HCG je lidský choriový gonadotropin, který je produkován těhotnými ženami. Hladinu je možné detekovat těhotenským testem v podobě papírku. Princip detekce je možno využít pro detekci jakékoliv látky. [173–175]

Mikrofluidní systémy mohou být použity i k analýze a popisu jednotlivých chemikálií například pomocí mikrofluidní krystalizací proteinů [176].

Kontrolní otázky: Porovnejte DNA microarray s proteinovou microarray. Co jsou mikrofluidní eseje? Popište princip isoelektrické fokusace

BioMEMs v biologických a biomedicínských aplikacích, Lab-on-a-chip a Micro total analysis systems - pro oblast buněčných technologií a tkáňového inženýrství.

V oblasti studia buněčných systémů *in vitro* je stále problémem napodobit buněčné *in vivo* prostředí pro studium buněk. Důvodem je skutečnost, že buňky neustále mechanicky nebo biochemicky interagují s okolím (okolní buňky nebo extracelulární prostředí). Tyto časově-prostorové vztahy regulují veškeré životní projevy buněk. Mikrofluidika ve srovnání se standardními laboratorními procesy nabízí jemnější a přesnější regulaci prostředí, ve kterém se buňky vyvíjí. Možno tak lépe studovat buněčné projevy a růst buněk. Nejdůležitější oblasti, ve kterých se mikrofluidika uplatňuje, jsou kultivace buněčných kultur, manipulace s buňkami a analýza samotných buněk [177].

Kultivace buněčných kultur: Výhoda zmenšení rozměrů bioreaktorů souvisí s obecnou výhodou velkého poměru povrchu plochy k objemu. Projevuje se zde lepší výměna hmoty, která ulehčuje perfúzi plynů a výživných látek, včetně odstraňování odpadních látek. Navíc malé objemy snižují množství biologických faktorů působících na vývoj buněk a snižují množství produkovaného odpadu. Je zde nízká spotřeba materiálu a chemikálií, kultivační cely mohou být vyráběny jako malé přenosné jednotky ve velkém množství a mohou se integrovat do dalších systémů. Často se pro výrobu bioreaktorů využívá PDMS, který má výhodu, že je propustný pro plyny, je opticky průhledný a umožňuje tedy využití různých zobrazovacích technik pro studium a charakterizaci kultury. Výhodou je nízká cena, jednoduchá konstrukce, čištění a sterilizace. Mezi další výhody patří možnost povrchových modifikací okolního prostředí buněk (povrch bioreaktoru). Je možno tak kontrolovat vzájemnou interakci buněk, jejich interakce se substrátem a okolním médiem. Možno tím také kontrolovat jejich prostorové uspořádání. Příkladem může být modifikace povrchu, ke kterému buňky adherují nebo ne. Velký význam pro tyto typy experimentů mají generátory koncentračního gradientu. [178, 179]

Adheze buněk na upravené povrchy: buňky se v průběhu svého vývoje pohybují (migrují) přirozeně nebo je pohyb vyvolán jako reakce na vnější vlivy. S pohybem buněk souvisí pojmy jako: buněčný pohyb (trakce) – buněčný pohyb způsobuje mechanické interakce mezi buňkou a jejím okolím (nejčastěji s extracelulární matricí). Tyto mechanické interakce se dají také měřit. Chemotaxe – pohyb buněk vyvolaný vnějším signálem, nejčastěji rozpuštěnou (chemickou) látkou v okolí buňky. [180–183]

Třídění buněk: mezi nejrozšířenější systémy pro manipulaci a třídění buněk patří konvenčně využívána průtoková cytometrie a její varianta fluorescence-activated cell sorting (FACS), kde se využívá hydrodynamické fokusace buněk. Průtokové cytometry slouží zejména k určování počtu buněk vzhledem k jejich vlastnostem. Dále je možné buňky třídít použitím optické pinzety (optical tweezers) – možné využít pro transport, třídění, organizaci buněk. Magnetické manipulace – v těchto případech se nejčastěji využívají externí magnety. Akustické vlny, elektrokinetické jevy, elektroforetická separace nebo dielektroforéza. Princip separace buněk je možné využít i pro analýzu krve. Důležitá je separace krevních buněk od plasmy. To je možné realizovat v tzv. H-filtru nebo například jednoduchým mikrofluidním filtrem skrz membránu. [184–188]

Separace v serpentinových/spirálních kanálcích: separace ve spirálních kanálcích probíhá s využitím dvou druhů sil: na částici působí odstředivé síly a síly, které jsou součástí tzv. Deanova víru. [189, 190]

Analýza buněk: komplexní analýza buněk v mikrofluidice je v současnosti stále nedosažitelná. Současné nejfrekventovanější systémy jsou zaměřené na DNA/RNA analýzu, případně na extrakci a analýzu proteinů, při kterých se nepoužívají složité procesy frakcionace, nebo procesy sestávající z mnoha nezávislých kroků. Složitější analýzy se provádějí v kombinaci na čipu a mimo čip. Systémy na analýzu buněk možno tedy rozdělit na systémy pro analýzu: DNA/RNA – genetika na čipu, proteinů – proteomika na čipu, buněčné biosenzory, buněčné mikroarrays, buněčné chemotaxe a interakce s prostředím, jednobuněčná analýza (analýza buněk, například vitality a jejich obsahu po lyzi). Problémy s analýzou obsahu jsou spojeny s vyředěním obsahu buňky prostřednictvím difuze do okolí. Řešení může být mikrodroplet mikrofluidika, kde se vyředění podstatně omezí na oblast kapky. [191]

Syntéza biomateriálů a tkáňové inženýrství:

Jednou z úspěšně využívaných terapií při léčbě poškozených tkání nebo orgánů je transplantace. Problémy, které s ní souvisí, jsou vysoké náklady léčby, možnosti zdravotních rizik či komplikací, dlouhé čekací doby na vhodného dárce. Řešením může být tkáňové inženýrství – biopsie tkáně pacienta a její kultivace na biodegradovatelné a biokompatibilní matrici s následnou *in vivo* implantací. Mikrofluidika umožňuje testovat postupy, které mohou napomoci efektivnější kultivaci buněk, případně efektivnějšího vytváření buněčných shluků, pro syntézu základních struktur, pro kultivaci tkání, různé způsoby modelování časoprostorových uspořádání – manipulace s buněčným mikroprostředím, které stimuluje morfogenezi a diferenciaci tkání atd. Tkáňové inženýrství – Tkáňové inženýrství je multidisciplinární obor na rozhraní biologie, medicíny a technických oborů. Cílem je zachovat, udržovat a zlepšovat vlastnosti tkání bez nutnosti výrazně zasahovat do těla dárce. V současnosti je však stále problém hlavně s vaskularizací tkání. Důležitý je tzv. scaffold – opora pro rekonstrukci tkání podobný extracelulární matrici (ECM). Důležité jsou vlastnosti, které mohou být ovlivněny původem (přírodní derivát nebo syntetický), chemickým složením, samotnou strukturou, případně záměrem, zda se využije *in vivo*, nebo *in vitro*. Decelularizování tkáně umožňuje připravit základ pro rekonstrukci – buněčnou matrici budoucí tkáně. Ty jsou komerčně dostupné a obvykle pocházejí od jiného dárce (prasečí/lidský). Mohou být také na bázi hydrogelů nebo syntetické. [192]

Organs-On-Chips: výhodou je existence ECM (extracelulární matrix), která je dostupná pro tkáňové inženýrství a je možné využít ji i pro 3D kultivace buněk pro tvorbu umělých biomimetických systémů. Kombinací zejména se soft litografií s využitím PDMS a s využitím různých typů membrán je možné vytvářet tzv. orgány na čipu. 2D a 3D systémy kultivace nejsou stále vhodné pro simulaci všech vlastností orgánů, které jsou často velmi komplexní a důležité pro udržení životaschopnosti tkáně nebo orgánu. Největším problémem je rozhraní mezi různými typy tkání (například vaskularizace), prostorový gradient přítomných látek a plynů, napodobování mechanických podmínek působících na buňky. Existují pokusy, ale zatím není možné vytvářet komplexní systémy celých orgánů na čipu, případně celých organismů. [193]

Point-Of-Care diagnostika: Point-of-care diagnostika/testování (POCT) představuje měření a testování přímo na místě, kde probíhá péče o pacienta. Diagnostika probíhá *in vitro*. Mezi diagnostické systémy možno zahrnout „terénní analyzátoři“. Analýza vzorků probíhá například u pacienta doma, v ordinaci lékaře, nebo přímo na lůžku. Příkladem mohou být diabetici, hemofilici atd. Mezi sledované vlastnosti možno zahrnout například stanovení elektrolytů, krevního obrazu,

koagulace, hladiny glukózy. Další možné stanovované parametry pacientů jsou kardiomarkery, CRP, cholesterol, chemické vyšetření moče atd. Pro vývoj těchto zařízení jsou důležitá kritéria jako je nízká cena, přenositelnost, ruční přístroj (handheld), jednorázovost testu. Point-Of-Care diagnostika Požadavky z technického hlediska: celá platforma by měla být jednoduchá pro uživatele a celý systém pokud možno integrovaný na jednom čipu. Testování by mělo být snadné a rychlé v řádu několika sekund nebo několika málo minut, přesné, spolehlivé a reprodukovatelné. Člověk by měl zvládnout testování i bez předchozího zaškolení. Zařízení by mělo být dostatečně robustní, aby vydrželo extrémní podmínky, jako manipulaci v prašném prostředí, větru, ve znečištěném prostředí a být schopno transportu. Mělo by být lehké a schopno činnosti bez složitého napájení. Možnost interpretace výsledků musí být jednoduchá. Možnost uchování soukromých informací (výsledků testování) v tajnosti, bez možnosti krádeže, nebo zneužití. Přístroj by měl nabídnout adekvátní vysvětlení špatných, pozitivních nebo negativních výstupů bez nutnosti okamžitého poradenství. [194, 195]

Mikroelektrody a implantáty: propojení elektrických senzorů s elektroaktivním nervovým systémem je velmi zajímavá oblast. Signál může být zaznamenán nebo využit k řízení bioelektrických signálů. Možno k tomu využít různé typy zesilovačů, počítače, ... Protože tělo obsahuje velké množství nervových vláken, není možné komunikovat se všemi, ale alespoň s těmi, které se soustřeďují v uzlech. V souvislosti s aplikací v živých organismech jsou zde určité problémy. Sondy je těžké implantovat, aby nezpůsobili poškození. V případě velkého počtu elektrod je poměrně obtížné kontrolovat je navzájem. Implantovaný materiál se může v těle zapouzdřit. [196–199]

Vývoj léčiv: je velmi drahý a zdoluhavý proces, který trvá několik let. Jenom 10% léčiv se dostane na trh a až jedna polovina neprojde klinickým testováním. Mikrofluidika nabízí potenciální řešení, které může zredukovat jak peníze, tak čas vývoje. Je možné ji uplatnit v každém stádiu vývoje léčiva a to od výběru vhodného kandidáta pro vývoj léčiva, tak jeho následné modifikace a testování, včetně studií pro optimalizaci účinku a toxicity léčiva. Význam mikrofluidních zařízení pro zlepšení probíhajících chemických reakcí spočívá v lepším poměru povrchu k objemu, čehož je možno využít pro zkrácení trasy pro difúzi molekul, zvýšení povrchové polohy katalyzátorů (například na povrchu kanálku, na povrchu mikročástic v systému apod.). Absence turbulentního toku umožňuje snížit reakční časy – reakce v mikroměřítku jsou obvykle limitovány difuzí. Transport reaktantů se může ještě více urychlit pasivním nebo aktivním mixováním. Mikrofluidní kombinatorické systémy umožňují miniaturizaci a paralelizaci procesu, co vede k rychlé syntéze různých variant produktů bez nutnosti použití velkých objemů drahých chemikálií. Mikrofluidní systémy je možno využít v různých oblastech vývoje léčiv: analýza proteinů v jedné buňce, separace proteinů a krystalizace, studium afinitních interakcí biomolekul, chemická syntéza látek a jejich screening (multiplexní analýza, microarray systémy), testování látek *in vitro* (například buněčné testy) a *in vivo* (detekce cílových molekul například v krvi), studium DNA, syntéza genů, studium vlivu léčiv na celé orgány (organs-on-chip). [200, 201]

Distribuce léčiv pomocí implantátů: kromě toho, že je možné využít implantáty k elektrické stimulaci buněk, tkání a orgánů, procesy v těle je možné stimulovat chemickými látkami. Proto další z možností implantátů jsou implantáty umožňující dávkování a distribuci léčiv, či jiných látek. Pro žádaný terapeutický účinek je důležité správné dávkování látek v čase a na vhodném místě. Ústní a injekční dávkování způsobuje nerovnoměrnou koncentraci látky v těle. Nejprve je vysoký nárůst koncentrace a postupné snižování. Pomocí dávkování se udržuje optimální hladina, ale ta v čase velmi kolísá. Alternativní možnosti vhodných způsobů dávkování je cílené lokální dávkování pomocí mikrozařízení (pole mikrojehel), které nebudou ovlivňovat metabolismus celého organismu, ale

jenom cílených tkání nebo různě povrchově nebo funkčně modifikovaných polymerních částic (kapsul). [202, 203]

Kontrolní otázky: Co je to point-of-care diagnostika a uveďte příklad přístroje které ji využívá. Jakým způsobem lze třídit buňky? Jakým způsobem jsou mikrofluidní systémy užitečné pro vývoj léčiv?

Další biologické aplikace mikrosystémů a BioMEMS.

Pole mikrofluidních systémů a BioMEMS se neustále rapidně vyvíjí a takřka každý den přibývá možných použití. V poli biologie stojí za zmínku například následující: Fish-on-a-chip (využití ryb a jiných aquatických organismů, často pro testy cytotoxicity) [204, 205], studium rostlin (jejich kořenového systému ale i umělé listy a fotosyntéza) [206–209], chemotaxe a resistance bakterií a hub [210, 211] nebo využívání *C. elegans* jakožto modelového organismu [212–214]. Tyto mikrosystémy jsou již ale často větších rozměrů a tak se u těchto aplikací již často stírá rozdíl mezi mikrofluidikou a milifluidikou.

Kontrolní otázky: Jaké různé organismy mohou být taktéž využity v mikrofluidních čípech?

Ukázkové protokoly pro samostatnou práci studentů.

Protokol 1. kultivace buněk v mikrosystémech.

Kultivace buněk v mikrosystémech

(časosběrný záznam kultivace buněk v mikrosystému)

Cílem cvičení je pořízení časosběrného záznamu kultivace buněk ve skleněném mikrosystému. Záznam bude obsahovat proces uchycení buněk ke skleněnému podkladu, který modifikujeme polymerní látkou.

Orientační časový plán cvičení

1. den, cca 2-3 hod. – příprava substrátů, lepení substrátů a modifikace
2. den, cca 2-3 hod. – modifikace dokončení, kultivace: začátek experimentu
3. den, cca 1-1,5 hod. – ukončení experimentu

Materiál a chemikálie

Buňky – buněčná linie rakovinných epiteliálních buněk CRL (HCC827 (ATCC® CRL-2868™)), živné médium, inverzní mikroskop, pipety, špičky, pinzeta, kádinky, Petriho misky, skleněné substráty pro výrobu mikrosystému, kontaktní lepidlo ARcare 90106, kultivační systém (kultivační cela), etanol technický i bio., kyselina sírová, peroxid vodíku, nádobky Hellendahl, deionizovaná voda, fotolitograf, termoblok, Fibronectin (pure), sonikátor, Hellmanex III, detergent, hemocytometr, inverzní světelný mikroskop, buněčný inkubátor, trypsin, zkumavky, sterilní PBS pH 7.2, sterilní voda, sterilní špičky, sterilní mikrozukumavky eppendorf, zásobníky z plexiskla, sterilní zkumavky, sterilní Petriho misky, sterilní zdravotní lepící páska Omnifilm nebo PDMS, sterilní sérologické pipety, rukavice, abrazivum Al₂O₃ 50 μm, mikroabrazivní soustruh.

Postup práce

Skleněný mikrosystém – výroba jednotlivých částí systému

Pomocí mikropískovacího soustruhu připravíme jednotlivé části mikrosystému. Použijeme abrazivum 50 μm a jako substráty podložní mikroskopická skla.

Skleněné substráty očistíme saponátem a usušíme proudem dusíku. Ponoříme do 2% roztoku Hellmanexu III a sonikujeme po dobu 15 minut při 45°C. Poté je důkladně opláchneme stříčkou s deionizovanou vodou a opatrně osušíme proudem dusíku.

Připravíme roztok Piranha (roztok kyseliny sírové a peroxidu vodíku v poměru 3:1). Substráty ponoříme do roztoku Piranha a inkubujeme 24 hodin. Po inkubaci substráty důkladně opláchneme pomocí stříčky s deionizovanou vodou a osušíme proudem dusíku.

Slepení mikrosystému transferovým lepidlem

Pracujeme v co nejméně prašném prostředí a s rukavicemi. Z jedné strany kontaktního lepidla sejmeme ochrannou vrstvu a přiložíme ho k jedné z částí systému. Pomocí pinzety opatrně přitlačíme nalepené kontaktní lepidlo k části mikrosystému. Z druhé strany kontaktního lepidla sejmeme ochrannou vrstvu a přiložíme další část mikrosystému. Postup opakujeme, dokud není

slepen celý mikrosystém. Dbáme na to, abychom se nedotkli substrátu nebo vnitřních částí mikrosystému.

Po slepení poslední části mikrosystému celý mikrosystém vystavíme dávce UV záření 100 000mJ/cm². Mikrosystém uložíme do Petriho misky a přeneseme do laminárního boxu.

Dále pracujeme ve sterilním prostředí v laminárním boxu.

Skleněnou část mikrosystému (kultivační cela) propláchneme pipetou 3x etanolem, poté 5x sterilní vodou a vysušíme na termobloku při teplotě 37°C (15-30 minut).

Modifikace povrchu mikrosystému

Do kultivační cely mikrosystému pipetujeme roztok fibronectinu o koncentraci 10µg/ml. Mikrosystém uzavřeme Omnifilmem a vložíme do Petriho misky. Inkubujeme 24 hodin v inkubátoru. Po inkubaci roztok fibronectinu odpipetujeme, promyjeme 1ml sterilní vody a usušíme na termobloku při teplotě 37°C (cca 15-30 minut).

Příprava kultivační cely

Připravíme počítač, kameru a inverzní mikroskop. 1 hodinu před vlastním umístěním buněk sestavíme a spustíme kultivační celu na stolku mikroskopu.

Příprava suspenze buněk

Připravíme suspenzi buněk o koncentraci 500 tisíc buněk / ml. Suspenzi připraví vedoucí kurzu. Průběh přípravy pozorně sledujeme. Postup si zapíšeme a doplníme do protokolu.

Kultivace

Do kultivační cely pipetujeme 100 µl suspenze buněk a poté přidáme do zásobníků cca 80 µl živného média. Systém uzavřeme pomocí Omnifilmu. Takto připravený mikrosystém vložíme do kultivační cely na mikroskopu a pomocí programu pro ovládání kamery inverzního mikroskopu spustíme časosběrný záznam po dobu 24 hodin (záznam kamery je snímán každé 2 minuty a ukládán na pevný disk počítače).

Výsledky

Z pořízených obrazových záznamů složíme časosběrné video. Záznam s procesem kultivace buněk popíšeme a vyhodnotíme. Vzorový výsledek je dostupný na webové adrese: <https://www.youtube.com/watch?v=Z9FCISn6WJg>.

Protokol 2. Výroba mikrosystému v PDMS metodou rozpouštění 3D tisku.

Výroba mikrosystému v PDMS metodou rozpouštění 3D tisku

Cílem cvičení je demonstrovat použití hrubého 3D tisku k vytvoření mikrosystému v PDMS. Výstupem může být buď plně funkční serpentinový pasivní mixér nebo microdroplet generátor s pořízeným video záznamem.

Orientační časový plán cvičení

1. den, cca 6 hod.

Úvod

Výroba mikrosystémů v PDMS metodou 3D tisku je rychlou nenáročnou a levnou metodou. Umožňuje rychlý jednoduchý návrh systému a jeho výrobu s minimem materiálu. Navrhnutý vzor mikrosystému je vyroben metodou 3D tisku. Vytisknutý vzor je zcela zalit do bloku PDMS. Vzor zalitý v PDMS je následně rozpuštěn a vymyt za pomoci acetonu. Mikrosystém v PDMS je možné napojit rovnou na hadičky a připojit k pumpě bez potřeby jakýchkoliv držáků hadiček.

Nástroje

3D tiskárna, Pumpa, Sonikátor (Sonorex Bandelin), Vývěva, Hotplate

Pomůcky

Kádinky, Petriho miska skleněná i plastová, Pipety, Špičky, Paspárovací nůž, Nůžky, Pinzeta, Svorka na papíry, Exsikátor, Laboratorní špachtle, Laboratorní jehla.

Programové vybavení

Ovládací program 3D tiskárny (Pronterface, Slicer), OpenScad, LibreCad

Materiál a chemie

ABS struna, Aceton, Lepidlo Kores, Isopropanol, Destilovaná voda, Potravinářské barvivo, PDMS + iniciátor

Metodika

Smícháme PDMS a iniciátor v poměru 10:1 (PDMS: iniciátor). Důkladně promícháme a dáme do exsikátoru k odvodušnění (cca 1-2 hod).

Vytvoříme náčrt vzoru mikrosystému v programu LibreCad a uložíme ve formátu *.dxf .

Náčrt importujeme do programu OpenScad a vytvoříme 3D model náčrtu příkazy:

```
linear_extrude(height = 1, center = true, convexity = 1)
  import (file = "CestaKSouboru");
```

nad vstupy a výstupy vytvoříme sloupec příkazy

```
Translate([x,y,z])
  cylinder([h=15,d=2]);
```

Model sestavíme (klávesa F6) a exportujeme do formátu *.stl .

Soubor importujeme do programu Slicer a exportujeme do souboru *.gcode s nastavením UPRAVENO.

Soubor importujeme do programu Pronterface, zapneme tiskárnu a vytiskneme.

Vytisknutý vzor sundáme z podložky pomocí paspartovacího nože, případné drobné otřepy „stáhneme“ opatrně z vytištěného vzoru taktéž paspartovacím nožem.

Vytištěný vzor uchytíme za sloupce do pinzety a zajistíme svorkou na papír.

Vzor zavěšený na pinzetě položíme do Petriho misky tak, aby se nikde nedotýkal Petriho misky a byl zavěšen ve vzduchu.

Vzor zalijeme odvzdušněným PDMS, případné bublinky odstraníme pomocí laboratorní jehly.

Petriho misku se vzorem a PDMS umístíme na hotplate při 90°C k vytvrzení PDMS (cca 1 hod.).

Po vytvrdnutí sundáme Petriho misku z hotplatu a vyjmeme PDMS z Petriho misky.

Pomocí nůžek ustříháme sloupce vzoru co nejbližší k bloku PDMS.

Blok PDMS vložíme do kádinky s Acetonem, uzavřeme velkou skleněnou Petriho miskou a necháme 24 hodin (přes noc).

Druhý den vložíme kádinku s acetonem a blokem PDMS do sonikátoru a sonikujeme 30min.

Pokud vzor v PDMS není zcela rozpuštěn sonikujeme dále do rozpuštění.

Blok PDMS se zcela rozpuštěným vzorem propláchneme pomocí pipet čistým acetonem, poté isopropanolem a nakonec destilovanou vodou.

Blok PDMS necháme ležet 24 hodin (přes noc) na skleněné Petriho misce pro odpaření zbytkového acetonu z PDMS.

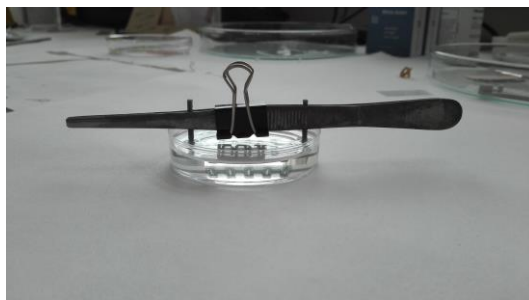
Blok PDMS zatopíme v kádince destilovanou vodou.

Blok PDMS s vodou uvnitř připojíme pomocí hadiček s 2mm průměrem k pumpě. Pro lepší přehled dávkujeme pomocí pumpy vodu obarvenou potravinářským barvivem.

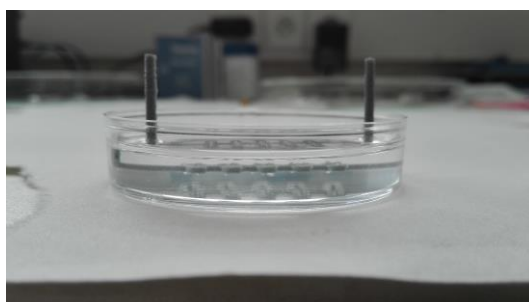
Pozorujeme mikrosystém.

Po ukončení pozorování vše důkladně propláchnout destilovanou vodou.

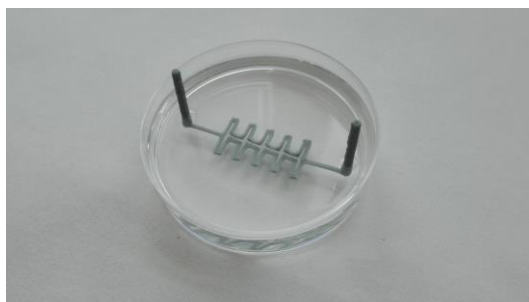
Výsledky



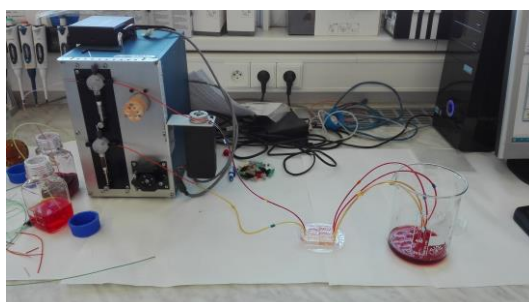
Obrázek č. 1: vzor zalitý PDMS v Petriho misce zavěšený v pinzetě.



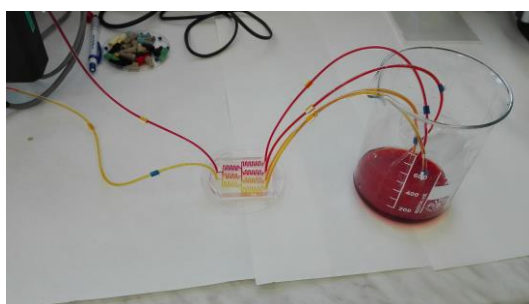
Obrázek č. 2: vzor ve vytuhlém PDMS.



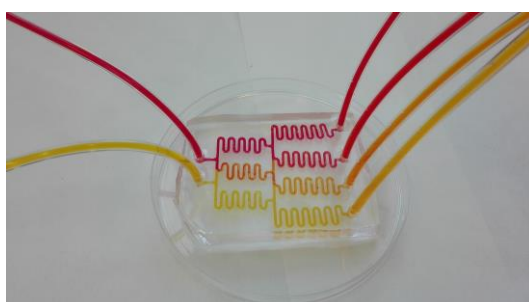
Obrázek č. 3: vzor ve vytuhlém PDMS.



Obrázek č. 4: připojení mikrosystému na pumpu.



Obrázek č. 5: připojení mikrosystému na pumpu, detail.



Obrázek č. 6: zapojení hadiček k mikrosystému

Video záznam vytvořeného funkčního mikrodroplet generátoru je možné shlédnout na webové adrese: https://www.youtube.com/watch?v=49-ZeWL7_5M .

Reference:

- [1] FOLCH, Albert. *Introduction to BioMEMS*. B.m.: CRC Press, 2016. ISBN 978-1-4665-0938-2.
- [2] WHITESIDES, George M. The origins and the future of microfluidics. *Nature* [online]. 2006, **442**(7101), 368. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/nature05058
- [3] FODOR, S. P., J. L. READ, M. C. PIRRUNG, L. STRYER, A. T. LU a D. SOLAS. Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science* [online]. 1991, **251**(4995), 767–773. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.1990438
- [4] HENRY, Sebastien, Devin V. MCALLISTER, Mark G. ALLEN a Mark R. PRAUSNITZ. Microfabricated Microneedles: A Novel Approach to Transdermal Drug Delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 1998, **87**(8), 922–925. ISSN 0022-3549. Dostupné z: doi:10.1021/js980042+
- [5] KOPP, Martin U., Andrew J. de MELLO a Andreas MANZ. Chemical Amplification: Continuous-Flow PCR on a Chip. *Science* [online]. 1998, **280**(5366), 1046–1048. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.280.5366.1046
- [6] TAKAYAMA, Shuichi, J. Cooper MCDONALD, Emanuele OSTUNI, Michael N. LIANG, Paul J. A. KENIS, Rustem F. ISMAGILOV a George M. WHITESIDES. Patterning cells and their environments using multiple laminar fluid flows in capillary networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 1999, **96**(10), 5545–5548. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.96.10.5545
- [7] MANZ, A., N. GRABER a H. M. WIDMER. Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing. *Sensors and Actuators B: Chemical* [online]. 1990, **1**(1), 244–248. ISSN 0925-4005. Dostupné z: doi:10.1016/0925-4005(90)80209-I
- [8] Silicon Micromechanical Devices. *Scientific American* [online]. [vid. 2019-07-10]. Dostupné z: doi:10.1038/scientificamerican0483-44
- [9] GHALLAB, Y. a W. BADAWY. Sensing methods for dielectrophoresis phenomenon: from bulky instruments to lab-on-a-chip. *IEEE Circuits and Systems Magazine* [online]. 2004, **4**(3), 5–15. ISSN 1531-636X. Dostupné z: doi:10.1109/MCAS.2004.1337805
- [10] CHOKKALINGAM, Venkatachalam, Jurjen TEL, Florian WIMMERS, Xin LIU, Sergey SEMENOV, Julian THIELE, Carl G. FIGDOR a Wilhelm T. S. HUCK. Probing cellular heterogeneity in cytokine-secreting immune cells using droplet-based microfluidics. *Lab on a Chip* [online]. 2013, **13**(24), 4740–4744. ISSN 1473-0189. Dostupné z: doi:10.1039/C3LC50945A
- [11] NGE, Pamela N., Chad I. ROGERS a Adam T. WOOLLEY. Advances in Microfluidic Materials, Functions, Integration, and Applications. *Chemical Reviews* [online]. 2013, **113**(4), 2550–2583. ISSN 0009-2665. Dostupné z: doi:10.1021/cr300337x
- [12] REN, Kangning, Jianhua ZHOU a Hongkai WU. Materials for microfluidic chip fabrication. *Accounts of chemical research* [online]. 2013, **46**(11), 2396–2406. Dostupné z: doi:10.1021/ar300314s

- [13] WU, Wen-I, Kyla SASK, John BRASH a Ponnambalam SELVAGANAPATHY. Polyurethane-based microfluidic devices for blood contacting applications. *Lab on a chip* [online]. 2012, **12**, 960–70. Dostupné z: doi:10.1039/c2lc21075d
- [14] ZHANG, Jian, K L TAN, G D HONG, L J YANG a H Q GONG. Polymerization optimization of SU-8 photoresist and its application in microfluidic systems and MEMS. *Journal of Micromechanics and Microengineering* [online]. 2000, **11**, 20. Dostupné z: doi:10.1088/0960-1317/11/1/304
- [15] MARTINEZ-DUARTE, Rodrigo a Marc J. MADOU. SU-8 Photolithography and Its Impact on Microfluidics. In: [online]. 2011. Dostupné z: doi:10.1201/b11188-11
- [16] CHEN, Chi-Shuo, David N. BRESLAUER, Jesus I. LUNA, Anthony GRIMES, Wei-chun CHIN, Luke P. LEE a Michelle KHINE. Shrinky-Dink microfluidics: 3D polystyrene chips. *Lab on a Chip* [online]. 2008, **8**(4), 622–624. ISSN 1473-0189. Dostupné z: doi:10.1039/B719029H
- [17] YOUNG, Edmond W. K., Erwin BERTHIER, David J. GUCKENBERGER, Eric SACKMANN, Casey LAMERS, Ivar MEYVANTSSON, Anna HUTTENLOCHER a David J. BEEBE. Rapid Prototyping of Arrayed Microfluidic Systems in Polystyrene for Cell-Based Assays. *Analytical Chemistry* [online]. 2011, **83**(4), 1408–1417. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac102897h
- [18] BERTHIER, Erwin, Edmond W. K. YOUNG a David BEEBE. Engineers are from PDMS-land, Biologists are from Polystyrenia. *Lab on a Chip* [online]. 2012, **12**(7), 1224–1237. ISSN 1473-0189. Dostupné z: doi:10.1039/C2LC20982A
- [19] WANG, Yi, Qiaohong HE, Yuanyuan DONG a Hengwu CHEN. In-channel modification of biosensor electrodes integrated on a polycarbonate microfluidic chip for micro flow-injection amperometric determination of glucose. *Sensors and Actuators B: Chemical* [online]. 2010, **145**(1), 553–560. ISSN 0925-4005. Dostupné z: doi:10.1016/j.snb.2009.11.068
- [20] OGOŃCZYK, D., J. WĘGRZYN, P. JANKOWSKI, B. DĄBROWSKI a P. GARSTECKI. Bonding of microfluidic devices fabricated in polycarbonate. *Lab on a Chip* [online]. 2010, **10**(10), 1324–1327. ISSN 1473-0189. Dostupné z: doi:10.1039/B924439E
- [21] ZHANG, Wenhua, Shuichao LIN, Chunming WANG, Jia HU, Cong LI, Zhixia ZHUANG, Yongliang ZHOU, Richard A. MATHIES a Chaoyong James YANG. PMMA/PDMS valves and pumps for disposable microfluidics. *Lab on a Chip* [online]. 2009, **9**(21), 3088–3094. ISSN 1473-0189. Dostupné z: doi:10.1039/B907254C
- [22] CHEN, Yun, Luyan ZHANG a Gang CHEN. Fabrication, modification, and application of poly(methyl methacrylate) microfluidic chips. *ELECTROPHORESIS* [online]. 2008, **29**(9), 1801–1814. ISSN 1522-2683. Dostupné z: doi:10.1002/elps.200700552
- [23] ROGERS, Chad I., Jayson V. PAGADUAN, Gregory P. NORDIN a Adam T. WOOLLEY. Single-Monomer Formulation of Polymerized Polyethylene Glycol Diacrylate as a Nonadsorptive Material for Microfluidics. *Analytical Chemistry* [online]. 2011, **83**(16), 6418–6425. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac201539h
- [24] STOJKOVIČ, Gorazd, Matic KRIVEC, Alenka VESEL, Marjan MARINŠEK a Polona ŽNIDARŠIČ-PLAZL. Surface cell immobilization within perfluoroalkoxy microchannels. *Applied Surface*

Science [online]. 2014, **320**, 810–817. ISSN 0169-4332. Dostupné z: doi:10.1016/j.apsusc.2014.09.064

- [25] PICCIN, Evandro, Wendell Karlos Tomazelli COLTRO, José Alberto FRACASSI DA SILVA, Salvador Claro NETO, Luiz Henrique MAZO a Emanuel CARRILHO. Polyurethane from biosource as a new material for fabrication of microfluidic devices by rapid prototyping. *Journal of Chromatography A* [online]. 2007, **1173**(1), 151–158. ISSN 0021-9673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2007.09.081
- [26] K. FREDRICKSON, Carl, Zheng XIA, Champak DAS, Ryan FERGUSON, Fernando T. TAVARES a Z FAN. Effects of Fabrication Process Parameters on the Properties of Cyclic Olefin Copolymer Microfluidic Devices. *Microelectromechanical Systems, Journal of* [online]. 2006, **15**, 1060–1068. Dostupné z: doi:10.1109/JMEMS.2006.880352
- [27] KHANARIAN, Garo. Optical properties of cyclic olefin copolymers. *Optical Engineering* [online]. 2001, **40**(6), 1024–1030. ISSN 0091-3286, 1560-2303. Dostupné z: doi:10.1117/1.1369411
- [28] LI, Chen, Yanou YANG, Harold G. CRAIGHEAD a Kelvin H. LEE. Isoelectric focusing in cyclic olefin copolymer microfluidic channels coated by polyacrylamide using a UV photografting method. *ELECTROPHORESIS* [online]. 2005, **26**(9), 1800–1806. ISSN 1522-2683. Dostupné z: doi:10.1002/elps.200410309
- [29] *A paper/polymer hybrid microfluidic microplate for rapid quantitative detection of multiple disease biomarkers | Scientific Reports* [online]. [vid. 2019-07-17]. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/srep30474>
- [30] WAHEED, Sidra, Joan M. CABOT, Niall P. MACDONALD, Trevor LEWIS, Rosanne M. GUIJT, Brett PAULL a Michael C. BREADMORE. 3D printed microfluidic devices: enablers and barriers. *Lab on a Chip* [online]. 2016, **16**(11), 1993–2013. ISSN 1473-0189. Dostupné z: doi:10.1039/C6LC00284F
- [31] *3D-Printed Microfluidic Devices for Materials Science - Alizadehgiashi - 2018 - Advanced Materials Technologies - Wiley Online Library* [online]. [vid. 2019-07-17]. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/admt.201800068>
- [32] *A simple procedure to produce FDM-based 3D-printed microfluidic devices with an integrated PMMA optical window - Analytical Methods (RSC Publishing)* [online]. [vid. 2019-07-17]. Dostupné z: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2019/ay/c8ay02092b#!divAbstract>
- [33] LEE, Sang-Joon John a Narayanan SUNDARARAJAN. *Microfabrication for Microfluidics*. B.m.: Artech House, 2010. ISBN 978-1-59693-472-6.
- [34] WU, W.I., Pouya REZAI, Leo HSU a Ponnambalam SELVAGANAPATHY. Materials and methods for the microfabrication of microfluidic biomedical devices. *Microfluidic Devices for Biomedical Applications* [online]. 2013, 3–62. Dostupné z: doi:10.1533/9780857097040.1.3
- [35] GIANNITSIS, Athanasios. Microfabrication of biomedical lab-on-chip devices. A review. *Estonian Journal of Engineering* [online]. 2011, **17**, 109–139. Dostupné z: doi:10.3176/eng.2011.2.03

- [36] MALDONADO, Juan R. a Martin PECKERAR. X-ray lithography: Some history, current status and future prospects. *Microelectronic Engineering* [online]. 2016, **161**, 87–93. ISSN 0167-9317. Dostupné z: doi:10.1016/j.mee.2016.03.052
- [37] WOOD, M.A. Colloidal lithography and current fabrication techniques producing in-plane nanotopography for biological applications. *Journal of the Royal Society Interface* [online]. 2007, **4**(12), 1–17. ISSN 1742-5689. Dostupné z: doi:10.1098/rsif.2006.0149
- [38] NAYFEH, Munir, ed. Chapter 5 - Manipulation and Patterning of Surfaces (Nanolithography). In: Munir NAYFEH, ed. *Fundamentals and Applications of Nano Silicon in Plasmonics and Fullerenes* [online]. B.m.: Elsevier, 2018 [vid. 2019-07-23], Micro and Nano Technologies, s. 89–137. ISBN 978-0-323-48057-4. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-323-48057-4.00005-0
- [39] MITRA, Sushanta K. a Suman CHAKRABORTY. *Microfluidics and Nanofluidics Handbook: Fabrication, Implementation, and Applications*. B.m.: CRC Press, 2016. ISBN 978-1-4398-1673-8.
- [40] TRAN, Khanh T. M. a Thanh D. NGUYEN. Lithography-based methods to manufacture biomaterials at small scales. *Journal of Science: Advanced Materials and Devices* [online]. 2017, **2**(1), 1–14. ISSN 2468-2179. Dostupné z: doi:10.1016/j.jsamd.2016.12.001
- [41] NATH, Pulak, Derek FUNG, Yuliya A. KUNDE, Ahmet ZEYTUN, Brittany BRANCH a Greg GODDARD. Rapid prototyping of robust and versatile microfluidic components using adhesive transfer tapes. *Lab on a Chip* [online]. 2010, **10**(17), 2286–2291. ISSN 1473-0189. Dostupné z: doi:10.1039/C002457K
- [42] MAHMUD, Md Almostasim, Eric J. M. BLONDEEL, Moufeed KADDOURA a Brendan D. MACDONALD. Features in Microfluidic Paper-Based Devices Made by Laser Cutting: How Small Can They Be? *Micromachines* [online]. 2018, **9**(5), 220. Dostupné z: doi:10.3390/mi9050220
- [43] *A simple and low-cost chip bonding solution for high pressure, high temperature and biological applications - Lab on a Chip (RSC Publishing)* [online]. [vid. 2019-07-17]. Dostupné z: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2017/LC/C6LC01319H#!divAbstract>
- [44] *Lab-on-a-Foil: microfluidics on thin and flexible films - Lab on a Chip (RSC Publishing)* [online]. [vid. 2019-07-17]. Dostupné z: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2010/LC/c001195a#!divAbstract>
- [45] *Multi-layered, membrane-integrated microfluidics based on replica molding of a thiol-ene epoxy thermoset for organ-on-a-chip applications - Lab on a Chip (RSC Publishing)* [online]. [vid. 2019-07-17]. Dostupné z: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2015/LC/C5LC01028D#!divAbstract>
- [46] *Generating Multicompartmental 3D Biological Constructs Interfaced through Sequential Injections in Microfluidic Devices - Ugolini - 2017 - Advanced Healthcare Materials - Wiley Online Library* [online]. [vid. 2019-07-17]. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/adhm.201601170>

- [47] YANG, Yong, Karina KULANGARA, Jaren SIA, Lu WANG a Kam W. LEONG. Engineering of a microfluidic cell culture platform embedded with nanoscale features. *Lab on a Chip* [online]. 2011, **11**(9), 1638–1646. ISSN 1473-0189. Dostupné z: doi:10.1039/C0LC00736F
- [48] PINTO, Vânia C., Paulo J. SOUSA, Vanessa F. CARDOSO a Graça MINAS. Optimized SU-8 Processing for Low-Cost Microstructures Fabrication without Cleanroom Facilities. *Micromachines* [online]. 2014, **5**(3), 738–755. Dostupné z: doi:10.3390/mi5030738
- [49] FAUSTINO, Vera, Susana O. CATARINO, Rui LIMA a Graça MINAS. Biomedical microfluidic devices by using low-cost fabrication techniques: A review. *Journal of Biomechanics* [online]. 2016, **49**(11), Selected Articles from the International Conference on CFD in Medicine and Biology (Albufeira, Portugal – August 30th - September 4th, 2015), 2280–2292. ISSN 0021-9290. Dostupné z: doi:10.1016/j.jbiomech.2015.11.031
- [50] ZHAO, X-M., Y. XIA a G. M. WHITESIDES. Fabrication of Three-Dimensional Micro-Structures: Microtransfer Molding. *Advanced Materials*. 1996, **8**, 837–840.
- [51] XIA, Younan, Enoch KIM a George M. WHITESIDES. Micromolding of Polymers in Capillaries: Applications in Microfabrication. *Chemistry of Materials* [online]. 1996, **8**(7), 1558–1567. ISSN 0897-4756. Dostupné z: doi:10.1021/cm9602196
- [52] QIN, Dong, Younan XIA a George M WHITESIDES. Soft lithography for micro- and nanoscale patterning. *Nature Protocols* [online]. 2010, **5**(3), 491–502. ISSN 1754-2189, 1750-2799. Dostupné z: doi:10.1038/nprot.2009.234
- [53] AND, William R. Childst† a † RALPH G. NUZZO*. *Decal Transfer Microlithography: A New Soft-Lithographic Patterning Method* [online]. 19. říjen 2002 [vid. 2019-07-23]. Dostupné z: doi:10.1021/ja020942z
- [54] STÄDLER, Brigitte, Harun H. SOLAK, Susanne FRERKER, Kristien BONROY, Filip FREDERIX, Janos VÖRÖS a H. Michelle GRANDIN. Nanopatterning of gold colloids for label-free biosensing. *Nanotechnology* [online]. 2007, **18**(15), 155306. ISSN 0957-4484. Dostupné z: doi:10.1088/0957-4484/18/15/155306
- [55] GIBOZ, Julien, Thierry COPPONNEX a Patrice MÉLÉ. Microinjection molding of thermoplastic polymers: a review. *Journal of Micromechanics and Microengineering* [online]. 2007, **17**(6), R96–R109. ISSN 0960-1317. Dostupné z: doi:10.1088/0960-1317/17/6/R02
- [56] WIEDEMEIER, S., R. RÖMER, S. WÄCHTER, U. STAPS, C. KOLBE a G. GASTROCK. Precision moulding of biomimetic disposable chips for droplet-based applications. *Microfluidics and Nanofluidics* [online]. 2017, **21**(11), 167. ISSN 1613-4990. Dostupné z: doi:10.1007/s10404-017-2005-5
- [57] WEERAKOON-RATNAYAKE, Kumuditha M., Colleen E. O'NEIL, Franklin I. UBA a Steven A. SOPER. Thermoplastic nanofluidic devices for biomedical applications. *Lab on a Chip* [online]. 2017, **17**(3), 362–381. ISSN 1473-0189. Dostupné z: doi:10.1039/C6LC01173J
- [58] *An automated optofluidic biosensor platform combining interferometric sensors and injection moulded microfluidics - Lab on a Chip (RSC Publishing)* [online]. [vid. 2019-07-17]. Dostupné z: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2017/LC/C7LC00524E#!divAbstract>

- [59] HECKELE, M. a W. K. SCHOMBURG. Review on micro molding of thermoplastic polymers. *Journal of Micromechanics and Microengineering* [online]. 2003, **14**(3), R1–R14. ISSN 0960-1317. Dostupné z: doi:10.1088/0960-1317/14/3/R01
- [60] BOCQUET, Lyderic a Patrick TABELING. Physics and technological aspects of nanofluidics. *Lab on a Chip* [online]. 2014, **14**(17), 3143–3158. ISSN 1473-0189. Dostupné z: doi:10.1039/C4LC00325J
- [61] DEBONO, Mike, Dan VOICU, Mohammad POUSTI, Muhammad SAFDAR, Robert YOUNG, Eugenia KUMACHEVA a Jesse GREENER. One-Step Fabrication of Microchannels with Integrated Three Dimensional Features by Hot Intrusion Embossing. *Sensors* [online]. 2016, **16**(12), 2023. Dostupné z: doi:10.3390/s16122023
- [62] KADIMISETTY, Karteek, Islam M. MOSA, Spundana MALLA, Jennifer E. SATTERWHITE-WARDEN, Tyler M. KUHNS, Ronaldo C. FARIA, Norman H. LEE a James F. RUSLING. 3D-printed supercapacitor-powered electrochemiluminescent protein immunoarray. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2016, **77**, 188–193. ISSN 0956-5663. Dostupné z: doi:10.1016/j.bios.2015.09.017
- [63] KITSON, Philip J., Mali H. ROSNES, Victor SANS, Vincenza DRAGONE a Leroy CRONIN. Configurable 3D-Printed millifluidic and microfluidic ‘lab on a chip’ reactionware devices. *Lab on a Chip* [online]. 2012, **12**(18), 3267–3271. ISSN 1473-0189. Dostupné z: doi:10.1039/C2LC40761B
- [64] MCDONALD, J. Cooper, Michael L. CHABINYC, Steven J. METALLO, Janelle R. ANDERSON, Abraham D. STROOCK a George M. WHITESIDES. Prototyping of Microfluidic Devices in Poly(dimethylsiloxane) Using Solid-Object Printing. *Analytical Chemistry* [online]. 2002, **74**(7), 1537–1545. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac010938q
- [65] GELBER, Matthew K. a Rohit BHARGAVA. Monolithic multilayer microfluidics via sacrificial molding of 3D-printed isomalt. *Lab on a Chip* [online]. 2015, **15**(7), 1736–1741. ISSN 1473-0189. Dostupné z: doi:10.1039/C4LC01392A
- [66] URRIOS, Arturo, Cesar PARRA-CABRERA, Nirveek BHATTACHARJEE, Alan M. GONZALEZ-SUAREZ, Luis G. RIGAT-BRUGAROLAS, Umashree NALLAPATTI, Josep SAMITIER, Cole A. DEFOREST, Francesc POSAS, José L. GARCIA-CORDERO a Albert FOLCH. 3D-printing of transparent bio-microfluidic devices in PEG-DA. *Lab on a Chip* [online]. 2016, **16**(12), 2287–2294. ISSN 1473-0189. Dostupné z: doi:10.1039/C6LC00153J
- [67] SOMAN, Pranav, Peter H. CHUNG, A. Ping ZHANG a Shaochen CHEN. Digital microfabrication of user-defined 3D microstructures in cell-laden hydrogels. *Biotechnology and Bioengineering* [online]. 2013, **110**(11), 3038–3047. ISSN 1097-0290. Dostupné z: doi:10.1002/bit.24957
- [68] BHARGAVA, Krisna C., Bryant THOMPSON a Noah MALMSTADT. Discrete elements for 3D microfluidics. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2014, **111**(42), 15013–15018. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1414764111
- [69] GONG, Hua, Adam T. WOOLLEY a Gregory P. NORDIN. High density 3D printed microfluidic valves, pumps, and multiplexers. *Lab on a Chip* [online]. 2016, **16**(13), 2450–2458. ISSN 1473-0189. Dostupné z: doi:10.1039/C6LC00565A

- [70] HE, Yong, Yan WU, Jian-zhong FU, Qing GAO a Jing-jiang QIU. Developments of 3D Printing Microfluidics and Applications in Chemistry and Biology: a Review. *Electroanalysis* [online]. 2016, **28**(8), 1658–1678. ISSN 1521-4109. Dostupné z: doi:10.1002/elan.201600043
- [71] ANDERSON, Kari B., Sarah Y. LOCKWOOD, R. Scott MARTIN a Dana M. SPENCE. A 3D Printed Fluidic Device that Enables Integrated Features. *Analytical Chemistry* [online]. 2013, **85**(12), 5622–5626. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac4009594
- [72] KEATING, Steven J., Maria Isabella GARIBOLDI, William G. PATRICK, Sunanda SHARMA, David S. KONG a Neri OXMAN. 3D Printed Multimaterial Microfluidic Valve. *PLOS ONE* [online]. 2016, **11**(8), e0160624. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0160624
- [73] MALINAUSKAS, Mangirdas, Maria FARSARI, Algis PISKARSKAS a Saulius JUODKAZIS. Ultrafast laser nanostructuring of photopolymers: A decade of advances. *Physics Reports* [online]. 2013, **533**(1), Ultrafast laser nano-structuring of photopolymers: a decade of advances, 1–31. ISSN 0370-1573. Dostupné z: doi:10.1016/j.physrep.2013.07.005
- [74] SUGIOKA, Koji, Jian XU, Dong WU, Yasutaka HANADA, Zhongke WANG, Ya CHENG a Katsumi MIDORIKAWA. Femtosecond laser 3D micromachining: a powerful tool for the fabrication of microfluidic, optofluidic, and electrofluidic devices based on glass. *Lab on a Chip* [online]. 2014, **14**(18), 3447–3458. ISSN 1473-0189. Dostupné z: doi:10.1039/C4LC00548A
- [75] WU, Dong, Li-Gang NIU, Si-Zhu WU, Jian XU, Katsumi MIDORIKAWA a Koji SUGIOKA. Ship-in-a-bottle femtosecond laser integration of optofluidic microlens arrays with center-pass units enabling coupling-free parallel cell counting with a 100% success rate. *Lab on a Chip* [online]. 2015, **15**(6), 1515–1523. ISSN 1473-0189. Dostupné z: doi:10.1039/C4LC01439A
- [76] *Limits of lithography - IEEE Journals & Magazine* [online]. [vid. 2019-07-17]. Dostupné z: <https://ieeexplore.ieee.org/document/915379/>
- [77] STULEN, R. H. a D. W. SWEENEY. Extreme ultraviolet lithography. *IEEE Journal of Quantum Electronics* [online]. 1999, **35**(5), 694–699. ISSN 0018-9197. Dostupné z: doi:10.1109/3.760315
- [78] XI, Yilian, Weijia ZHANG, Zhiqiang FAN, Qiang MA, Shan WANG, Denghao MA, Zhaoyi JIANG, Hongzhen LI a Yulong ZHANG. A facile synthesis of silicon nanowires/micropillars structure using lithography and metal-assisted chemical etching method. *Journal of Solid State Chemistry* [online]. 2018, **258**, 181–190. ISSN 0022-4596. Dostupné z: doi:10.1016/j.jssc.2017.07.034
- [79] FALLICA, Roberto, Robert KIRCHNER, Helmut SCHIFT a Yasin EKINCI. High-resolution grayscale patterning using extreme ultraviolet interference lithography. *Microelectronic Engineering* [online]. 2017, **177**, Advances in Micro- and Nano-Patterning, 1–5. ISSN 0167-9317. Dostupné z: doi:10.1016/j.mee.2017.01.007
- [80] KOLODZIEJ, Christopher M. a Heather D. MAYNARD. Electron-Beam Lithography for Patterning Biomolecules at the Micron and Nanometer Scale. *Chemistry of Materials* [online]. 2012, **24**(5), 774–780. ISSN 0897-4756. Dostupné z: doi:10.1021/cm202669f

- [81] MALI, Prashant, Aniruddh SARKAR a Rakesh LAL. Facile fabrication of microfluidic systems using electron beam lithography. *Lab on a Chip* [online]. 2006, **6**(2), 310–315. ISSN 1473-0189. Dostupné z: doi:10.1039/B510992B
- [82] MOFFITT, Jeffrey R., Jeffrey B. LEE a Philippe CLUZEL. The single-cell chemostat: an agarose-based, microfluidic device for high-throughput, single-cell studies of bacteria and bacterial communities. *Lab on a Chip* [online]. 2012, **12**(8), 1487–1494. ISSN 1473-0189. Dostupné z: doi:10.1039/C2LC00009A
- [83] HUTFLES, Jacob, Wesley CHAPMAN a John PELLEGRINO. Roll-to-roll nanoimprint lithography of ultrafiltration membrane. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 2018, **135**(11), 45993. ISSN 1097-4628. Dostupné z: doi:10.1002/app.45993
- [84] XIA, Qiangfei a R. Fabian PEASE. Nanoimprint lithography 20 years on. *Nanotechnology* [online]. 2015, **26**(18), 182501. ISSN 0957-4484. Dostupné z: doi:10.1088/0957-4484/26/18/182501
- [85] CROSS, Graham L. W. The production of nanostructures by mechanical forming. *Journal of Physics D: Applied Physics* [online]. 2006, **39**(20), R363–R386. ISSN 0022-3727. Dostupné z: doi:10.1088/0022-3727/39/20/R01
- [86] ISOBE, Gaku, Isaku KANNO, Hidetoshi KOTERA a Ryuji YOKOKAWA. Perfusable multi-scale channels fabricated by integration of nanoimprint lithography (NIL) and UV lithography (UVL). *Microelectronic Engineering* [online]. 2012, **98**, Special issue MNE 2011 - Part II, 58–63. ISSN 0167-9317. Dostupné z: doi:10.1016/j.mee.2012.05.059
- [87] KELLER, F., M. S. HUNTER a D. L. ROBINSON. Structural Features of Oxide Coatings on Aluminum. *Journal of The Electrochemical Society* [online]. 1953, **100**(9), 411–419. ISSN 0013-4651, 1945-7111. Dostupné z: doi:10.1149/1.2781142
- [88] MASUDA, Hideki a Kenji FUKUDA. Ordered Metal Nanohole Arrays Made by a Two-Step Replication of Honeycomb Structures of Anodic Alumina. *Science* [online]. 1995, **268**(5216), 1466–1468. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.268.5216.1466
- [89] HAMOUDA, Frédéric, Houda SAHAF, Sylvain HELD, Grégory BARBILLON, Philippe GOGOL, Eric MOYEN, Abdelhanin AASSIME, Julien MOREAU, Michael CANVA, Jean-Michel LOURTIOZ, Margrit HANBÜCKEN a Bernard BARTENLIAN. Large area nanopatterning by combined anodic aluminum oxide and soft UV–NIL technologies for applications in biology. *Microelectronic Engineering* [online]. 2011, **88**(8), Proceedings of the 36th International Conference on Micro- and Nano-Engineering (MNE), 2444–2446. ISSN 0167-9317. Dostupné z: doi:10.1016/j.mee.2011.02.013
- [90] SHARMA, R. a B. K. GALE. Electrochemical quantification of DNA using aluminum oxide membranes. *Procedia Engineering* [online]. 2011, **25**, EurosensorsXXV, 713–716. ISSN 1877-7058. Dostupné z: doi:10.1016/j.proeng.2011.12.176
- [91] CHEN, Gang, Yuyang WANG, Hailong WANG, Ming CONG, Lei CHEN, Yongan YANG, Yijia GENG, Haibo LI, Shuping XU a Weiqing XU. A highly sensitive microfluidics system for multiplexed surface-enhanced Raman scattering (SERS) detection based on Ag nanodot arrays. *RSC Advances* [online]. 2014, **4**(97), 54434–54440. ISSN 2046-2069. Dostupné z: doi:10.1039/C4RA09251A

- [92] HONEYCHURCH, Kevin C. a John P. HART. Screen-printed electrochemical sensors for monitoring metal pollutants. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2003, **22**(7), 456–469. ISSN 0165-9936. Dostupné z: doi:10.1016/S0165-9936(03)00703-9
- [93] DOU, Yingying, Bingsheng WANG, Mingliang JIN, Ying YU, Guofu ZHOU a Lingling SHUI. A review on self-assembly in microfluidic devices. *Journal of Micromechanics and Microengineering* [online]. 2017, **27**(11), 113002. ISSN 0960-1317. Dostupné z: doi:10.1088/1361-6439/aa84db
- [94] RUIZ, Sami Alom a Christopher S. CHEN. Microcontact printing: A tool to pattern. *Soft Matter* [online]. 2007, **3**(2), 168–177. ISSN 1744-6848. Dostupné z: doi:10.1039/B613349E
- [95] ILIESCU, Ciprian, Hayden TAYLOR, Marioara AVRAM, Jianmin MIAO a Sami FRANSSILA. A practical guide for the fabrication of microfluidic devices using glass and silicon. *Biomicrofluidics* [online]. 2012, **6**(1), 016505-016505–16. ISSN 1932-1058. Dostupné z: doi:10.1063/1.3689939
- [96] MATSON, Dean W., Peter M. MARTIN, Wendy D. BENNETT, John W. JOHNSTON, Donald C. STEWART a Charles C. BONHAM. Sputtered coatings for microfluidic applications. *Journal of Vacuum Science & Technology A* [online]. 2000, **18**(4), 1998–2002. ISSN 0734-2101. Dostupné z: doi:10.1116/1.582461
- [97] FRANSSILA, Sami a Lauri SAINIEMI. Reactive Ion Etching (RIE). In: Dongqing LI, ed. *Encyclopedia of Microfluidics and Nanofluidics* [online]. Boston, MA: Springer US, 2008 [vid. 2019-07-23], s. 1772–1781. ISBN 978-0-387-48998-8. Dostupné z: doi:10.1007/978-0-387-48998-8_1344
- [98] LAERMER, Franz, Sami FRANSSILA, Lauri SAINIEMI a Kai KOLARI. Chapter 21 - Deep Reactive Ion Etching. In: Markku TILLI, Teruaki MOTOOKA, Veli-Matti AIRAKSINEN, Sami FRANSSILA, Mervi PAULASTO-KRÖCKEL a Veikko LINDROOS, ed. *Handbook of Silicon Based MEMS Materials and Technologies (Second Edition)* [online]. Boston: William Andrew Publishing, 2015 [vid. 2019-07-23], Micro and Nano Technologies, s. 444–469. ISBN 978-0-323-29965-7. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-323-29965-7.00021-X
- [99] LI, Jing, Qing Xin ZHANG, Anand Krishna ASUNDI a Ai Qun LIU. MEMS deep-RIE fabrication process and device characterization. In: *Microsystems Engineering: Metrology and Inspection III* [online]. 2003, s. 80–86 [vid. 2019-07-17]. Dostupné z: doi:10.1117/12.500343
- [100] DUBEY, Avanish Kumar a Vinod YADAVA. Laser beam machining—A review. *International Journal of Machine Tools and Manufacture* [online]. 2008, **48**(6), 609–628. ISSN 0890-6955. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijmactools.2007.10.017
- [101] YUNG-HSUN SHIH, YUNG-KANG SHEN, YI LIN, KENG-LIANG OU, RONG-HONG HONG a SUNG-CHIH HSU. Microfluidic chip fabrication by micro-powder blasting. In: *2008 3rd IEEE International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems: 2008 3rd IEEE International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems* [online]. 2008, s. 780–783. Dostupné z: doi:10.1109/NEMS.2008.4484442
- [102] YU, Xiao-Ying. *Advances in Microfluidics: New Applications in Biology, Energy, and Materials Sciences*. B.m.: BoD – Books on Demand, 2016. ISBN 978-953-51-2785-7.

- [103] SONG, Yujun, Daojian CHENG a Liang ZHAO. *Microfluidics: Fundamentals, Devices, and Applications*. B.m.: John Wiley & Sons, 2018. ISBN 978-3-527-34106-1.
- [104] TUAN YAAKUB, Tuan Norjihan, Jumril YUNAS, Rhonira LATIF, Azrul Azlan HAMZAH, Mohd Farhanulhakim Mohd RAZIP WEE a Burhanuddin YEOP MAJLIS. Surface Modification of Electroosmotic Silicon Microchannel Using Thermal Dry Oxidation. *Micromachines* [online]. 2018, **9**(5) [vid. 2019-07-23]. ISSN 2072-666X. Dostupné z: doi:10.3390/mi9050222
- [105] NGUYEN, Nam-Trung, Steven T. WERELEY a Seyed Ali Mousavi SHAEGH. *Fundamentals and Applications of Microfluidics, Third Edition*. B.m.: Artech House, 2019. ISBN 978-1-63081-365-9.
- [106] CHOI, D., B. LEE, HYUN-HO YANG a J. YOON. Simple fabrication of microfluidic channel with nanoporous membrane formed by conventional physical vapor deposition. In: *10th IEEE International Conference on Nanotechnology: 10th IEEE International Conference on Nanotechnology* [online]. 2010, s. 740–743. Dostupné z: doi:10.1109/NANO.2010.5697816
- [107] BATZ, Nicholas G., J. Scott MELLORS, Jean Pierre ALARIE a J. Michael RAMSEY. Chemical vapor deposition of aminopropyl silanes in microfluidic channels for highly efficient microchip capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry. *Analytical Chemistry* [online]. 2014, **86**(7), 3493–3500. ISSN 1520-6882. Dostupné z: doi:10.1021/ac404106u
- [108] BECKER, H. a C. GÄRTNER. Polymer microfabrication methods for microfluidic analytical applications. *Electrophoresis* [online]. 2000, **21**(1), 12–26. ISSN 0173-0835. Dostupné z: doi:10.1002/(SICI)1522-2683(20000101)21:1<12::AID-ELPS12>3.0.CO;2-7
- [109] DU LIQUN, LIU CHONG, LUO YI, LOU ZHIFENG, CHU DENAN, WEN MIN a CHEN RONG. Fabrication of microfluidic chip and its application. In: *Micro-Nanomechatronics and Human Science, 2004 and The Fourth Symposium Micro-Nanomechatronics for Information-Based Society, 2004.: Micro-Nanomechatronics and Human Science, 2004 and The Fourth Symposium Micro-Nanomechatronics for Information-Based Society, 2004.* [online]. 2004, s. 237–242. Dostupné z: doi:10.1109/MHS.2004.1421310
- [110] PRAKASH, Shaurya a Junghoon YEOM. Chapter 4 - Advanced Fabrication Methods and Techniques. In: Shaurya PRAKASH a Junghoon YEOM, ed. *Nanofluidics and Microfluidics* [online]. B.m.: William Andrew Publishing, 2014 [vid. 2019-07-23], Micro and Nano Technologies, s. 87–170. ISBN 978-1-4377-4469-9. Dostupné z: doi:10.1016/B978-1-4377-4469-9.00004-4
- [111] RIEGGER, Lutz, Oliver STROHMEIER, Bernd FALTIN, Roland ZENGERLE a Peter KOLTAY. Adhesive bonding of microfluidic chips: influence of process parameters. *Journal of Micromechanics and Microengineering* [online]. 2010, **20**(8), 087003. ISSN 0960-1317. Dostupné z: doi:10.1088/0960-1317/20/8/087003
- [112] KHANDAN, Omid, Daniel STARK, Alexander. CHANG a Masaru P. RAO. Wafer-scale titanium anodic bonding for microfluidic applications. *Sensors and Actuators B: Chemical* [online]. 2014, **205**, 244–248. ISSN 0925-4005. Dostupné z: doi:10.1016/j.snb.2014.08.083

- [113] STRONG, E. Brandon, Spencer A. SCHULTZ, Andres W. MARTINEZ a Nathaniel W. MARTINEZ. Fabrication of Miniaturized Paper-Based Microfluidic Devices (MicroPADs). *Scientific Reports* [online]. 2019, **9**(1), 7. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-018-37029-0
- [114] CARRELL, Cody, Alyssa KAVA, Michael NGUYEN, Ruth MENDER, Zarina MUNSHI, Zachary CALL, Mark NUSSBAUM a Charles HENRY. Beyond the lateral flow assay: A review of paper-based microfluidics. *Microelectronic Engineering* [online]. 2019, **206**, 45–54. ISSN 0167-9317. Dostupné z: doi:10.1016/j.mee.2018.12.002
- [115] AKYAZI, Tugce, Lourdes BASABE-DESMONTS a Fernando BENITO-LOPEZ. Review on microfluidic paper-based analytical devices towards commercialisation. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2018, **1001**, 1–17. ISSN 0003-2670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2017.11.010
- [116] XIA, Yanyan, Jin SI a Zhiyang LI. Fabrication techniques for microfluidic paper-based analytical devices and their applications for biological testing: A review. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2016, **77**, 774–789. ISSN 0956-5663. Dostupné z: doi:10.1016/j.bios.2015.10.032
- [117] DESJONQUERES, M.-C. a D. SPANJAARD. *Concepts in Surface Physics*. B.m.: Springer Science & Business Media, 2012. ISBN 978-3-642-61400-2.
- [118] OURA, K., V. G. LIFSHITS, Alexander SARANIN, A. V. ZOTOV a M. KATAYAMA. *Surface Science: An Introduction* [online]. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2003 [vid. 2019-07-23]. Advanced Texts in Physics. ISBN 978-3-540-00545-2. Dostupné z: <https://www.springer.com/gp/book/9783540005452>
- [119] KIM, Hyun-Min, Fumiaki MIYAJI, Tadashi KOKUBO a Takashi NAKAMURA. Preparation of bioactive Ti and its alloys via simple chemical surface treatment. *Journal of Biomedical Materials Research* [online]. 1996, **32**(3), 409–417. ISSN 1097-4636. Dostupné z: doi:10.1002/(SICI)1097-4636(199611)32:3<409::AID-JBM14>3.0.CO;2-B
- [120] ZHONG CHEN, Chuan, Xiang GUO MENG, Hui JUN YU, Han YANG, Ting HE, Dian GANG WANG a Shi GUI ZHAO. A Review of Coating Preparing Techniques of Bioactive Glass. *Advanced Materials Research* [online]. 2013, **833**, 202–207. Dostupné z: doi:10.4028/www.scientific.net/AMR.833.202
- [121] CHEN, Jianhui, Lei ZENG, Xiaofeng CHEN, Tianshun LIAO a Jiafu ZHENG. Preparation and characterization of bioactive glass tablets and evaluation of bioactivity and cytotoxicity in vitro. *Bioactive Materials* [online]. 2018, **3**(3), 315–321. ISSN 2452-199X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bioactmat.2017.11.004
- [122] AUTUMN, Kellar, Yiching A. LIANG, S. Tonia HSIEH, Wolfgang ZESCH, Wai Pang CHAN, Thomas W. KENNY, Ronald FEARING a Robert J. FULL. Adhesive force of a single gecko foot-hair. *Nature* [online]. 2000, **405**, 681–685. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/35015073
- [123] LIU, Yushuang, Zhong RUIBO, Ping ZHANG, Yuxing MA, Xiaoling YUN, Pei GONG, Jianmin WEI, Xinmin ZHAO a Feng ZHANG. Understanding the Robust Physisorption between Bovine Serum Albumin and Amphiphilic Polymer Coated Nanoparticles. *ACS applied materials & interfaces* [online]. 2015, **8**. Dostupné z: doi:10.1021/acsami.5b08386

- [124] SCHROTT, W., Z. SLOUKA, P. CERVENKA, J. STON, M. NEBYLA, M. PRIBYL a D. SNITA. Study on surface properties of PDMS microfluidic chips treated with albumin. *Biomicrofluidics* [online]. 2009, **3**(4), 44101–44101. ISSN 1932-1058. Dostupné z: doi:10.1063/1.3243913
- [125] AZEVEDO, Helena S. a Ricardo M. P. da SILVA. *Self-assembling Biomaterials: Molecular Design, Characterization and Application in Biology and Medicine*. B.m.: Woodhead Publishing, 2018. ISBN 978-0-08-102012-8.
- [126] HOFFMANN, Karl-Heinz. *Functional Micro- and Nanosystems: Proceedings of the 4th Caesarium, Bonn, June 16-18, 2003*. B.m.: Springer Science & Business Media, 2004. ISBN 978-3-540-21612-4.
- [127] AITHAL, Rajendra K., Amber T. DOSS, Deepak P. KUMARASWAMY, David K. MILLS a Debasish KUILA. Growth and Functionality of Cells Cultured on Conducting and Semi-Conducting Surfaces Modified with Self-Assembled Monolayers (SAMs). *Coatings* [online]. 2016, **6**(1), 9. Dostupné z: doi:10.3390/coatings6010009
- [128] AN, Y. H., G. W. STUART, S. J. MCDOWELL, S. E. MCDANIEL, Q. KANG a R. J. FRIEDMAN. Prevention of bacterial adherence to implant surfaces with a crosslinked albumin coating in vitro. *Journal of Orthopaedic Research* [online]. 1996, **14**(5), 846–849. ISSN 1554-527X. Dostupné z: doi:10.1002/jor.1100140526
- [129] HAN, Xuemingyue, Chong WU a Shuqing SUN. Photochemical reactions of thiol-terminated self-assembled monolayers (SAMs) for micropatterning of gold nanoparticles and controlled surface functionality. *Applied Surface Science* [online]. 2012, **258**, 5153–5156. Dostupné z: doi:10.1016/j.apsusc.2012.01.157
- [130] KIRA, Atsushi, Kazunori OKANO, Yoichiroh HOSOKAWA, Akira NAITO, Koh FUWA, Jyunpei YUYAMA a Hiroshi MASUHARA. Micropatterning of perfluoroalkyl self-assembled monolayers for arraying proteins and cells on chips. *Applied Surface Science - APPL SURF SCI* [online]. 2009, **255**. Dostupné z: doi:10.1016/j.apsusc.2009.04.044
- [131] KIEW, Ji Sheng, Xiaodi SUI, Yeh-Shiu CHU, Jean Paul THIERY a Isabel RODRIGUEZ. Fabrication of Adhesive Protein Micropatterns In Application of Studying Cell Surface Interactions. In: Chwee Teck LIM a James C. H. GOH, ed. *13th International Conference on Biomedical Engineering*. B.m.: Springer Berlin Heidelberg, 2009, s. 1980–1983. IFMBE Proceedings. ISBN 978-3-540-92841-6.
- [132] DIRSCHERL, Cindy a Sebastian SPRINGER. Protein micropatterns printed on glass: Novel tools for protein-ligand binding assays in live cells. *Engineering in Life Sciences* [online]. 2018, **18**(2), 124–131. ISSN 1618-2863. Dostupné z: doi:10.1002/elsc.201700010
- [133] HUANG, Nan, Chuen Wai LI a Barbara Pui CHAN. Protein Micropatterns: Multiphoton 3D Microprinting of Protein Micropatterns with Spatially Controlled Heterogeneity – A Platform for Single Cell Matrix Niche Studies (Adv. Biosys. 8/2018). *Advanced Biosystems* [online]. 2018, **2**(8), 1870072. ISSN 2366-7478. Dostupné z: doi:10.1002/adbi.201870072
- [134] WANG, Sheng, Cheryl WONG PO FOO, Ajithkumar WARRIER, Mu-ming POO, Sarah C. HEILSHORN a Xiang ZHANG. Gradient lithography of engineered proteins to fabricate 2D and 3D cell culture microenvironments. *Biomedical Microdevices* [online]. 2009, **11**(5), 1127–1134. ISSN 1387-2176, 1572-8781. Dostupné z: doi:10.1007/s10544-009-9329-1

- [135] HYUN, Jinho, Yingjie ZHU, Andrea LIEBMANN-VINSON, BEEBE Thomas P. a Ashutosh CHILKOTI. Microstamping on an Activated Polymer Surface: Patterning Biotin and Streptavidin onto Common Polymeric Biomaterials. *Langmuir* [online]. 2001, **17**(20), 6358–6367. ISSN 0743-7463. Dostupné z: doi:10.1021/la010695x
- [136] AIZAWA, T., K. ITOH a T. FUKUDA. Fine micro-stamping system for micro-pattern printing onto polymers and glasses. In: *10th International Conference on Technology of Plasticity, ICTP 2011: Proceedings of the 10th International Conference on Technology of Plasticity, ICTP 2011* [online]. 2011, s. 1097–1102 [vid. 2019-07-23]. Dostupné z: <https://shibaura.pure.elsevier.com/en/publications/fine-micro-stamping-system-for-micro-pattern-printing-onto-polyme>
- [137] KHADEMHOSEINI, Ali. *Micro and Nanoengineering of the Cell Microenvironment: Technologies and Applications*. B.m.: Artech House, 2008. ISBN 978-1-59693-149-7.
- [138] DELAMARCHE, E. Patterned Delivery of Immunoglobulins to Surfaces Using Microfluidic Networks. *Science* [online]. 1997, **276**(5313), 779–781. ISSN 00368075, 10959203. Dostupné z: doi:10.1126/science.276.5313.779
- [139] RUOSLAHTI, Erkki. RGD AND OTHER RECOGNITION SEQUENCES FOR INTEGRINS. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* [online]. 1996, **12**(1), 697–715. ISSN 1081-0706, 1530-8995. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.cellbio.12.1.697
- [140] Physics of Microfluidics - Basic Properties of Microfluidic Flows. *Fluigent* [online]. [vid. 2019-07-23]. Dostupné z: <https://www.fluigent.com/physics-of-microfluidics/>
- [141] TRITTON, D. J. *Physical Fluid Dynamics*. B.m.: Clarendon Press, 1988. ISBN 978-0-19-854493-7.
- [142] SONG, Yujun, Xiaoxiong ZHAO, Qingkun TIAN a Hongxia LIANG. Fundamental Concepts and Physics in Microfluidics. In: Yujun SONG, Daojian CHENG a Liang ZHAO *Microfluidics: Fundamental, Devices and Applications* [online]. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2018 [vid. 2019-07-23], s. 19–111. ISBN 978-3-527-80064-3. Dostupné z: doi:10.1002/9783527800643.ch2
- [143] TABELING, Patrick. Recent progress in the physics of microfluidics and related biotechnological applications. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. 2014, **25**, Analytical biotechnology, 129–134. ISSN 0958-1669. Dostupné z: doi:10.1016/j.copbio.2013.11.009
- [144] BEEBE, David J., Glennys A. MENSING a Glenn M. WALKER. Physics and Applications of Microfluidics in Biology. *Annual Review of Biomedical Engineering* [online]. 2002, **4**(1), 261–286. ISSN 1523-9829, 1545-4274. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.bioeng.4.112601.125916
- [145] YOO, Eun-Hyung a Soo-Youn LEE. Glucose Biosensors: An Overview of Use in Clinical Practice. *Sensors* [online]. 2010, **10**(5), 4558–4576. ISSN 1424-8220. Dostupné z: doi:10.3390/s100504558
- [146] TURNER, Anthony P. F., Isao KARUBE a George S. WILSON, ed. *Biosensors: Fundamentals and Applications*. Oxford Oxfordshire ; New York: Oxford University Press, 1987. ISBN 978-0-19-854724-2.

- [147] INAMUDDIN, Tauseef Ahmad RANGREEZ, Mohd Imran AHAMED a Abdullah M. ASIRI. *Biosensors - Materials and Applications*. B.m.: Materials Research Forum LLC, 2019. ISBN 978-1-64490-013-0.
- [148] URBAN, Gerald A. Micro- and nanobiosensors—state of the art and trends. *Measurement Science and Technology* [online]. 2008, **20**(1), 012001. ISSN 0957-0233. Dostupné z: doi:10.1088/0957-0233/20/1/012001
- [149] VO-DINH, T. a B. CULLUM. Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* [online]. 2000, **366**(6), 540–551. ISSN 1432-1130. Dostupné z: doi:10.1007/s002160051549
- [150] BHALLA, N., P. JOLLY, N. FORMISANO a P. ESTRELA. Introduction to biosensors. *Essays in biochemistry* [online]. 2016, **60**(1), 1–8. ISSN 0071-1365. Dostupné z: doi:10.1042/EBC20150001
- [151] ANTUÑA-JIMÉNEZ, Daniel, Goretti DÍAZ-DÍAZ, M. Carmen BLANCO-LÓPEZ, M. Jesús LOBO-CASTAÑÓN, Arturo J. MIRANDA-ORDIERES a Paulino TUÑÓN-BLANCO. Chapter 1 - Molecularly Imprinted Electrochemical Sensors: Past, Present, and Future. In: Songjun LI, Yi GE, Sergey A. PILETSKY a Joseph LUNEC, ed. *Molecularly Imprinted Sensors* [online]. Amsterdam: Elsevier, 2012 [vid. 2019-07-23], s. 1–34. ISBN 978-0-444-56331-6. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-444-56331-6.00001-3
- [152] PRICE, Heather. Air Analysis | Field Portable Instruments for the Measurement of Airborne Hazards. In: Paul WORSFOLD, Colin POOLE, Alan TOWNSHEND a Manuel MIRÓ, ed. *Encyclopedia of Analytical Science (Third Edition)* [online]. Oxford: Academic Press, 2019 [vid. 2019-07-23], s. 40–43. ISBN 978-0-08-101984-9. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-409547-2.12680-0
- [153] BAKKER, Eric a Martin TELTING-DIAZ. Electrochemical Sensors. *Analytical Chemistry* [online]. 2002, **74**(12), 2781–2800. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac0202278
- [154] SINGH, Pranveer. SPR Biosensors: Historical Perspectives and Current Challenges. *Sensors and Actuators B: Chemical* [online]. 2016, **229**, 110–130. ISSN 0925-4005. Dostupné z: doi:10.1016/j.snb.2016.01.118
- [155] FIRDOUS, S., S. ANWAR a R. RAFYA. Development of surface plasmon resonance (SPR) biosensors for use in the diagnostics of malignant and infectious diseases. *Laser Physics Letters* [online]. 2018, **15**(6), 065602. ISSN 1612-202X. Dostupné z: doi:10.1088/1612-202X/aab43f
- [156] FANG, Ye. Total Internal Reflection Fluorescence Quantification of Receptor Pharmacology. *Biosensors* [online]. 2015, **5**(2), 223–240. Dostupné z: doi:10.3390/bios5020223
- [157] TAITT, C. R. a S. H. NORTH. 17 - Total internal reflection fluorescence (TIRF) array biosensors for biothreat agents for food safety and food defense. In: Arun K. BHUNIA, Moon S. KIM a Chris R. TAITT, ed. *High Throughput Screening for Food Safety Assessment* [online]. B.m.: Woodhead Publishing, 2015 [vid. 2019-07-23], Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, s. 399–424. ISBN 978-0-85709-801-6. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-85709-801-6.00017-4

- [158] LI, K., S. WANG, L. WANG, H. YU, N. JING, R. XUE a Z. WANG. Fast and Sensitive Ellipsometry-Based Biosensing. *Sensors (Basel, Switzerland)* [online]. 2018, **18**(1) [vid. 2019-07-23]. ISSN 1424-8220. Dostupné z: doi:10.3390/s18010015
- [159] LÄNGE, Kerstin, Bastian RAPP a Michael RAPP. Surface Acoustic Wave Biosensors: A Review. *Analytical and bioanalytical chemistry* [online]. 2008, **391**, 1509–19. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-008-1911-5
- [160] TIGLI, O. a M. E. ZAGHLOUL. Surface acoustic wave (SAW) biosensors. In: *2010 53rd IEEE International Midwest Symposium on Circuits and Systems: 2010 53rd IEEE International Midwest Symposium on Circuits and Systems* [online]. 2010, s. 77–80. Dostupné z: doi:10.1109/MWSCAS.2010.5548565
- [161] WANG, Ting, Dianpeng QI, Hui YANG, Zhiyuan LIU, Ming WANG, Wan Ru LEOW, Geng CHEN, Jiancan YU, Ke HE, Hongwei CHENG, Yun-Long WU, Han ZHANG a Xiaodong CHEN. Tactile Chemomechanical Transduction Based on an Elastic Microstructured Array to Enhance the Sensitivity of Portable Biosensors. *Advanced Materials* [online]. 2018, **31**, 1803883. Dostupné z: doi:10.1002/adma.201803883
- [162] MITSUBAYASHI, Kohji, Takahiro OHGOSHI, Toshiaki OKAMOTO, Yoshihiko WAKABAYASHI, Masaharu KOZUKA, Kumiko MIYAJIMA, Hirokazu SAITO a Hiroyuki KUDO. Tonometric biosensor with a differential pressure sensor for chemo-mechanical measurement of glucose. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2009, **24**(5), Selected Papers from the Tenth World Congress on Biosensors Shanghai, China, May 14-16, 2008, 1518–1521. ISSN 0956-5663. Dostupné z: doi:10.1016/j.bios.2008.08.014
- [163] HUNDECK, H. G., M. WEIß, T. SCHEPER a F. SCHUBERT. Calorimetric biosensor for the detection and determination of enantiomeric excesses in aqueous and organic phases. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 1993, **8**(3), 205–208. ISSN 0956-5663. Dostupné z: doi:10.1016/0956-5663(93)85034-L
- [164] DANIELSSON, Bengt. Calorimetric biosensors. *Journal of Biotechnology* [online]. 1990, **15**(3), Biosensors, 187–200. ISSN 0168-1656. Dostupné z: doi:10.1016/0168-1656(90)90026-8
- [165] PAMME, Nicole. Continuous flow separations in microfluidic devices. *Lab on a Chip* [online]. 2007, **7**(12), 1644. ISSN 1473-0197, 1473-0189. Dostupné z: doi:10.1039/b712784g
- [166] SMISTRUP, Kristian, Ole HANSEN, Henrik BRUUS a Mikkel F. HANSEN. Magnetic separation in microfluidic systems using microfabricated electromagnets—experiments and simulations. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* [online]. 2005, **293**(1), Proceedings of the Fifth International Conference on Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers, 597–604. ISSN 0304-8853. Dostupné z: doi:10.1016/j.jmmm.2005.01.079
- [167] HUANG, L. R. Continuous Particle Separation Through Deterministic Lateral Displacement. *Science* [online]. 2004, **304**(5673), 987–990. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.1094567
- [168] HE, Mei a Amy E HERR. Automated microfluidic protein immunoblotting. *Nature Protocols* [online]. 2010, **5**(11), 1844–1856. ISSN 1754-2189, 1750-2799. Dostupné z: doi:10.1038/nprot.2010.142

- [169] OTTESEN, Elizabeth A., Jong Wook HONG, Stephen R. QUAKE a Jared R. LEADBETTER. Microfluidic Digital PCR Enables Multigene Analysis of Individual Environmental Bacteria. *Science* [online]. 2006, **314**(5804), 1464–1467. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.1131370
- [170] WANG, Lin a Paul C. H. LI. Microfluidic DNA microarray analysis: A review. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2011, **687**(1), 12–27. ISSN 0003-2670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2010.11.056
- [171] BARBULOVIC-NAD, Irena, Michael LUCENTE, Yu SUN, Mingjun ZHANG, Aaron R. WHEELER a Markus BUSSMANN. Bio-Microarray Fabrication Techniques—A Review. *Critical Reviews in Biotechnology* [online]. 2006, **26**(4), 237–259. ISSN 0738-8551, 1549-7801. Dostupné z: doi:10.1080/07388550600978358
- [172] DIXIT, Chandra a Gerson AGUIRRE. Protein Microarrays with Novel Microfluidic Methods: Current Advances. *Microarrays* [online]. 2014, **3**(3), 180–202. ISSN 2076-3905. Dostupné z: doi:10.3390/microarrays3030180
- [173] HAMAD, E. M., G. HAWAMDEH, N. A. JARRAD, O. YASIN, S. I. AL-GHARABLI a R. SHADFAN. Detection of Human Chorionic Gonadotropin (hCG) Hormone using Digital Lateral Flow Immunoassay. In: *2018 40th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC): 2018 40th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC)* [online]. 2018, s. 3845–3848. Dostupné z: doi:10.1109/EMBC.2018.8513355
- [174] JIANG, Xingyu, Jessamine M K NG, Abraham STROOCK, Stephan K W DERTINGER a George M WHITESIDES. A Miniaturized, Parallel, Serially Diluted Immunoassay for Analyzing Multiple Antigens. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 2003, **125**, 5294–5. Dostupné z: doi:10.1021/ja034566+
- [175] NG, Alphonsus H. C., Uvaraj UDDAYASANKAR a Aaron R. WHEELER. Immunoassays in microfluidic systems. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2010, **397**(3), 991–1007. ISSN 1618-2642, 1618-2650. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-010-3678-8
- [176] LENG, Jacques a Jean-Baptiste SALMON. Microfluidic crystallization. *Lab Chip* [online]. 2009, **9**(1), 24–34. ISSN 1473-0197, 1473-0189. Dostupné z: doi:10.1039/B807653G
- [177] EL-ALI, Jamil, Peter K. SORGER a Klavs F. JENSEN. Cells on chips. *Nature* [online]. 2006, **442**(7101), 403–411. ISSN 0028-0836, 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/nature05063
- [178] KING, Kevin R., Sihong WANG, Daniel IRIMIA, Arul JAYARAMAN, Mehmet TONER a Martin L. YARMUSH. A high-throughput microfluidic real-time gene expression living cell array. *Lab Chip* [online]. 2007, **7**(1), 77–85. ISSN 1473-0197, 1473-0189. Dostupné z: doi:10.1039/B612516F
- [179] HUNG, Paul J., Philip J. LEE, Poorya SABOUNCHI, Robert LIN a Luke P. LEE. Continuous perfusion microfluidic cell culture array for high-throughput cell-based assays. *Biotechnology and Bioengineering* [online]. 2005, **89**(1), 1–8. ISSN 0006-3592, 1097-0290. Dostupné z: doi:10.1002/bit.20289

- [180] ENGLERT, D. L., M. D. MANSON a A. JAYARAMAN. Flow-Based Microfluidic Device for Quantifying Bacterial Chemotaxis in Stable, Competing Gradients. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2009, **75**(13), 4557–4564. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.02952-08
- [181] TAN, J. L., J. TIEN, D. M. PIRONE, D. S. GRAY, K. BHADRIRAJU a C. S. CHEN. Cells lying on a bed of microneedles: An approach to isolate mechanical force. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2003, **100**(4), 1484–1489. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0235407100
- [182] LIU, Valerie A., William E. JASTROMB a Sangeeta N. BHATIA. Engineering protein and cell adhesivity using PEO-terminated triblock polymers. *Journal of Biomedical Materials Research* [online]. 2002, **60**(1), 126–134. ISSN 0021-9304, 1097-4636. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.10005
- [183] TOEPKE, Michael W. a David J. BEEBE. PDMS absorption of small molecules and consequences in microfluidic applications. *Lab on a Chip* [online]. 2006, **6**(12), 1484. ISSN 1473-0197, 1473-0189. Dostupné z: doi:10.1039/b612140c
- [184] WANG, ShuQi, Dusan SARENAC, Michael H. CHEN, Shih-Han HUANG, Francoise F. GIGUEL, Daniel R. KURITZKES a Utkan DEMIRCI. Simple filter microchip for rapid separation of plasma and viruses from whole blood. *Dove Medical Press* [online]. 2012 [vid. 2019-07-23]. ISSN 1178-2013. Dostupné z: <https://dspace.mit.edu/handle/1721.1/88156>
- [185] SALIBA, A.-E., L. SAIAS, E. PSYCHARI, N. MINC, D. SIMON, F.-C. BIDARD, C. MATHIOT, J.-Y. PIERGA, V. FRAISIER, J. SALAMERO, V. SAADA, F. FARACE, P. VIELH, L. MALAQUIN a J.-L. VIOVY. Microfluidic sorting and multimodal typing of cancer cells in self-assembled magnetic arrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2010, **107**(33), 14524–14529. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1001515107
- [186] LEE, Gwo-Bin, Chen-I HUNG, Bin-Jo KE, Guan-Ruey HUANG, Bao-Herng HWEI a Hui-Fang LAI. Hydrodynamic Focusing for a Micromachined Flow Cytometer. *Journal of Fluids Engineering* [online]. 2001, **123**(3), 672. ISSN 00982202. Dostupné z: doi:10.1115/1.1385514
- [187] LI, Paul C. H. a D. Jed HARRISON. Transport, Manipulation, and Reaction of Biological Cells On-Chip Using Electrokinetic Effects. *Analytical Chemistry* [online]. 1997, **69**(8), 1564–1568. ISSN 0003-2700, 1520-6882. Dostupné z: doi:10.1021/ac9606564
- [188] FRANKE, T., S. BRAUNMÜLLER, L. SCHMID, A. WIXFORTH a D. A. WEITZ. Surface acoustic wave actuated cell sorting (SAWACS). *Lab on a Chip* [online]. 2010, **10**(6), 789. ISSN 1473-0197, 1473-0189. Dostupné z: doi:10.1039/b915522h
- [189] ZHANG, Jun, Sheng YAN, Ronald SLUYTER, Weihua LI, Gursel ALICI a Nam-Trung NGUYEN. Inertial particle separation by differential equilibrium positions in a symmetrical serpentine micro-channel. *Scientific Reports* [online]. 2015, **4**(1), 4527. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep04527
- [190] VALIZADEH, Alireza a Ahmad Yari KHOSROUSHAHI. Single-cell analysis based on lab on a chip fluidic system. *Analytical Methods* [online]. 2015, **7**(20), 8524–8533. ISSN 1759-9660, 1759-9679. Dostupné z: doi:10.1039/C5AY02029H

- [191] BROUZES, Eric, Martina MEDKOVA, Neal SAVENELLI, Dave MARRAN, Mariusz TWARDOWSKI, J. Brian HUTCHISON, Jonathan M. ROTHBERG, Darren R. LINK, Norbert PERRIMON a Michael L. SAMUELS. Droplet microfluidic technology for single-cell high-throughput screening. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2009, **106**(34), 14195–14200. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0903542106
- [192] GOLAS, Alyssa Reiffel, Karina A. HERNANDEZ a Jason A. SPECTOR. Tissue Engineering for Plastic Surgeons: A Primer. *Aesthetic Plastic Surgery* [online]. 2014, **38**(1), 207–221. ISSN 1432-5241. Dostupné z: doi:10.1007/s00266-013-0255-5
- [193] HUH, Dongeun, Geraldine A. HAMILTON a Donald E. INGBER. From 3D cell culture to organs-on-chips. *Trends in Cell Biology* [online]. 2011, **21**(12), 745–754. ISSN 09628924. Dostupné z: doi:10.1016/j.tcb.2011.09.005
- [194] PANDEY, Chandra, Shine AUGUSTINE, Saurabh KUMAR, Suveen KUMAR, Sharda NARA, Saurabh SRIVASTAVA a Bansi MALHOTRA. Microfluidics Based Point-of-Care Diagnostics. *Biotechnology Journal* [online]. 2017, **13**. Dostupné z: doi:10.1002/biot.201700047
- [195] PRAKASH, Shaurya, Marie PINTI a Bharat BHUSHAN. Theory, fabrication and applications of microfluidic and nanofluidic biosensors. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* [online]. 2012, **370**(1967), 2269–2303. ISSN 1364-503X, 1471-2962. Dostupné z: doi:10.1098/rsta.2011.0498
- [196] PANDEY, Jagdish, Yu-Te LIAO, Andrew LINGLEY, Ramin MIRJALILI, Babak PARVIZ a Brian P. OTIS. A Fully Integrated RF-Powered Contact Lens With a Single Element Display. *IEEE Transactions on Biomedical Circuits and Systems* [online]. 2010, **4**(6), 454–461. ISSN 1932-4545, 1940-9990. Dostupné z: doi:10.1109/TBCAS.2010.2081989
- [197] ARCAND, B. Y., P. T. BHATTI, N. V. BUTALA, J. WANG, C. R. FRIEDRICH a K. D. WISE. Active positioning device for a perimodiolar cochlear electrode array. *Microsystem Technologies* [online]. 2004, **10**(6), 478–483. ISSN 1432-1858. Dostupné z: doi:10.1007/s00542-004-0376-5
- [198] HAJJHASSAN, Mohamad, Vamsy CHODAVARAPU a Sam MUSALLAM. NeuroMEMS: Neural Probe Microtechnologies. *Sensors* [online]. 2008, **8**(10), 6704–6726. ISSN 1424-8220. Dostupné z: doi:10.3390/s8106704
- [199] GUO, Cecilia Yan, Jukka Pekka MATINLINNA a Alexander Tin Hong TANG. Effects of Surface Charges on Dental Implants: Past, Present, and Future. *International Journal of Biomaterials* [online]. 2012 [vid. 2019-07-23]. Dostupné z: doi:10.1155/2012/381535
- [200] DITTRICH, Petra S. a Andreas MANZ. Lab-on-a-chip: microfluidics in drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery* [online]. 2006, **5**(3), 210–218. ISSN 1474-1776, 1474-1784. Dostupné z: doi:10.1038/nrd1985
- [201] KANG, L. Microfluidics for drug discovery and development: From target selection to product lifecycle management. *Drug Discovery Today* [online]. 2008, **13**(1–2), 1–13. ISSN 13596446. Dostupné z: doi:10.1016/j.drudis.2007.10.003
- [202] SINGH, T. R. R., H. MCMILLAN, K. MOONEY, A. Z. ALKILANI a R. F. DONNELLY. 6 - Microneedles for drug delivery and monitoring. In: Xiujun (James) LI a Yu ZHOU, ed. *Microfluidic Devices for Biomedical Applications* [online]. B.m.: Woodhead Publishing, 2013

[vid. 2019-07-23], Woodhead Publishing Series in Biomaterials, s. 185–230. ISBN 978-0-85709-697-5. Dostupné z: doi:10.1533/9780857097040.2.185

- [203] RAJESWARI, N. Raja a P. MALLIGA. Microfluidic system using microneedles for targeted drug delivery in cancer therapy. In: *INTERNATIONAL CONFERENCE ON SMART STRUCTURES AND SYSTEMS - ICSSS'13: INTERNATIONAL CONFERENCE ON SMART STRUCTURES AND SYSTEMS - ICSSS'13* [online]. 2013, s. 53–59. Dostupné z: doi:10.1109/ICSSS.2013.6623000
- [204] YANG, Fan, Chuan GAO, Ping WANG, Guo-Jun ZHANG a Zuanguang CHEN. *Fish-on-a-Chip: Microfluidics for Zebrafish Research* [online]. 2016. Dostupné z: doi:10.1039/C6LC00044D
- [205] AKAGI, Jin, Khashayar KHOSHMANESH, Barbara EVANS, Chris J. HALL, Kathryn E. CROSIER, Jonathan M. COOPER, Philip S. CROSIER a Donald WLODKOWIC. Miniaturized Embryo Array for Automated Trapping, Immobilization and Microperfusion of Zebrafish Embryos. *PLoS ONE* [online]. 2012, **7**(5), e36630. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0036630
- [206] LEE, Joon Seok, Sahng Ha LEE, Jae Hong KIM a Chan Beum PARK. Artificial photosynthesis on a chip: microfluidic cofactor regeneration and photoenzymatic synthesis under visible light. *Lab on a Chip* [online]. 2011, **11**(14), 2309–2311. ISSN 1473-0189. Dostupné z: doi:10.1039/C1LC20303G
- [207] GROSSMANN, Guido, Woei-Jiun GUO, David W. EHRHARDT, Wolf B. FROMMER, Rene V. SIT, Stephen R. QUAKE a Matthias MEIER. The RootChip: An Integrated Microfluidic Chip for Plant Science. *The Plant Cell* [online]. 2011, **23**(12), 4234–4240. ISSN 1040-4651, 1532-298X. Dostupné z: doi:10.1105/tpc.111.092577
- [208] STANLEY, Claire E., Guido GROSSMANN, Xavier Casadevall i SOLVAS a Andrew J. DEMELLO. Soil-on-a-Chip: microfluidic platforms for environmental organismal studies. *Lab on a Chip* [online]. 2016, **16**(2), 228–241. ISSN 1473-0189. Dostupné z: doi:10.1039/C5LC01285F
- [209] PARASHAR, Archana a Santosh PANDEY. Plant-in-chip: Microfluidic system for studying root growth and pathogenic interactions in Arabidopsis. *Applied Physics Letters* [online]. 2011, **98**(26), 263703. ISSN 0003-6951. Dostupné z: doi:10.1063/1.3604788
- [210] ZHOU, Wenting, Jian LE, Yang CHEN, Ying CAI, Zhanying HONG a Yifeng CHAI. Recent advances in microfluidic devices for bacteria and fungus research. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2019, **112**, 175–195. ISSN 0165-9936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2018.12.024
- [211] ZANG, Xiao-Qian, Zhe-Yu LI, Xiao-Yan ZHANG, Lei JIANG, Nan-Qi REN a Kai SUN. Advance in Bacteria Chemotaxis on Microfluidic Devices. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* [online]. 2017, **45**(11), 1734–1744. ISSN 1872-2040. Dostupné z: doi:10.1016/S1872-2040(17)61050-8
- [212] CORNAGLIA, Matteo, Thomas LEHNERT a Martin A. M. GIJS. Microfluidic systems for high-throughput and high-content screening using the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Lab on a Chip* [online]. 2017, **17**(22), 3736–3759. ISSN 1473-0189. Dostupné z: doi:10.1039/C7LC00509A

- [213] MONDAL, Sudip, Evan HEGARTY, Chris MARTIN, Sertan Kutal GÖKÇE, Navid GHORASHIAN a Adela BEN-YAKAR. Large-scale microfluidics providing high-resolution and high-throughput screening of *Caenorhabditis elegans* poly-glutamine aggregation model. *Nature Communications* [online]. 2016, **7**, 13023. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/ncomms13023
- [214] BANSE, Stephen A., Benjamin W. BLUE, Kristin J. ROBINSON, Cody M. JARRETT a Patrick C. PHILLIPS. The Stress-Chip: A microfluidic platform for stress analysis in *Caenorhabditis elegans*. *PLOS ONE* [online]. 2019, **14**(5), e0216283. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0216283