

**VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ**

**FAKULTA CHEMICKÁ**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Brno, 2022

Jakub Vejrosta



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

## ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

## CHARAKTERIZACE MIKROFLUIDNÍCH ČIPŮ

CHARACTERIZATION OF MICROFLUIDIC CHIPS

## BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

## AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Jakub Vejrosta

## VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Tereza Venerová, Ph.D.

BRNO 2022

## Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1687/2021 Akademický rok: 2021/22  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Student: **Jakub Vejrosta**  
Studijní program: Chemie a chemické technologie  
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace  
Vedoucí práce: **Ing. Tereza Venerová, Ph.D.**

### Název bakalářské práce:

Charakterizace mikrofluidních čipů

### Zadání bakalářské práce:

1. Provést rešerši na téma příprava mikrofluidních zařízení pro výzkum modelových membránových systémů a jejich charakterizace.
2. Na základě rešerše a v návaznosti na práci předchozích studentů provést přípravu jednoduchého mikrofluidního čipu. Navrhnout metodiku vhodnou k ověření těsnosti čipu.
3. Zhodnotit vlastnosti připravených čipů v závislosti na vnějších podmínkách a stáří čipu.

### Termín odevzdání bakalářské práce: 27.5.2022:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

-----  
Jakub Vejrosta

student

Ing. Tereza Venerová, Ph.D.

vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.

vedoucí ústavu  
-----

V Brně dne 1.2.2022

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.

Děkan

## **ABSTRAKT**

V dnešní době, kdy se posouváme stále do menších měřítek, se uplatňuje mikrofluidika, která může mít v budoucnu velké uplatnění. Tato práce se věnuje optimalizaci přípravy a výroby mikrofluidního čipu, který je složen ze dvou částí. Jedna část je z polydimethylsiloxanu (PDMS) čipu a druhá je krycí sklíčko. V této práci je zdokonalen postup výroby tohoto čipu. Pomocí fluorescenční mikroskopie byla testována funkčnost těchto čipů a vliv stárnutí na jejich vlastnosti a charakteristiky

## **ABSTRACT**

Nowadays, when we are moving to smaller and smaller scales, microfluidics is being used, which helps us to move from fluid devices to the dimensions of microfluidics, which may have a great application in the future. This work deals with the correct preparation and production of a microfluidic chip. Which consist of two parts. One part is the polydimethylsiloxane (PDMS) part of the chip, and the other is the coverslip. In this work, the production process of this chip is improved. The functionality of these chips and the time dependence of the age of the chip and the polydimethylsiloxane from which the chips are made were tested using fluorescence microscopy.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

PDMS část čipu, křemíková maska, krycí sklíčko

## **KEYWORDS**

PDMS part of chip, silicon mask, coverslip

VEJROSTA, Jakub. *Charakterizace mikrofluidních čipů*. Brno, 2022. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/138981>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Ing. Tereza Venerová PhD.

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....  
podpis studenta

## PODĚKOVÁNÍ

*Chtěl bych poděkovat paní Ing. Tereze Venerové, PhD. za vedení celé práce, její skvělý přístup a ochotu při řešení jakéhokoliv problému, který se naskytl. Dále bych chtěl poděkovat paní Ing. Tereze Venerové, PhD. a panu prof. Ing. Miloslavu Pekařovi, CSc. za získání dalších pěti křemíkových masek pro výrobu čipů z Akademie věd ČR. Také děkuji své rodině a přátelům za pomoc a některé nové nápady při řešení této práce. V poslední řadě bych chtěl poděkovat Bc. Kateřině Haluzové za seznámení s výrobou mikrofluidních čipů u nás na fakultě.*

## Obsah

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>9</b>
2.1	Mikrofluidika .....	9
2.2	Reynoldsovo číslo .....	9
2.2.1	Laminární proudění .....	10
2.2.2	Turbulentní proudění .....	10
2.3	Luminiscence .....	11
2.3.1	Fluorescence a fosforescence .....	11
2.4	Mikroskopie .....	13
2.4.1	Optická mikroskopie .....	13
2.4.2	Fluorescenční mikroskopie .....	13
2.5	Plazma .....	13
2.6	Mikrofluidní zařízení .....	14
<b>3</b>	<b>SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY</b> .....	<b>15</b>
3.1	Materiály používané na výrobu čipů .....	15
3.2	Sklo a křemík .....	15
3.3	Polymery .....	15
3.4	Polydimetylsiloxane .....	17
3.4.1	Použití PDMS .....	17
3.5	Měkká litografie .....	18
3.5.1	Měkká litografie pro PDMS .....	18
3.6	Úprava PDMS pomocí plazmatu .....	18
<b>4</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>20</b>
4.1	Použité chemikálie .....	20
4.2	Přístroje a pomůcky .....	20
4.3	Metody přípravy výroby mikrofluidního čipu .....	21
4.4	Metody zkoumání PDMS čipu .....	24
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUSE</b> .....	<b>25</b>
5.1	Odlévání PDMS .....	25
5.2	Vyřezávání PDMS .....	25

<b>5.3 Lepení čipu .....</b>	<b>27</b>
<b>5.3.1 Doba plazmování.....</b>	<b>27</b>
<b>5.3.2 Lepení čipů.....</b>	<b>28</b>
<b>5.4 Ověření těsnosti připravených čipů .....</b>	<b>28</b>
<b>5.4.1 Ověření těsnosti čipů při plazmování jedné části.....</b>	<b>28</b>
<b>5.4.2 Ověření těsnosti čipů plazmovaných po dobu 42 sekund .....</b>	<b>29</b>
<b>5.4.3 Ověření těsnosti čipů plazmovaných po dobu 84 sekund .....</b>	<b>30</b>
<b>5.4.3 Ověření těsnosti čipů plazmovaných po dobu 128 sekund .....</b>	<b>30</b>
<b>5.5 Zkoumání povrchu PDMS části čipu pomocí AFM mikroskopu.....</b>	<b>32</b>
<b>5.5.1 Měření povrchu PDMS části čipu, která nebyla oplazmována.....</b>	<b>32</b>
<b>5.5.1 Měření povrchu PDMS části čipu, která byla oplazmována.....</b>	<b>33</b>
<b>5.6 Vliv vnějších podmínek na těsnost čipu.....</b>	<b>35</b>
<b>5.6.1 Vnější faktory ovlivňující těsnost čipů.....</b>	<b>35</b>
<b>5.7 Zkoumání struktury čipu pomocí metody FLIM .....</b>	<b>37</b>
<b>5.8 Vyhodnocení vhodné doby plazmování .....</b>	<b>38</b>
<b>6 ZÁVĚR.....</b>	<b>40</b>
<b>7 CITACE .....</b>	<b>41</b>
<b>8 SEZAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....</b>	<b>45</b>

# 1 Úvod

Výroba čipů a jejich využití v dnešní době nabírá nový rozměr, kdy se z pomalé fluidiky dostáváme do mikrofluidních procesů a díky těmto převodům do malých rozměrů se nám otevírají nové možnosti zkoumání orgánů a buněčných membrán a jiných aplikací v mikro provedení. Široká škála využitelnosti mikročipů přináší další požadavky pro výrobu takovýchto mikrofluidních čipů.

Výroba nových léčiv a kosmetických přípravků a zkoumání jejich využití začíná být v dnešní době protestů proti testování na živých organismech složité a náročné časově i finančně. Orgány na čipu by mohli být v tomto případě prekurzorem v prvním a základním testování nových látek. V budoucnu by se mohla výroba orgánů na čipech urychlit možná dokonce i mechanizovat, čímž by se snížili náklady i čas strávený při základním testování nových látek určených pro výrobu léčiv. Výhodou oproti testování na zvířatech je odstranění problému se šlechtěním a růstem zvířat.

Orgány na čipu se vyvíjejí jako užitečné pomůcky na modelování a zkoumání průchodu dané látky přes studovanou membránu. Jedná se o jedno z využití orgánů na čipu. V posledních letech se orgány na čipu pomalu vytváří v podmínkách, ve kterých by mohli fungovat pro realističtější modelování in vitro modelů buněk. Mikrofluidika neboli obor zabývající se studiem prouděním v objektech, které mají malou velikost má možnost přinést ke studii orgánu na čipech nemalé poznatky.

## 2 Teoretická část

### 2.1 Mikrofluidika

Mikrofluidika je obor, který posouvá pomalou fluidiku do rozměrů od jednotek mikrometrů do jednoho milimetru. Pokud by se jednalo o rozměry ještě menší, nazvali bychom takovou vědu nanofluidika [1]. V současné době jsou známy mikrofluidní aparáty pracující jako čerpadla, filtry, mísiče a chemické reaktory [3]. Mikrofluidika je technika generování a řízení pohybu tekutin v kanálcích. Tyto kanálky v mikrofluidice jsou rozměrově srovnatelné s velikostí buněk. Využití mikrofluidika nachází v biomedicínských oborech [1].

Mikrofluidní reaktor je v dnešní době již zaužívaný pojem. Jedná se o systém, který je svojí rychlostí a vlastnostmi schopen dosahovat stejné rychlosti proudění jaká je v průmyslových trubkových reaktorech. Výhodou tohoto mikrofluidního reaktoru je, že se spotřebuje pouze nezbytně nutné množství katalyzátoru a má nízkou spotřebu surovin. V praxi jsou tyto mikrofluidní reaktory případně čipy vyráběny z různých materiálů, nejčastěji i nejlevněji jsou reaktory složené ze dvou protilehlých destiček, do kterých je vyleptána s velkou přesností vždy polovina průtočného kanálu. Vnitřní průřez může být kruhový, zpravidla však jde o kombinaci obdélníkového a elipsoidního průřezu [8]. Bereme-li v úvahu souvislost mikrofluidiky s mikroelektronikou, potom by se jednalo o použitou výrobní technologii. Často se také jedná o monokrystalický čip společně s elektronickými obvody. Tyto systémy například měří vlastnosti tekutiny, řídí a vykonávají funkce. Na tomto monokrystalickém čipu se kanálky a další prvky protékané tekutinou zhotovují [1]. Zvyšující se síla počítačové a výpočetní techniky nám může umožnit matematické modelování mikrofluidních zařízení [2]. Na toto modelování jsou využívány různé programy jako například ComSol nebo SolidWorks.

Hlavní charakteristiky mikrofluidních aparátů jsou:

- Vysoká hodnota SV poměru (poměr velikosti povrchu a vnitřního objemu zařízení)
- Krátké transportní vzdálenosti
- Malé množství zpracovávané tekutiny
- Velmi snadná paralelizace
- Vysoký stupeň integrace

Například vysoká hodnota SV poměru (poměr velikosti povrchu a vnitřního objemu zařízení) umožňuje rychlé odvádění nebo přivádění tepla do systému za použití velmi malé hybné síly. Vysoká hodnota SV poměru zajišťuje dostatečné množství reakčního povrchu pro provádění heterogenních aplikací (chemické a biochemické interakce) [3].

Zmenšováním struktur do mikrofluidiky, se zmenšuje pravděpodobnost klasického turbulentního proudění, což vede k lepšímu matematickému modelování, které využívá teorii kontinua [2]. Vytváření takovýchto struktur vyžaduje zavedení nových veličin, kterými se zabývají Reynoldsova čísla [4].

### 2.2 Reynoldsovo číslo

Reynoldsovo číslo charakterizuje proudění kapaliny v mikrofluidních kanálcích. Popisuje, zdali nastane v trubici proudění laminární nebo turbulentní [5]. Reynoldsovo číslo je významné pro

praxi při studiu odporové síly, která vzniká při proudění reálné tekutiny kolem tělesa. Využívá se z důvodu, že studované těleso je tak velké, že není možno studovat odporové síly přímo na tomto tělese [6]. Reynoldsovo číslo je bezrozměrnou veličinou s kritickými hodnotami, které určují druh proudění [7]. Reynoldsovo číslo je definované pomocí rovnice:

$$Re = \frac{v_s \cdot d}{\nu}$$

*Rovnice 1: Definice Reynoldsova čísla*

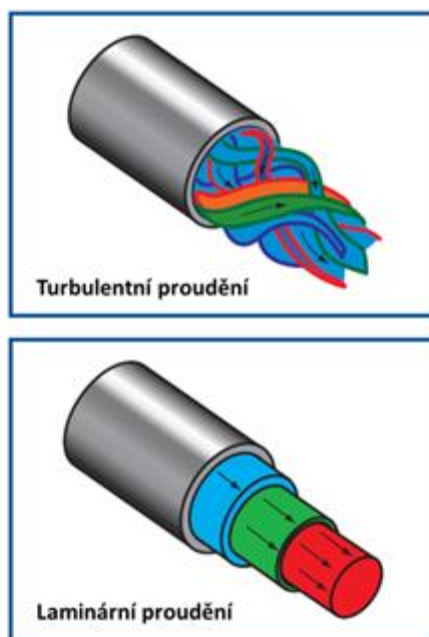
V rovnici je symbolem  $Re$  označeno Reynoldsovo číslo,  $v_s$  je střední rychlost proudění v trubici v daném průřezu a  $d$  označuje hydraulický průměr trubice. Je zřejmé, že existuje kritická hodnota Reynoldsova čísla  $Re_k$ , která rozděluje typ proudění na laminární nebo turbulentní. Z experimentů vyplývá, že hodnota  $Re_k \cong 1000$ . Na základě této hodnoty ji lze určit pro danou tekutinu velikost kritické střední rychlosti  $v_k$ , při níž přechází turbulentní proudění na laminární a naopak [7]. Díky malému  $Re$  v mikrofluidice, je proudění laminární a neobjevují se turbulence. Proudění kapaliny mikrokanálky je dále správně popisováno Navier-Stokesovou rovnicí [5]. Navier-Stokesova rovnice je v třidimenzionálním prostoru zatím hladce neřešitelná, ale z jejího zadání lze odvodit popis nestlačitelné Newtonovské tekutiny.

### **2.2.1 Laminární proudění**

Laminární proudění je způsob pohybu viskózních kapalin, při kterém jsou dráhy jednotlivých složek kapaliny navzájem rovnoběžné. Částice se pohybují ve vzájemně rovnoběžných vrstvách, aniž by se navzájem mísily. Při pohybu viskózní kapaliny v tenké trubici se jednotlivé vrstvy tekutiny nepohybují stejnou rychlostí. Nejrychleji se pohybuje osová vrstva tekutiny, směrem ke stěně kanálku se pohyb jednotlivých vrstev zpomaluje.

### **2.2.2 Turbulentní proudění**

Turbulentní proudění je způsob pohybu viskózních kapalin, při kterém jednotlivé vrstvy kapaliny přecházejí různými vrstvami kapaliny, čímž dochází k promíchání těchto vrstev. Částice kapaliny při proudění kromě posouvání vykonávají i složitý vlastní pohyb, který vede ke vzniku vírů a je doprovázen zvukovými fenomény (rozdíl od laminárního proudění). Rychlost jednotlivých částic kapaliny se nepravidelně mění (částice nemají ve všech místech neměnnou rychlost a proudění není stacionární). Pravděpodobnost vzniku turbulentního proudění tekutiny v tenké trubici je dáno rychlostí proudění, průměrem trubice, viskozitou a hustotou kapaliny. Tato pravděpodobnost se vyjadřuje pomocí Reynoldsova čísla [8].



Obrázek 1: typy proudění [28]

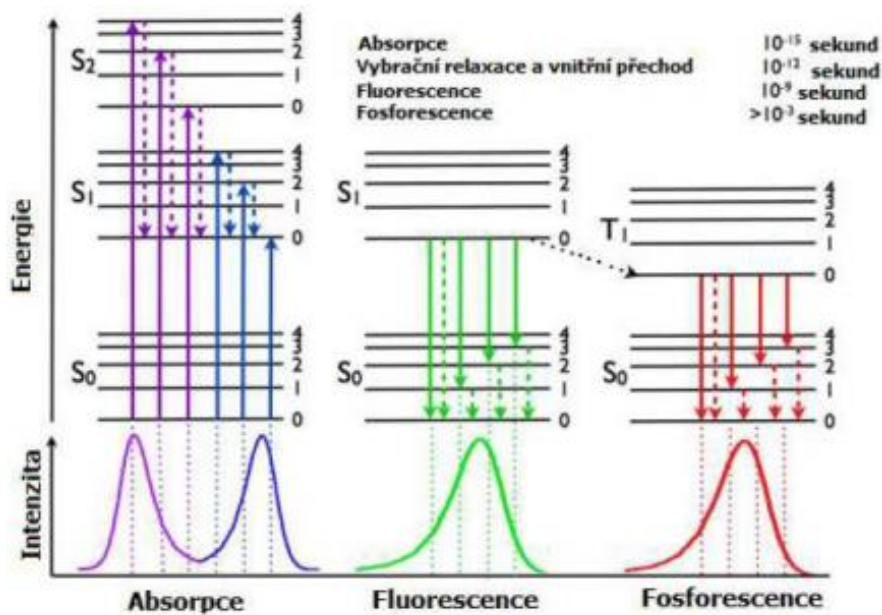
## 2.3 Luminiscence

Luminiscence jako slovo pochází z latinského slova lumen – světlo. Jedná se o kvantový jev, kdy dochází k samovolnému vyzařování fotonů pevnými nebo kapalnými látkami. K tomu je potřeba, aby proběhla excitace dané látky. Samotná luminiscence je vždy na nižší frekvenci (vyšší vlnové délce) než kterou má zdroj excitace. Tím pádem červené světlo nemůže spustit luminiscenci ani v případě, že zdrojem červeného světla je zdroj s velkou intenzitou například laser [23–26].

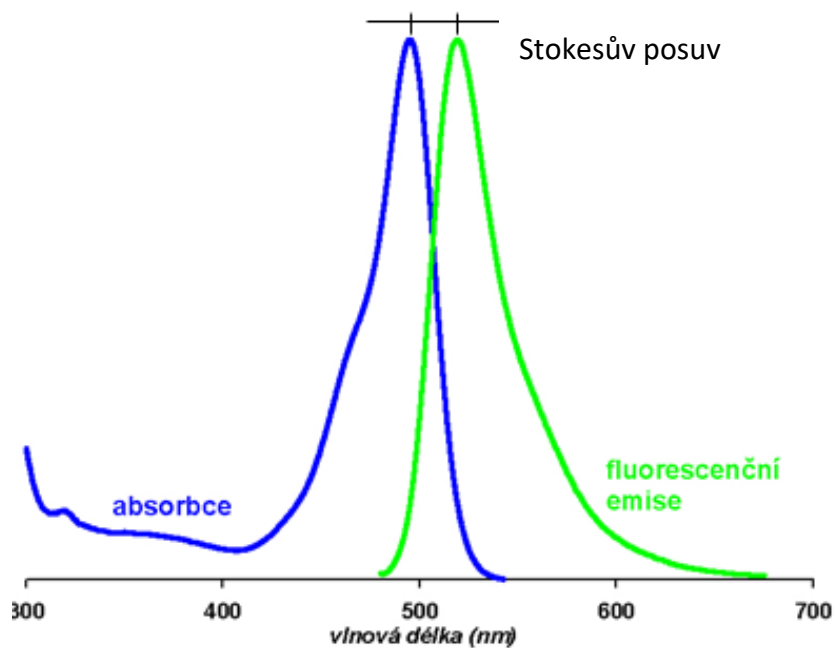
### 2.3.1 Fluorescence a fosforescence

Fluorescence je typ luminiscence, který se vyskytuje v chemických systémech. Fluorescence molekuly je způsobena absorpcí fotonů v základním singletovém stavu povýšenou na singletový excitovaný stav. Spin elektronu je stále spárován s elektronem v základním stavu na rozdíl od fosforescence. Když se excitovaná molekula vrací do základního stavu, emituje u tohoto jevu světlo, které má větší vlnovou délku než světlo absorbované při excitaci molekuly. Ztráta energie je způsobena vibrační relaxací v excitovaném stavu. Tento posuv k větším vlnovým délkám je nazýván stokesův posuv a je vyobrazen na obrázku č. 3. Excitované stavy jsou pouze s krátkou životností kolem  $10^{-8}$  sekund. Obecně jsou molekuly, které fluoreskují konjugované systémy. K fluorescence dochází, když se atom nebo molekula prostřednictvím vibrační relaxace vrátí do svého původního stavu po vybuzení. Specifické frekvence excitace a emise jsou závislé na molekule nebo atomu **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů..**

Při fosforescenci dochází k zakázanému přechodu elektronů a tím pádem doba vyzáření fotonu roste s časem, a tak doba vyzařování může být i několik minut. [23–26]. Fluorescence i fosforescence jako další fotolumiscenční jevy jsou zaznamenány v Jablonského diagramu na Obrázku 2



Obrázek 2: Jablonského diagram zobrazující excitaci elektronů a emisi si světla v případě fosforescence a fluorescence [29]



Obrázek 3: Stokesův posuv vlnovou délkou absorpce a excitace [30]

Ve fluorescenční mikroskopii je využívána řada fluorescenčních barviv a fluorescenčních značek, mezi jedno z nich patří ATTO – barvivo. Toto barvivo má všechny klíčové vlastnosti požadované po moderním fluorescenčním barvivu. Mezi přednosti tohoto barviva patří vysoká absorpce, vysoká emise fluorescence a vysoká fotostabilita [20].

## **2.4 Mikroskopie**

### **2.4.1 Optická mikroskopie**

Optická neboli světelná mikroskopie je rozsáhlý obor, který zahrnuje jak teorii a konstrukci samotných přístrojů, tak aplikace mikroskopických metod, sahající od biologie a medicíny až do chemie. Obyčejný optický mikroskop se skládá z objektivu, který vytváří převrácený obraz objektu a okuláru, kterým tento obraz pozorujeme jako lupou. Další důležitou částí mikroskopu je zdroj světla s kondenzorem [16].

### **2.4.2 Fluorescenční mikroskopie**

Fluorescenční mikroskopie je speciální forma optické mikroskopie. V této metodě je využíváno flouoroforů, které emitují světlo o určité vlnové délce po jejich ozáření. Fluorescenční mikroskop je velmi podobný optickému (světelnému) mikroskopu. Rozdíl mezi oběma mikroskopy je ve zdroji záření, kdy pro fluorescenční mikroskop je využívána silná xenonová lampa nebo laser jako monochromatické světlo. Fluorescenční mikroskop dále obsahuje excitační a emisní filtr. Excitační filtr je schopen propustit pouze světlo, které je schopno vybudit vzorek svou konkrétní vlnovou délkou. Světlo vyzařované vzorkem musí projít emisním filtrem, předtím, než se dostane do detektoru. Emisní filtr je průsvitný pouze pro určitý úsek elektromagnetického spektra neboli pouze pro to, které může být vyzařováno vzorkem [17].

### **2.4.3 Mikroskopie atomárních sil**

Mikroskopie atomárních sil sleduje odpudivé elektrostatické síly a přitažlivé Van der Waalsovy síly. AFM mikroskop (mikroskop atomárních sil) má 3 módy využitelnosti, první kontaktní režim se používá pro tuhé vzorky. Druhý nekontaktní režim je využíván pro měkké a pružné vzorky. Třetí režim je pokleповý. Mikroskop atomárních sil je využíván pro zobrazení povrchu daného vzorku [18].

## **2.5 Plazma**

Plazma je často označováno jako čtvrté skupenství hmoty. Přirozeným způsobem doplňuje řadu pevná látka – kapalina – plyn. Dodáme-li další tepelnou energii plynu, dojde k jeho částečné a následně k úplné ionizaci. Látka se stane plazmatem, jsou v ní volné nosiče náboje, čímž má toto skupenství zcela nové vlastnosti a jako jediné kolektivně reaguje na elektrická a magnetická pole a samo je vytváří. Vlastnosti plazmatu jsou velmi odlišné od vlastností plynů a kapalin.

Název plazma pro ionizovaný plyn poprvé použil Irving Langmuir v roce 1928, protože mu chováním připomínal krevní plazmu. Langmuir plazma chápal jako oblast výboje plynu, který není ovlivněn stěnami nebo elektrodami a má následující vlastnosti:

- v plazmatu jsou volné nosiče náboje
- plazma vykazuje kolektivní chování (jako celek reaguje na elektrická a magnetická pole a také je vytváří)
- plazma je kvazineutrální, tj. v makroskopickém objemu je stejné množství kladných i záporných nábojů

Plazma je charakteristické lineárními a plošnými útvary (vlákny a stěnami) drženými vlastním magnetickým polem, které vzniká protékajícím proudem. Nabité částice mohou jednak rotovat kolem magnetických indukčních čar a jednak driftovat napříč magnetickému a jinému poli. V oblastech intenzivnějšího magnetického pole se mohou odrážet, takový jev nazýváme magnetické zrcadlo. V plazmatu existuje obrovské množství módů různých nízkofrekvenčních i vysokofrekvenčních vln. Pro plazma je charakteristická řada nestabilit, se kterými se dlouhá léta potýkají konstruktéři termojaderných reaktorů [22].

Plazma je stav hmoty, ve kterém je velké množství atomů ionizovaných. Nízkoteplotní plazma je skupenství, ve kterém je kinetická teplota atomů 100 °C, zatímco kinetická teplota elektronů je vysoká okolo 1000 °C. I když je teplota atomů a molekul relativně nízká tak nezanedbatelné procento z nich je ionizováno a ve zbytku je velké procento atomů v excitovaném stavu [21].

## **2.6 Mikrofluidní zařízení**

Mikrofluidní zařízení lze vyrábět z řady materiálů pomocí různých metod. Výroba obvykle následuje po procesu vytváření kanálků na povrchu pevného substrátu, před vyražením nebo vyvrtáním přístupových otvorů, a nakonec jeho připojení ke krycí desce.

Dřívější zařízení byla vyráběna z křemíku a skla pomocí fotolitografie a mokrého leptání do skla. I když sklo nadále zůstává oblíbeným materiálem, polymerové čipy se stávají nejoblíbenějším materiálem pro masovou výrobu mikrofluidních čipů. Nicméně nejběžnějším materiálem používaným ve výzkumných laboratořích je flexibilní elastomer poly(dimethylsiloxan) PDMS, který je vhodný pro rychlé prototypy. U těchto čipů je někdy nutné, aby byly povrchy mikrokanálků v mikrofluidním čipu upraveny tak, aby vykazovaly určité vlastnosti, čehož lze dosáhnout několika technikami, například depozice organosilanů [33].

Kapilární elektroforéza byla první z úspěšných procesů provedených na lab – on – chip (laboratoři na čipu) díky své snadné převeditelnosti od mikro rozměrů a dosažitelnému zvýšení výkonu díky tomuto převodu. Od této doby se stala základem pro mnoho mikrofluidních technologií [34].

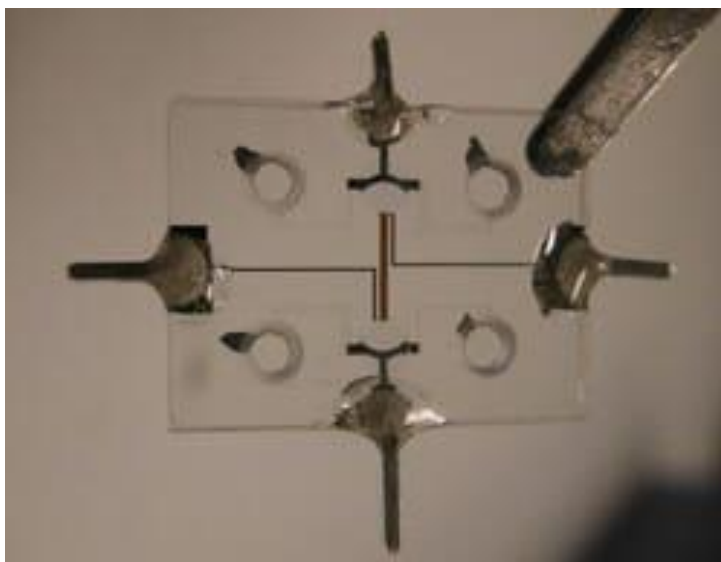
### 3 Současný stav řešené problematiky

#### 3.1 Materiály používané na výrobu čipů

Materiály, které se používají na výrobu čipů, jsou v dnešní době polymery na bázi uhlíku a křemíku, případně sklo. Všechny tyto materiály vykazují různé vlastnosti, proto je vhodné zvážit použití čipu a podle něj vybrat vhodný materiál.

#### 3.2 Sklo a křemík

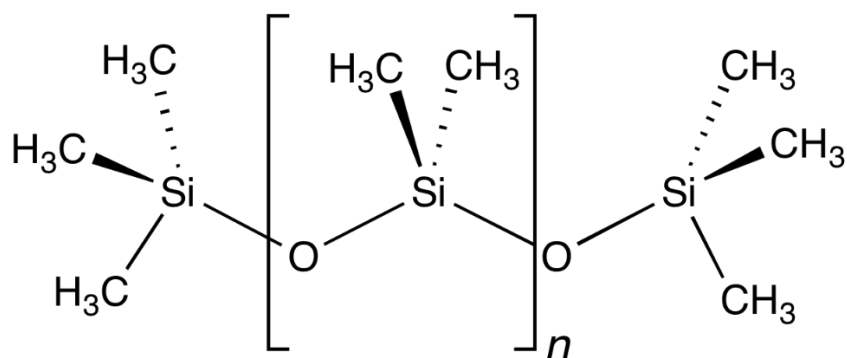
Sklo i křemík jsou křehké materiály, mají netriviální spojovací protokoly pro uzavírání mikrokanálek a obecně vyžadují drahé a nepřístupné metody výroby. Tyto materiály se hodily pro některé aplikace (elektroforéza), ale nakonec je jejich vývoj pomalý díky dominanci polymerních čipů. Například křemík je neprůhledný pro viditelné a ultrafialové světlo, což činí tento materiál nekompatibilní s dnešními mikroskopickými metodami [27].



Obrázek 4: Mikrofluidní čip vyrobený ze skla držený pinzetou [27]

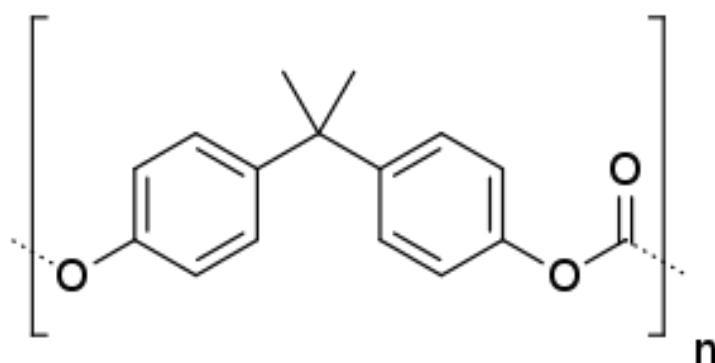
#### 3.3 Polymery

Materiály, ze kterých už byl vytvořen funkční mikrofluidní čip jsou popsány v následujících odstavcích a je k nim uveden druh použití. Pro vytvoření srdce, střev, cévního systému, jater a plic a některých dalších orgánů byl použit jako vhodný materiál pro čip polydimetylsiloxane (PDMS) [9].



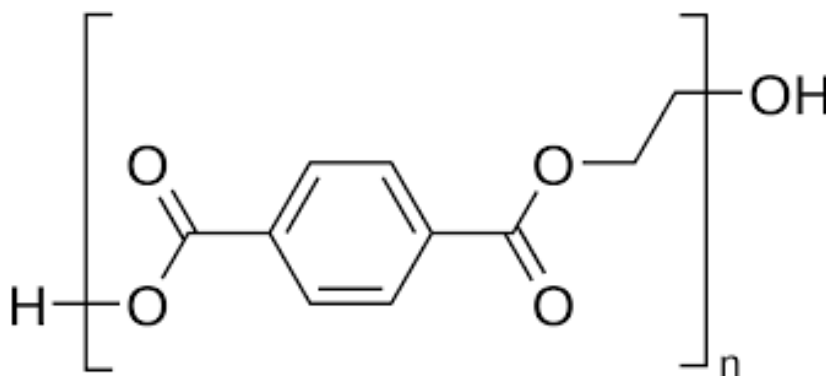
Obrázek 5: Strukturální jednotka PDMS

Pro vytvoření mozkové blány, střev, kůže, střev s rakovinou a dalších orgánů obsahující nádorové buňky byl v minulosti již použit polykarbonát (PC) [9].



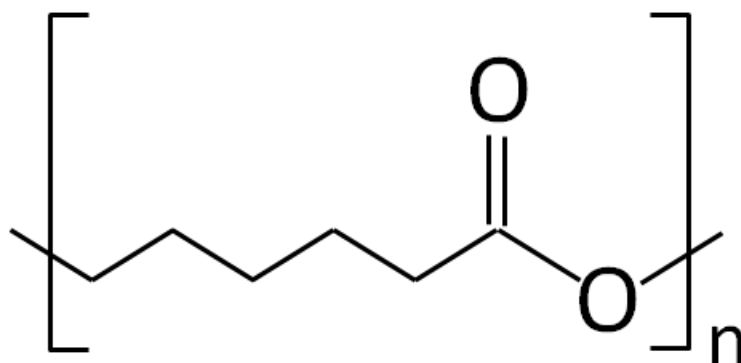
Obrázek 6: Strukturální jednotka polykarbonátu

Polyethyltereftalát (PET) byl použit k napodobení srdce, střev, ledvin a jater [9].



Obrázek 7: Strukturální jednotka polyethyltereftalátu

Polymery použité na přípravu orgánů na čipu musí být pórovité a musí obsahovat mikrokanálky kterými může proudit kapalina. Těchto materiálů je v dnešní době jen velmi málo a jsou jimi už zmíněný PDMS polykarbonát, polyethyltereftalát a poly(1-kaprolacton) a některé další [9].



Obrázek 8: Strukturní jendotka poly( $\epsilon$ -kaprolacton)

### 3.4 Polydimetylsiloxane

Polydimetylsiloxan druhým názvem dimetikon je minerální organický polymer siloxanové skupiny. Jedná se o nejvíce používaný polymer na bázi křemíku díky jeho vlastnostem. Jako jsou transparentnost, jeho nízká autofluorescence, tím že je biokompaktní, jeho levná výroba, může být snadno odlit a je propustný pro plyny [10].

PDMS je opticky čistá, vcelku inertní a netoxická a nezápalná látka. Jedná se o hydrofobní látku. Pro aplikace, ve kterých je potřeba dlouhodobá hydrofilita je PDMS roubováno hydrofilním polymerem nebo na jeho povrchovou strukturu mohou být nanášeny hydrofilní nanostruktury [15]. PDMS je jedním z nejpoužívanějších materiálů pro vytváření mikrofluidních materiálů [32]

#### 3.4.1 Použití PDMS

PDMS bylo vybráno na výrobu mikrofluidních čipů díky těmto vlastnostem:

- je transparentní pro optickou frekvenci od 240nm do 1100 nm
- má malou hodnotu autofluorescence
- materiál PDMS je považován za biokompatibilní
- PDMS se dokáže těsně spojit s povrchem skla nebo s povrchem jiného PDMS
- během zesíťování může být potažen vrstvou s kontrolovanou tloušťkou
- je deformovatelný
- nejsou velké náklady na výrobu
- je propustný pro plyny
- snadno se tvaruje

Deformovatelnost PDMS umožňuje integraci mikrofluidních ventilů pomocí deformace mikrokanálek PDMS čímž napomáhá jeho použití pro mikrofluidní čip. Díky této deformovatelnosti je také možné pozorovat velmi malé síly, které působí na čip, jako jsou biomechanické interakce buněk. Propustnost PDMS pro plyny umožňuje kultivaci buněk na čipu, respektive v mikrofluidním kanálku. Díky řízenému přívodu plynu slepými kanálky je tato kultivace možná navíc zbytkové vzduchové bubliny mohou unikat skrz strukturu PDMS aby se vyrovnal atmosférický tlak. PDMS se také snadno tvaruje, protože po smíchání se síťovacím činidlem zůstává kapalné i při pokojové teplotě i po mnoho hodin. PDMS také

dokáže formovat struktury s velkým rozlišením. S určitou optimalizací je možné formovat přesné struktury až do řádů nanometrů. PDMS také může být upravené plazmou a díky této úpravě je k němu možné těsně připojit další vrstvu PDMS případně další vrstvu skla.

Nevýhody použití PDMS pro mikrofluidní zařízení jsou:

- skoro úplná nemožnost provedení depozice kovu a dielektrika
- PDMS po čase stárne a mohou se změnit vlastnosti materiálu
- Adsorbuje hydrofobní molekuly a může uvolnit některé makromolekuly ze špatného zesíťení do kapaliny
- PDMS je propustné pro vodní páru
- PDMS je citlivé na vystavení některým chemikáliím

Například po vystavení PDMS acetonu (o koncentraci 99,7 %), se hmotnost struktury PDMS zvýšila o 45,51 % na rozdíl od vystavení deionizované vodě, kdy se hmotnost PDMS snížila jen o 0,97 %. Nejlépe však PDMS reagovalo na vystavení hexanu, kdy svoji hmotnost snížilo jen o 0,33 %. Další příkladem může být vystavení PDMS koncentrované kyselině sírové, kdy se sice hmotnost pouze sníží o 1,38 %, ale nastává úplná změna v mikrostruktuře. V poslední řadě, expozice PDMS kyselině dusičné způsobuje změny v mikrostruktuře PDMS na 50 % [32].

### 3.5 Měkká litografie

Měkká litografie poskytuje přístup k trojrozměrným zakřiveným strukturám, toleruje širokou škálu materiálů a vytváří definované a kontrolovatelné chemické látky na povrchu. Je kompatibilní s biologickými akcemi. Je nenákladná a vhodná pro většinu aplikací, např. buněčnou technologii, mikrofluidiku a laboratoř na čipu. Jako příklady měkkých litografických technik lze uvést mikrokontaktní tisk proteinů na zlatě potažené skleněné substráty, repliky pro výrobu mikrofluidních zařízení v PDMS a nanostruktur v epoxidu [11].

Měkká litografie obsahuje 4 techniky přípravy [12]:

- odlévání replik (PDMS je nalito na vzorovací formu a vytvrzeno)
- mikrokontaktní tisk (pomocí razítka z PDMS jsou molekuly natisknuty na substrát) [13]
- odlévání v kapilárách (kapka je nanesena ke koncům mikrokanálků)
- mikrotransportní tisk (aplikace prepolymeru z PDMS) [14]

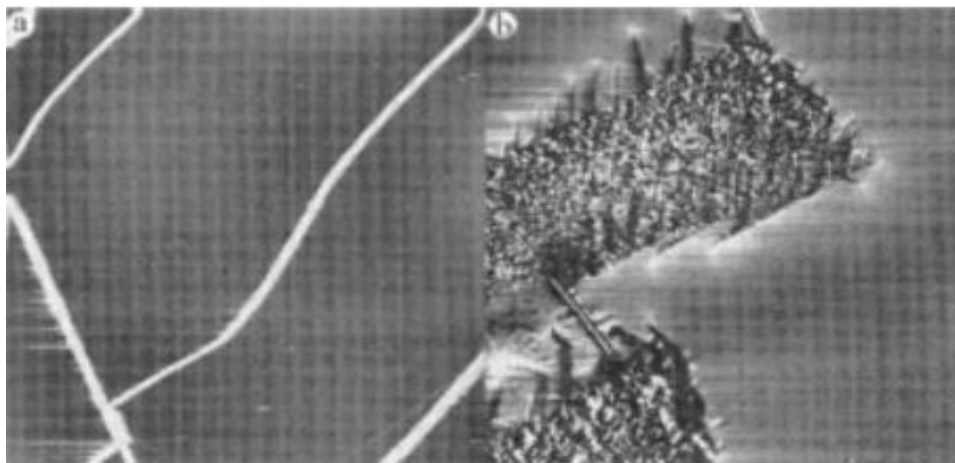
#### 3.5.1 Měkká litografie pro PDMS

V biomedicínských nebo biologických aplikacích se měkká litografie využívá pro výrobu mikrofluidních zařízení. K návrhu kanálku se používají křemíkové destičky a na tyto destičky se potom vylíje zesíťované PDMS a nechá se ztvrdnout. Po vyjmutí PDMS z křemíkové masky zůstanou ve struktuře PDMS vytištěny i ty nejmenší detaily. PDMS lze také přímo vzorovat litografií s povrchovým nábojem.

### 3.6 Úprava PDMS pomocí plazmatu

Některé vlastnosti povrchu PDMS mohou být změněny pomocí ošetření plazmou, ozonem, ultrafialovým zářením nebo chemickými prostředky. Při ošetření povrchu PDMS plazmou nastávají změny drsnosti materiálu. Už při šestnáctisekundovému vystavení PDMS plazmatu se jeho drsnost sníží. Po vystavení povrchu PDMS plazmatu na 30 sekund se drsnost materiálu

sníží přibližně na polovinu. Změny drsnosti PDMS byly pozorovány pomocí mikroskopu atomárních sil [41]. Dlouhé vystavení povrchu PDMS plazmatu však může vést i k jeho prasknutí. Ošetření povrchu PDMS pomocí plazmy však vede i k jiným změnám ve vlastnostech PDMS jako je snížení hydrofobicity povrchu, která byla pozorována při změně kontaktního úhlu PDMS s vodou [42].



*Obrázek 9: PDMS ošetřeného plazmou po dobu pěti minut a zahřátí na 150°C. Velikost výřezu struktury (a) je 90 $\mu$ m a u struktury (b) je 25 $\mu$ m [31]*

## **4 Experimentální část**

### **4.1 Použité chemikálie**

Polydimethylsiloxan, Sylgard 295 Silicone Elastomer Kit, ELCHEMCo, šarže 0008885206,

Isopropylalkohol, C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O, CAS: 67-64-1 lach:ner, čistota p.a.

Fluorescenční sonda ATTO 488, Sigma, šarže BCBV8900, čistota pro fluorescenci,

Deionizovaná voda

### **4.2 Přístroje a pomůcky**

Předvážky – Scaltec SPB 52

Ultrazvuková čistička – Bandelin Sonorex Digitec DT 31 H

Přístroj na oplazmování – CEPLANT RPS50+

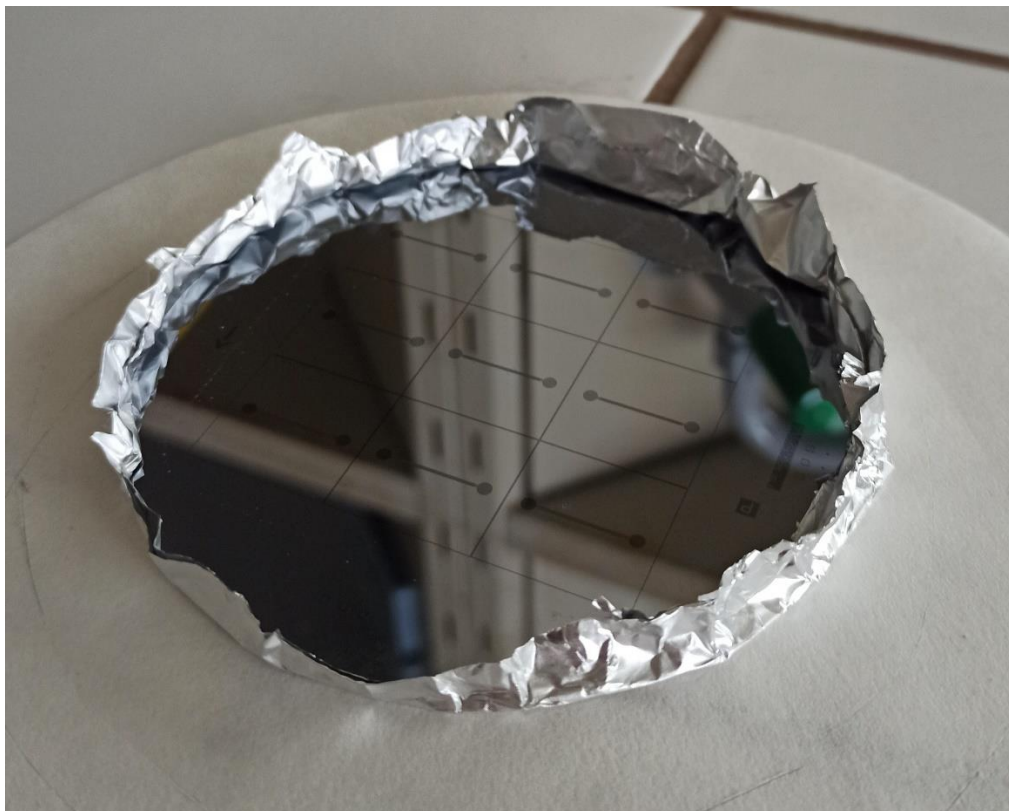
Invertní mikroskop – Olympus IX71

Lampa – X-cite 120Q

Kamera – Olympus XM10

### 4.3 Metody přípravy výroby mikrofluidního čipu

V podmínkách naší laboratoře jsou mikrofluidní čipy vyráběny z polydimethylsiloxanu (PDMS) a postup výroby je popsán v následující kapitole. Pro výrobu byly používány dvě křemíkové masky, jedna tři roky stará, na které už bylo odlévání prováděno nejméně šestkrát a jedna nová, dodaná z Akademie Věd České republiky. Nová křemíková maska byla dodána v průběhu probíhajících experimentů. Čipy jsou skládány z dvou částí, jedna je PDMS část, druhou je krycí sklíčko. Čipy jsou odlévány na křemíkové masce, která obsahuje formy pro devět kusů čipů. Všechny devět odlitků PDMS se v této masce připravuje současně. Nejdříve byla křemíková maska očištěna deionizovanou vodou pro odstranění prachu a případných ostatních nečistot. Dále musí být maska vysušena pomocí stlačeného vzduchu. Maska nesmí být sušena buničitou vatou ani žádným jiným papírovým prostředkem. Pokud bychom takto naši umytou křemíkovou masku oťřeli, mohli by na jejím povrchu zůstat vlákna, která by zabránila správnému odlití PDMS a vytvarování mikrokanálek. Po správném ošetření masky na odlévání, můžeme pokračovat, a to vytvarováním alobalu do rozměrů křemíkové masky s přesahem asi dvou centimetrů, které jsou ohnuty nad úroveň masky, jak je zobrazeno na obrázku 10. Vyložení alobalem se používá, aby PDMS nezateklo pod křemíkovou masku a zůstalo pouze na horní ploše masky. Takto připravenou masku s alobalem vložíme do Petriho misky.



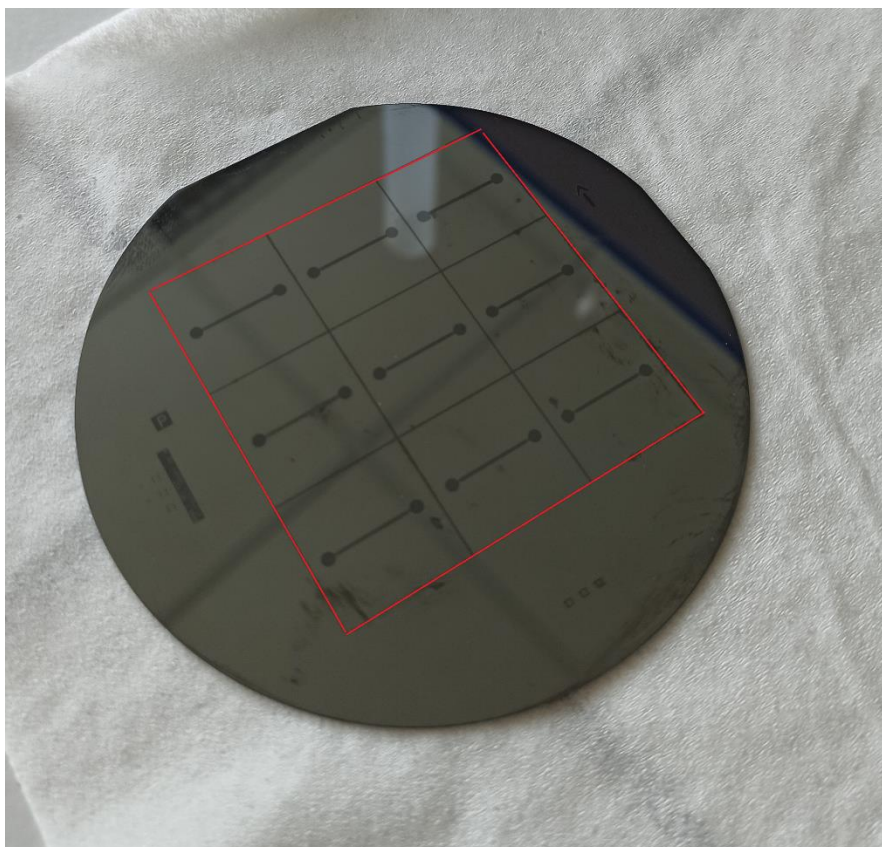
Obrázek 10: Křemíková maska vyložená alobalem

Pokud byla připravena maska s alobalem, následovalo namíchání PDMS se síťovacím činidlem. Pro odvážení PDMS a síťovacího činidla byly použity předvážky – Scaltec SPB 52. PDMS se síťovacím činidlem byly smíchány v poměru 10:1. Pro vytvoření všech devíti čipů o

výšce alespoň 2 milimetry bylo použito 20 gramů PDMS a 2 gramy síťovacího činidla. Po odvážení byly obě složky smíchány v 50ml kádince pomocí skleněné tyčinky. Tato směs byla míchána po dobu dvou minut. Vzniklá směs obsahuje spoustu nežádoucích bublin, které vznikají během míchání. Tento velký počet bublin je nutné v následujících krocích odstranit. Na odstranění největšího počtu bublin byla použita ultrazvuková čistička – Bandelin Sonorex Digitec DT 31 H. Kádinka s připravenou směsí byla vložena do ultrazvukové čističky, kde byla sonifikována po dobu nejméně sedmi minut, ovšem tento časový údaj závisí na rychlosti odstraňování bublin a může být prodloužen. Po odstranění většiny bublin je ukončena sonifikace.

Poté byla směs vylita na připravenou křemíkovou masku v Petriho misce. Následně byla maska vložena do exikátoru, v němž je pomocí vývěvy vytvořen podtlak. Tento proces byl zopakován třikrát, aby byly odstraněny veškeré bubliny. Pokud i po třech opakováních v exikátoru stále zůstaly bubliny v PDMS, byly odstraněny pomocí jehly. Takto jsme docílili PDMS, které neobsahuje žádné bubliny a může být vloženo do sušárny. Spodní část Petriho misky s křemíkovou maskou a PDMS byla přikryta vrchním dílem. Takto naplněná Petriho miska byla vložena do sušárny na 80 °C po dobu jedné hodiny. Po uplynutí jedné hodiny byla směs z PDMS a síťovacího činidla považována za vytvrzenou.

Po vytvrzení byla křemíková maska se směsí ochlazená přibližně na laboratorní teplotu. V dalším kroku bylo vyřezáváno PDMS z masky. Tento proces je značně komplikovaný. Vyřezávání bylo prováděno skalpelem. Nejdříve bylo PDMS vyřezáno po obvodu čtverce, který obsahoval všechny vytvrzené PDMS části čipu, jak je uvedeno na obrázku 11. Při použití skalpelu se musí dbát zvýšené opatrnosti, aby nedošlo k velkému přitlačení a následnému proříznutí PDMS. Potom by tento skalpel nechal v křemíkové masce rýhu, ze které by mohly odpadat malé částičky masky, které by již nešlo odstranit omytím masky deionizovanou vodou ani následným ofoukáním. Pokud by nastala situace, že by se na masce nacházely tyto částičky, nemusela by tato maska na čipy již produkovat spolehlivé čipy a musela by být vyměněna za novou.



*Obrázek 11: Čtverec, na kterém bylo vyřezáváno PDMS z masky*

Po vyříznutí celého čtverce drželo všech devět čipů stále pohromadě. Těchto devět čipů bylo umístěno do čisté Petriho misky, která byla podložena černým papírem, aby mohly být jednotlivé čipy vyříznuty. Pro tento krok byl znovu použit skalpel. V takto připraveném čipu byly vyraženy dva otvory o průměru 0,25 milimetru. Vytvořené otvory sloužily pro plnění čipu fluorescenční sondou ATTO 488. Všech devět čipů bylo ponecháno v Petriho misce. PDMS části čipu byly následně očištěny sonifikací v isopropylalkoholu po dobu pěti minut.

Takto připravená a očištěná část PDMS byla ošetřena plazmou přístrojem CEPLANT RPS50+. PDMS část čipu byla umístěna na držák přístroje, který je i pojízdným vozíkem pro přístroj. Byla nastavena vzdálenost plazmovací hlavičky od PDMS části čipu tak, že na PDMS část čipu bylo položeno čisté krycí sklíčko a vzdálenost plazmovací hlavičky byla nastavena na 1,5 milimetru od tohoto systému PDMS a sklíčka. Následně bylo sklíčko odejmuto a byla nastavena hodnota napětí na 7,1 V. Tato hodnota stanoví dobu průjezdu vozíku pod plazmovací hlavicí přístroje při průjezdu tam i zpět. Pro hodnotu 7,1 V je doba průjezdu 10 sekund v oblasti pod plazmovací hlavicí. Ovšem celková doba průjezdu vozíku po celé dráze je přibližně 25 sekund při průjezdu tam i zpět. Po ukončení procesu byla PDMS část čipu odejmuta pinzetou z pojízdného vozíku a umístěna zpátky do Petriho misky. V následujícím kroku bylo stejným způsobem oplazmováno i krycí sklíčko. To bylo z pojízdného vozíku sejmuto pinzetou a umístěno oplazmovanou stranou na oplazmovanou PDMS část čipu. Takto vytvořený čip byl vyžihán ve vyhřáté sušárně při 100 °C po dobu 30 minut. Do sušárny byla umístěna celá Petriho miska. Po procesu vyžihání byly připravené čipy umístěny do skleněné nádoby s deionizovanou vodou.

#### 4.4 Metody zkoumání PDMS čipu

Zkoumání těsnosti čipu bylo prováděno pomocí pozorování vnitřní struktury čipu na rozhraní spoje PDMS – krycí sklíčko, v oblasti, kde se nacházely kanálky. Zkoumání bylo prováděno pomocí invertního mikroskopu Olympus IX71, a to pomocí transmisní metody a fluorescenčního záření. Pro zkoumání fluorescenční metodou musel být na mikroskopu nastaven filtr číslo 1 pro 365 nanometrů.

Nejprve byl čip vyjmut pinzetou ze skleněné nádoby a osušen. Následně musel být inzulinovou injekční stříkačkou natažen roztok fluorescenční sondy ATTO 488 a vpraven vyraženým 0,25 mm otvorem do čipu. Takto připravený čip byl umístěn do držáku pro invertní mikroskop. Na objektiv před umístěním držáku byla nanášena kapka deionizované vody, pak byl držák umístěn na kovový stolek mikroskopu tak, aby byl v kontaktu s kapkou deionizované vody. Byla nastavena vhodná vzdálenost pro zobrazení vnitřní struktury čipu a pomocí posouvání stolku mikroskopu nalezeno rozhraní čipu s kanálky. Následně byly pomocí černobílé kamery Olympus XM10 připojené k mikroskopu pořízeny černobílé transmisní snímky vnitřní struktury čipu. Transmisní zobrazování nám poskytlo informace o vlastnostech kanálků, a jejich případných nedostatcích jako byly trhliny nebo úlomky v polymeru PDMS.

Pro zkoumání čipu pomocí fluorescenční metody byl čip v držáku zakryt stínítkem nepropustným pro světlo a čip byl ozářen pomocí xenonové lampy X-cite 120Q. Poté byl ve stejné poloze jako u transmisní metody pořízen snímek vnitřní struktury čipu s roztokem fluorescenční sondy. Díky snímkům bylo možno určit, zda čip těsní či nikoli. Kamera tohoto mikroskopu je černobílá software však umožňuje zobrazení i v pseudobarvě.

Čip byl podroben zkoumán na mikroskopu atomárních sil (AFM). Měření na tomto přístroji probíhalo cantilvery s poměrně nízkou spring konstantou. Nízká spring konstanta znamená, že nosník mikroskopu je hodně pružný, pokud je vysoká nosník mikroskopu je tužší.

## 5 VÝSLEDKY A DISKUSE

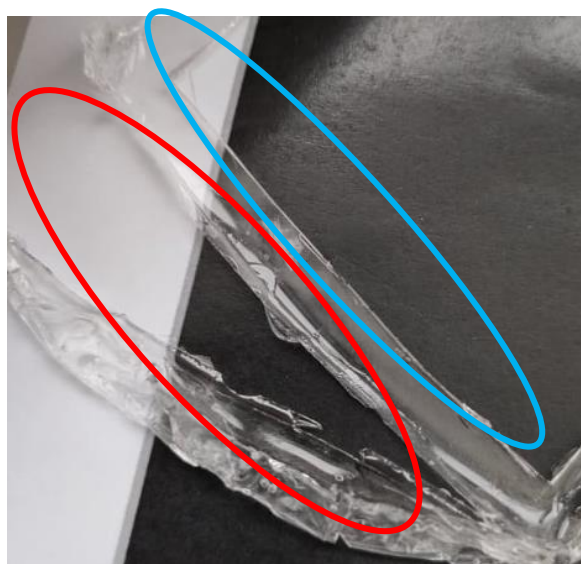
### 5.1 Odlévání PDMS

Při odlévání PDMS částí čipů se vyskytl jeden problém, a tím bylo podtékání PDMS pod alobalem ohraničenou křemíkovou masku. Polymer, který takto podtekl a byl vytvrzen, byl již těžce z masky sloupáván. Podtečení způsobovalo nerovnosti na křemíkové masce ze spodní strany masky. Nerovnosti ze spodní strany masky se přenesly na stabilitu masky a docházelo k nerovnostem na vrchní straně masky. Tyto nerovnosti mohly způsobit, že čip nebude mít ve všech místech rovnoměrnou výšku. Nerovnoměrná výška čipu potom způsobovala malou pevnost čipu na spoji PDMS části s krycím sklíčkem. K tomu, aby bylo jakémukoliv podtečení zabráněno musí být maska obalena minimálně třemi vrstvami vysoko gramážního alobalu. Použití nízko gramážního alobalu nedoporučuji, jelikož dochází k jeho trhání a tím i špatnému utěsnění před podtečením.

Při vytvrzování PDMS musí být PDMS na křemíkové masce vkládáno do sušárny již předeřáté na 80 °C. Když bylo PDMS na křemíkové masce vloženo do sušárny, která nebyla předeřátá došlo k tomu, že po vyřezání zůstaly na křemíkové masce nečistoty od nevytvrzeného PDMS. U těchto nečistot nebyl nalezen způsob, kterým by mohly být spolehlivě a bezpečně odstraněny. Řešením tohoto problému je vkládání PDMS na vytvrzení do již předeřáté sušárny po dobu jedné hodiny.

### 5.2 Vyřezávání PDMS

Vyřezávání PDMS částí čipu z křemíkové masky by bylo velkým problémem, kdyby byla při každém odlévání devíti PDMS částí čipů poškozena skalpelem jedna křemíková maska. Pro pokusy s vyřezáváním byla použita stará již poškozená maska, na které nebylo možné správně připravit čipy. Bylo vyzkoušeno vložení pevného drátku na křemíkovou masku, který měl sloužit k tomu, aby struktura všech devíti čipů mohla být z křemíkové masky sejmuta bez použití skalpelu. Tato metoda se neosvědčila díky tomu, že v prvním případě nebylo možné vytáhnout drátek z PDMS a provést tak řez polymerem bez použití skalpelu. A v druhém případě této zkoušky byl drátek propíchnut přes ochrannou strukturu alobalu, aby bylo možné ho za jeden konec uchopit a vytáhnout, ale propíchnutí alobalu způsobilo protečení polymeru dírou vytvořenou v alobalu. Oba tyto pokusy s drátkem tedy nebyly úspěšné.



*Obrázek 12: Řez provedený vytáhnutím drátku (na obrázku vyznačen červeně), versus řez provedený skalpelem (na obrázku vyznačen modřen)*

Další možností, kdy mohlo dojít ke zlepšení způsobu vyříznutí i odlévání polymeru z křemíkové masky, bylo zalití celé křemíkové masky do polymeru. Takto by celá maska zůstala obalena polymerem a po vyříznutí požadované části by zbytek vytvrzeného polymeru sloužil jako hranice pro další odlévání. Pokud by se tento krok povedl, mohlo by se upustit i od obalování křemíkové masky alobalem, jelikož by ochrannou funkci před podtečením způsoboval sám polymer a následné vyřezávání polymeru by mohlo být prováděno až za hranicí vyznačeného čtverce, který ohraničuje strukturu čipů z obrázku 11.

Tento pokus byl znovu proveden se starou maskou, která již nesloužila pro odlévání čipů. Křemíková maska byla nejprve omyta deionizovanou vodou a ofoukána stlačeným vzduchem. Krok, při kterém byla maska vyložena alobalem byl úplně vynechán. Tento krok byl vynechán z důvodu, že alobal zkracoval vzdálenost, kde bylo možno skalpelem řezat. Vynechání alobalové výztuže před zatečením dovoľovalo řezat PDMS z křemíkové masky až za hranicí struktur všech čipů. V druhém kroku tohoto pokusu, tedy již po přípravě křemíkové masky, byla znovu připravena směs polymeru se síťovacím činidlem v poměru 10:1. Pro tento experiment bylo použito dvojnásobné množství směsi PDMS a síťovacího činidla. Dalším krokem bylo vylití poloviny připravené směsi do čisté Petriho misky. Naplněná Petriho miska byla umístěna na třepačku, aby bylo dosaženo co nejrovnoměrnějšího rozložení polymeru. Na takto připravenou směs byla opatrně položena křemíková maska. Při položení nedošlo k tomu, že se křemíková maska propadla dolů až na úroveň Petriho misky, nýbrž zůstala plovat na směsi PDMS. Následně byl zbytek připravené směsi vylit na křemíkovou masku do Petriho misky. Takto připravená Petriho miska s PDMS i křemíkovou maskou byla nechána v sušárně na vytvrzení. Po vytvrzení byl polymer oříznut skalpelem kolem Petriho misky. Předpokládalo se, že po oříznutí bude z Petriho misky vytažena celá struktura polymeru PDMS, ve kterém by byla zalitá křemíková maska. Toto nebylo provedeno úspěšně díky tomu, že pravděpodobně nebylo možné vyvinout dostatečnou páku pod křemíkovou maskou s polymerem. To způsobilo, že sice byla křemíková maska zalitá do polymeru PDMS, ale tuto zalitou masku nebylo možné

vytáhnou z Petriho misky, ve které byla umístěna. Nemožnost vytažení zalité křemíkové masky z Petriho misky samo o sobě nepředstavovalo velký problém, avšak pokud bychom znovu chtěli na masce odlévat PDMS část čipů, mohla by se nám zvyšovat vrstva polymeru okolo masky až po úroveň horní hrany Petriho misky. Zvýšení úrovně polymeru by způsobilo, že by nemohlo být dosaženo výšky PDMS části čipu okolo dvou milimetrů. Hypoteticky bylo navrženo řešení tohoto problému, a to takové, že by se nekládala křemíková maska do Petriho misky, ale pouze by se položila na ploché skleněné sklíčko. K tomuto sklíčku s křemíkovou maskou by byla připevněna plastová ohraničující struktura, která by po vytvrzení mohla být celá odříznuta. Tím bychom dosáhli, že při dalším odlévání PDMS částí čipu nám nebude zvýšený okraj Petriho misky vadit.

### **5.3 Lepení čipu**

Na slepování vyříznuté PDMS části čipu byl použit přístroj CEPLANT RPS50+. Způsob, kterým bylo na tomto zařízení plazmováno, za účelem lepení čipů, nebyl optimalizovaný a ucelený. Bylo vyzkoušeno navolení napětí na 7,1 V pro průjezd vozíku pod plazmovací hlavicí po dobu 10 sekund. Pro další optimalizaci tohoto postupu byla zvolena hodnota napětí na 10 V.

#### **5.3.1 Doba plazmování**

Vyšší napětí 10 V na přístroji CEPLANT RPS50+ způsobilo zkrácení doby, po kterou byl držák přístroje v oblasti pod plazmovací hlavicí a probíhalo plazmování částí čipu. Pro zachování doby plazmování alespoň 40 sekund byly tedy navýšeny počty průjezdů. Z předchozí práce na toto téma vyplynulo, že časy plazmování 10 a 20 sekund nejsou dostatečné na vytvoření pevné vazby mezi PDMS částí čipu a krycím sklíčkem. Při zjištění, že časy 10 a 20 sekund pro plazmování nejsou dostatečné, byla navržena hypotéza, že pokud bychom zvýšili dobu plazmování na 80 a 120 sekund, měli bychom dosáhnout lepších výsledků kvality těsnosti čipů. Při nastavení napětí 10 V na přístroji na plazmování byl čas plazmování 4,2 sekundy při průjezdu tam i zpět. Pro zachování časů 40, 80 a 120 sekund tedy bylo zvoleno množství průjezdů vozíku přístroje na 10, 20 a 30 průjezdů.

Bylo vyzkoušeno plazmování pouze PDMS části čipu, která byla slepena s neoplazmovaným krycím sklíčkem, dále bylo vyzkoušeno i plazmování obou částí čipu po stejnou dobu a jejich slepení. Provádění nastavování vzdálenosti plazmovací hlavice od PDMS části čipu bylo realizováno podle postupu v kapitole 4.3. V tomto pokuse ovšem byla na vozík pokládána pouze jedna část PDMS čipu, tedy plazmování bylo zdlouhavé a vždy bylo možné oplazmovat pouze jednu část čipu. Po oplazmování všech PDMS částí čipu byly plazmovány krycí sklíčka. Následně se přistoupilo k pokládání krycích sklíček jak plazmovaných, tak neoplazmovaných na oplazmované části PDMS čipu. V tomto bodě však nastal problém, kdy nebylo dosaženo těsnosti ani 25 % čipů. Tento problém je dále popsán v kapitole 5.4.1. Další navrženou optimalizací bylo oplazmovat PDMS část čipu zároveň s krycím sklíčkem. Držák pro přístroj na plazmování byl dostatečně velký, aby na něj mohli být umístěny obě tyto komponenty. Po umístění obou částí, ale nemohlo být dosaženo vzdálenosti 1,5 milimetru od obou částí čipu, proto byla zvolena vzdálenost plazmovací hlavice 1,5 milimetru od PDMS části čipu, a to odpovídalo vzdálenosti 3,5 milimetru od povrchu krycího sklíčka. Tímto se zkrátila celková

doba plazmování na jednu třetinu. Ihned po dosažení požadované doby plazmování bylo krycí sklíčko nalepeno na PDMS část čipu.

### 5.3.2 Lepení čipů

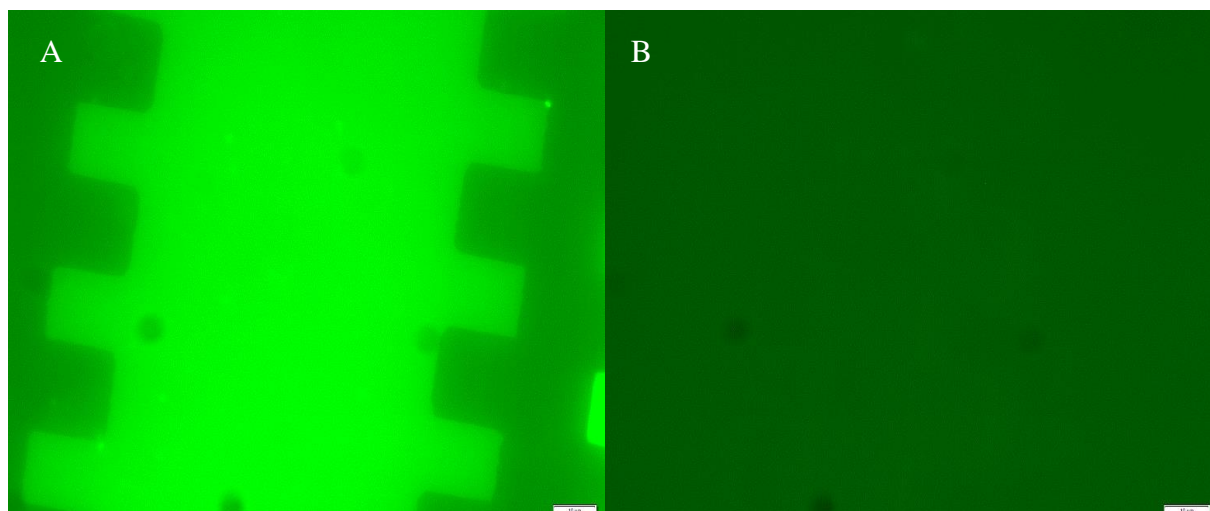
Po plazmování byly obě části čipu pokládány na sebe. Jako první bylo pinzetou sejmuto krycí sklíčko, které bylo přitlačeno plazmovanou stranou na plazmovanou stranu polymeru. Při pokládání krycího sklíčka muselo být dbáno zvýšené opatrnosti, aby nedošlo k prasknutí krycího sklíčka. Pokud by k prasknutí došlo, nastalo by poškození polymeru a nefunkčnost čipu. Krycí sklíčko bylo pokládáno na čip pod úhlem s postupným dosednutím na rovné ploše, aby bylo možno dosáhnout co nejhladšího dosednutí sklíčka na polymer. Pokud bychom pokládání prováděli v Petriho misce s malým poloměrem, nemuselo by sklíčko na polymer dosednout rovnoměrně díky vystouplým hranám Petriho misky. Při nerovnoměrném pokládání by se mohly vytvořit bubliny na spoji polymeru a sklíčka, které by způsobily netěsnost čipu.

### 5.4 Ověření těsnosti připravených čipů

Pozorování těsnosti čipů a její ověření bylo prováděno pomocí fluorescenční mikroskopie. Byly měřeny čipy, které měly různě dlouhý čas plazmování nebo byla plazmována pouze PDMS část čipu. U čipů byla také sledována těsnost v časové závislosti.

#### 5.4.1 Ověření těsnosti čipů při plazmování jedné části

Při plazmování jedné části čipů a následně plazmování krycích sklíček bylo provedeno ověřování pro všechny čipy po jednom týdnu od slepení a uložení v deionizvané vodě. Ze sedmi připravených čipů těsnil pouze jeden, zbytek čipů netěsnil. Tento poznatek vedl ke změně postupu lepení tak, že vždy byl plazmován čip zároveň s krycím sklíčkem a ihned po skončení procesu plazmování byly obě části k sobě přilepeny. Čip, který těsnil, byl plazmován po dobu 42 sekund, a byl slepen s krycím sklíčkem, které bylo taktéž plazmováno. Tento čip byl měřen po sedmi dnech od slepení.



*Obrázek 13: Struktura čipu na rozhraní krycího s polymerem v místě, kde se nachází mikrofluidní kanálky – čip, který těsní v pseudobarvě (A), čip, který netěsní v pseudobarvě (B); měřítko má rozměr 10 µm*

Na obrázku 13 je vidět srovnání čipů, které byly plazmovány po dobu 42 sekund a byly slepeny s krycím sklíčkem, které bylo plazmováno. Obrázek 13 (A) ukazuje jediný čip z vytvořené sady sedmi čipů, který těsnil. Obrázek 13 (B) je příklad čipu, který podlehl stejné úpravě jako čip z obrázku 13 (A), ale netěsnil stejně jako dalších pět čipů z této sady. V této sadě byly tři PDMS části plazmovány po dobu 42 sekund, dvě PDMS části z této sady byly plazmovány po dobu 84 sekund a dvě PDMS části byly plazmovány po dobu 128 sekund. Všechny PDMS části byly slepeny s krycím sklíčkem, které bylo plazmováno po stejnou dobu jako PDMS část čipu. Tato sada obsahovala pouze 7 čipů, protože dva čipy byly zničeny při lepení, kdy prasklo krycí sklíčko pokládané na PDMS strukturu čipu.

Příčinou netěsnosti šesti čipů byla dlouhá doba trvání od konce plazmování PDMS části a slepení s oplazmovaným krycím sklíčkem. V tomto případě se jednalo o řády desítek minut, to vedlo k tomu, že vyprchaly volné radikály, které tvoří spoj pro slepení PDMS části s krycím sklíčkem. Tento poznatek měl za následek změnu postupu, kdy bylo změněno plazmování jednotlivých částí po jedné, na plazmování PDMS části zároveň s krycím sklíčkem a jeho okamžité nalepení na PDMS část po ukončení plazmování.

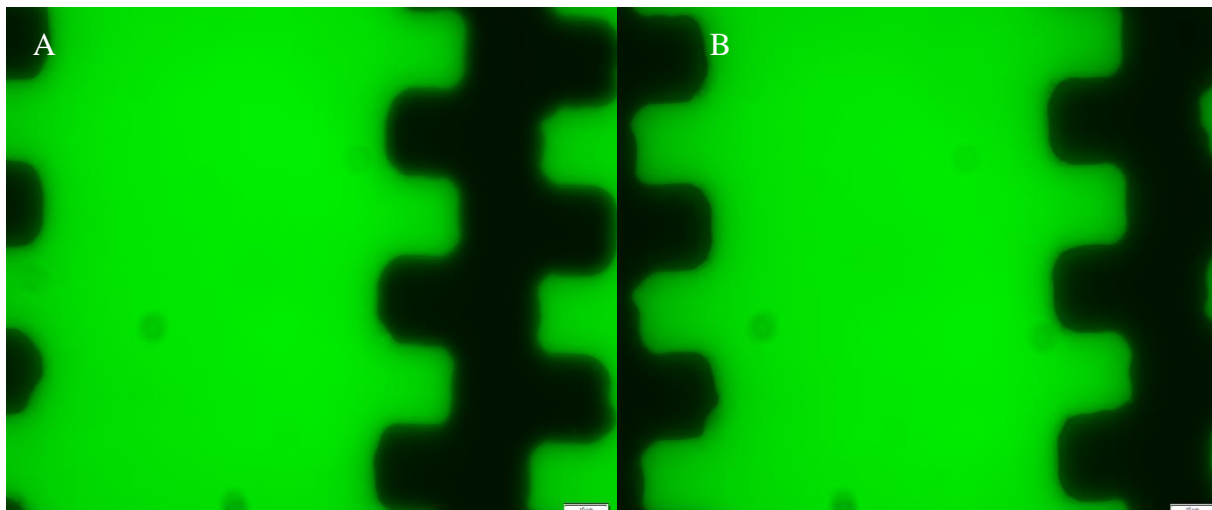
#### **5.4.2 Ověření těsnosti čipů plazmovaných po dobu 42 sekund**

Čipy plazmované po dobu 42 sekund při nastaveném napětí 10 V byly rozděleny do dvou částí. Jednalo se o čipy, které byly lepeny s oplazmovanými všemi částmi čipu a čipy, kde byla oplazmována pouze PDMS část čipu. Celkem bylo pro tuto metodu vytvořeno 12 čipů, z toho 6 bylo lepeno s plazmovaným krycím sklíčkem po dobu 42 sekund a 6 bylo lepeno s neplazmovaným krycím sklíčkem. Do tohoto počtu nejsou zahrnuty čipy plazmované po dobu 42 sekund z kapitoly 5.4.1. U čipů byla ověřována těsnost po sedmi dnech, po dvou a třech týdnech. Z celkového počtu 12 čipů bylo 10 připraveno na zkoumání fluorescenční metodou. Jako těsnící byly ověřeny 4 čipy, které byly lepeny s oplazmovaným krycím sklíčkem. Jednalo se o dva čipy, které byly připraveny na nové křemíkové masce, která byla dodána z Akademie Věd České republiky a dva, které byly připraveny na křemíkové masce, která již byla používána v předchozí práci na stejný účel a měla za sebou již minimálně šest použití. Z celkového počtu dvanácti čipů bylo na staré křemíkové masce připraveno devět čipů, kdežto na nové pouze tři.

U dvou čipů, které byly plazmovány po dobu 42 sekund a byly lepeny s krycím sklíčkem, které nebylo plazmováno, bylo po sedmi dnech uložení v deionizované vodě pozorováno odlepení celého krycího sklíčka od PDMS části čipu. Rozlepení čipů bylo znakem, že spoj mezi krycím sklíčkem a PDMS částí čipu není pevný a tento způsob lepení nelze považovat za účinný. Oba čipy, u kterých byl tento jev pozorován, se řadily do deseti čipů, které byly připraveny na zkoumání fluorescenční metodou. Rozplení čipů bylo pozorováno u obou čipů po sedmi dnech od jejich slepení.

### 5.4.3 Ověření těsnosti čipů plazmovaných po dobu 84 sekund

Plazmováním po dobu 84 sekund bylo vytvořeno 12 čipů, z toho 6 čipů mělo plazmovány obě části a 6 čipů mělo plazmováno pouze PDMS část čipu. Z celkového počtu 12 čipů bylo ke zkoumání pomocí fluorescenční metody vhodných 10, jako těsnících bylo ověřeno 8 čipů.

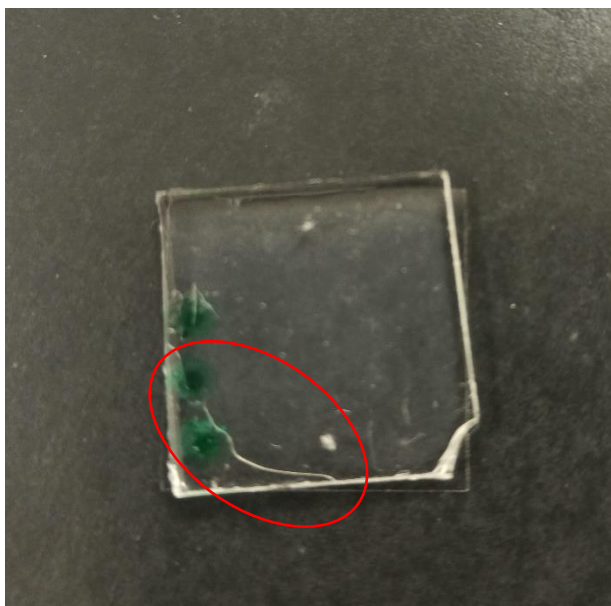


*Obrázek 14: Struktura čipu na rozhraní krycího sklíčka a PDMS části v pseudo barvě v místě kde se nachází kanálky – příklad těsnícího čipu s oběma částmi oplazmovanými(A), příklad druhého těsnícího čipu s oplazmovanou pouze PDMS částí (B); měřítko má rozměr 10  $\mu\text{m}$*

Na obrázku 14 (A) je možné pozorovat jeden z těsnících čipů, kdy čip byl slepen s oběma částmi čipu oplazmovanými po dobu 84 sekund. Obrázek byl pořízen 21 dní od slepení. Obrázek 14 (B) znázorňuje těsnící čip, kdy byla oplazmována pouze PDMS část a byla slepena s neoplazmovaným krycím sklíčkem. Obrázek byl pořízen 21 dní od slepení. Z celkového počtu sedmi těsnících čipů bylo 5 připraveno na nové křemíkové masce a zbytek na staré křemíkové masce. Všechny čipy, které byly připraveny na nové křemíkové masce, vydržely těsnit po dobu 21 dní.

### 5.4.3 Ověření těsnosti čipů plazmovaných po dobu 128 sekund

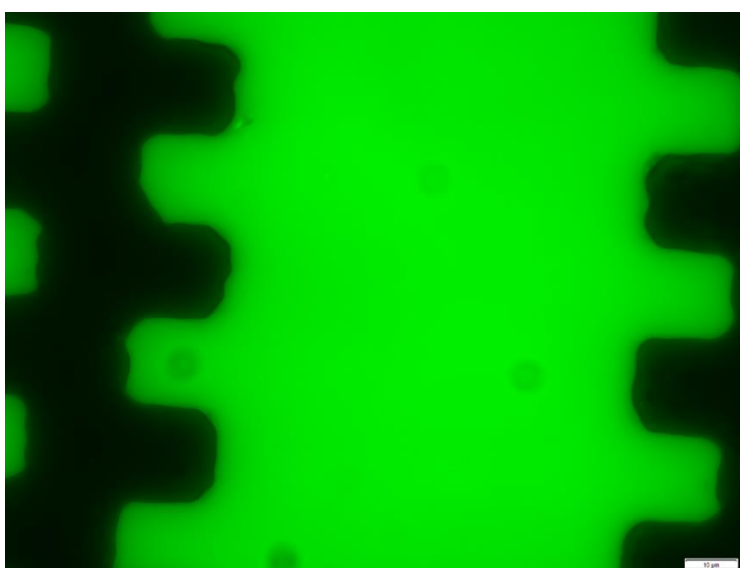
Úvaha byla, že při delším plazmovacím čase pro PDMS část čipu bude dosaženo lepšího a pevnějšího spoje PDMS části a krycího sklíčka čipu. Byly zkoumány čipy za použití plazmovacího času 128 s pro jednu nebo obě části. Celkem pro tuto metodu bylo vytvořeno 12 čipů, z tohoto počtu bylo 6 lepeno s neoplazmovaným krycím sklíčkem, a 6 bylo lepeno s oběma částmi oplazmovanými po dobu 128 sekund. Z celkového počtu 12 vytvořených čipů byl ke zkoumání pomocí fluorescenční metody vhodný jeden a ten také těsnil. Tento čip byl vytvořený na nové křemíkové masce.



*Obrázek 15: příklad vzniklé praskliny u čipu plazmovaného 128 sekund slepeného s krycím sklíčkem plazmovaným po stejnou dobu*

Obrázek 15 je příkladem vzniklých prasklin na čípech při plazmování po dobu 128 sekund. Jelikož tento problém byl pozorován u osmi z desíti čipů, které byly vytvořeny pro tento experiment, je tomuto problému (s praskáním krycích sklíček a znehodnocováním čipu) věnována pozornost v kapitole 5.5.1. Zbylé dva čipy, které nebyly vhodné pro měření fluorescenční metou, taktéž praskly. Ale nebylo možné posoudit, jestli praskly vinou dlouhé doby plazmování. K prasknutí došlo již při pokládání krycího sklíčka na PDMS část čipu.

Jediný těsnící čip s touto dobou plazmování byl podroben zkoumání pomocí fluorescenční metody a bylo zjištěno, že je těsnící, toto je potvrzeno na obrázku 16. Byla plazmována pouze PDMS část čipu. Vysvětlením tohoto těsnícího čipu může být krátké přerušení plazmování, kdy mohl čip vychladnout.



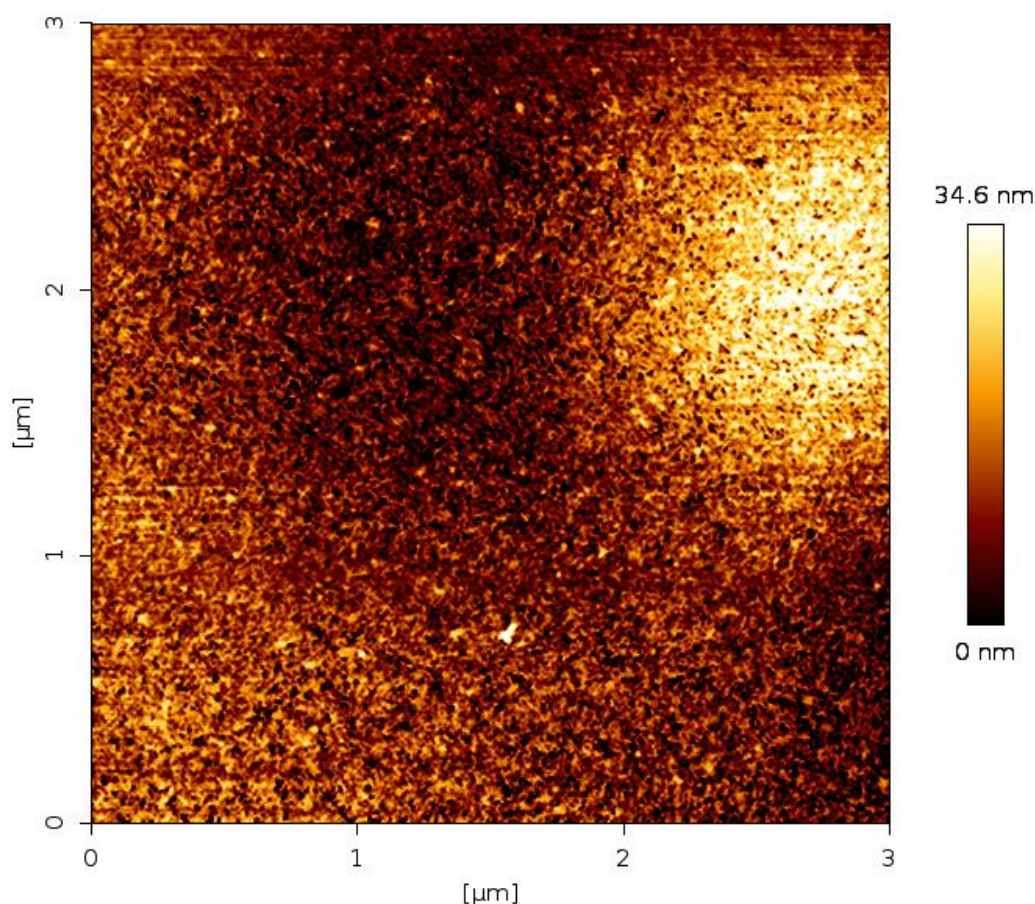
*Obrázek 16: Struktura čipu v místě, kde se nachází mikrofluidní kanálky, těsnící čip; měřítko má rozměr 10  $\mu\text{m}$*

## 5.5 Zkoumání povrchu PDMS části čipu pomocí AFM mikroskopu

Pomocí mikroskopu atomárních sil byly zkoumány povrchové vlastnosti PDMS části čipu. U všech měření PDMS částí čipu byl na mikroskopu atomárních zvolen tapping mód.

### 5.5.1 Měření povrchu PDMS části čipu, která nebyla oplazmována

Zkoumání vlastností PDMS části čipu bylo měřeno na mikroskopu atomárních sil. Měření bylo prováděno pomocí cantilveru SNL 10 s, s poměrně nízkou spring konstantou. Měření probíhala po ponoření PDMS části čipu do vody. Měřena byla vždy jedna PDMS strana čipu, jednalo se o stranu, na které byly umístěny mikrofluidní kanálky. V prvním provedeném měření byly změřeny dvě PDMS části čipu. Jedna PDMS část čipu byla zhotovena 5 dní před měřením pomocí AFM mikroskopu. Druhá PDMS část čipu byla zhotovena 5 měsíců před měřením pomocí AFM mikroskopu.



Obrázek 17: Struktura 5 dní staré PDMS části čipu naměřená pomocí AFM mikroskopu

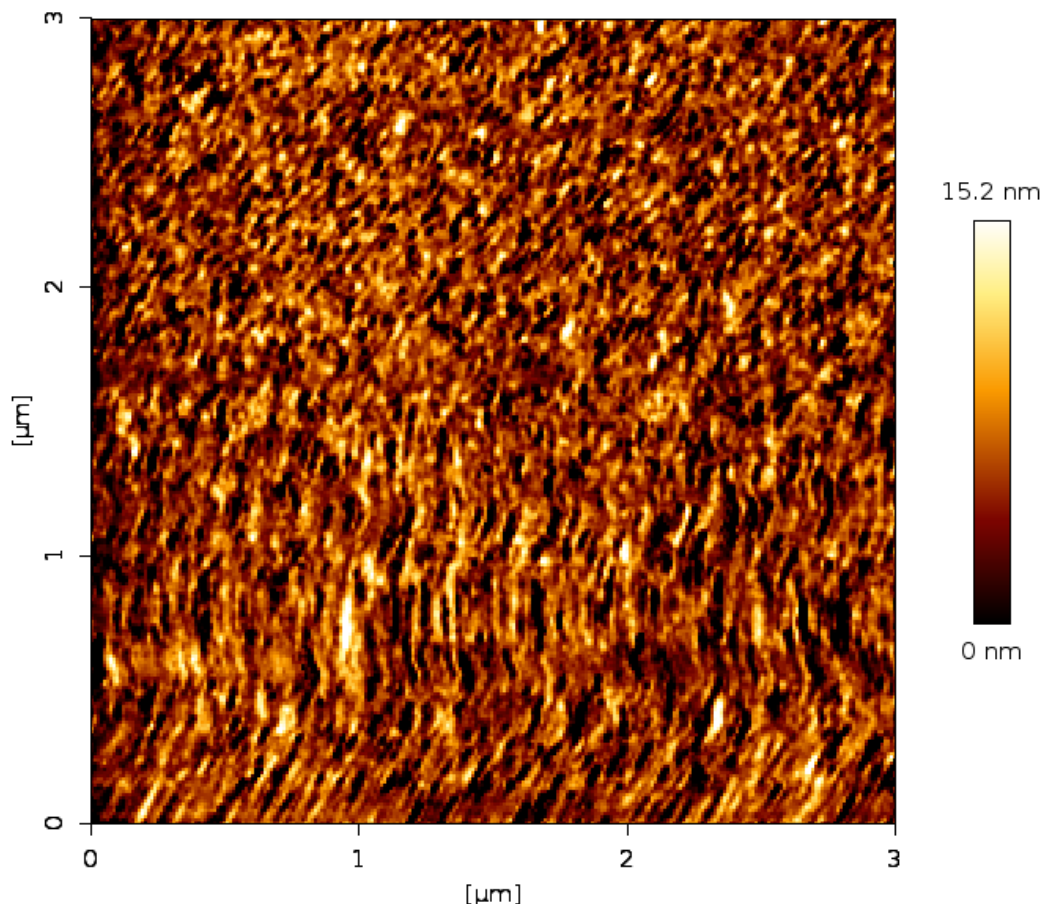
Výsledek měření (obrázek 17) odpovídal struktuře PDMS části čipu o stáří 5 dní. Na snímku jsou vidět póry, největší o výšce 34,6 nm. Nejčastější jsou vidět póry okolo 30 nm. Tyto póry byly často pospojované. Tato PDMS část čipu byla zhotovena na již používané křemíkové masce

o stáří tří let. Měření PDMS části čipu o stáří 5 měsíců nebyla úspěšná. Hrot mikroskopu při tomto měření zajížděl do struktury nebo naopak odjížděl ze struktury. Důvodem neúspěšnosti

měření byla pravděpodobná změna mechanických vlastností polymeru. Po tomto měření tedy bylo usouzeno, že při tomto stáří PDMS části čipu ji již nelze použít pro tvorbu mikrofluidních čipů. Tento poznatek vedl k myšlence, že není možné vytvoření většího počtu PDMS částí čipu, jejich následné uchování a následné lepení s krycím sklíčkem. Lepení čipů tedy musí být prováděno co nejdříve od zhotovení PDMS části čipu.

### 5.5.1 Měření povrchu PDMS části čipu, která byla oplazmována

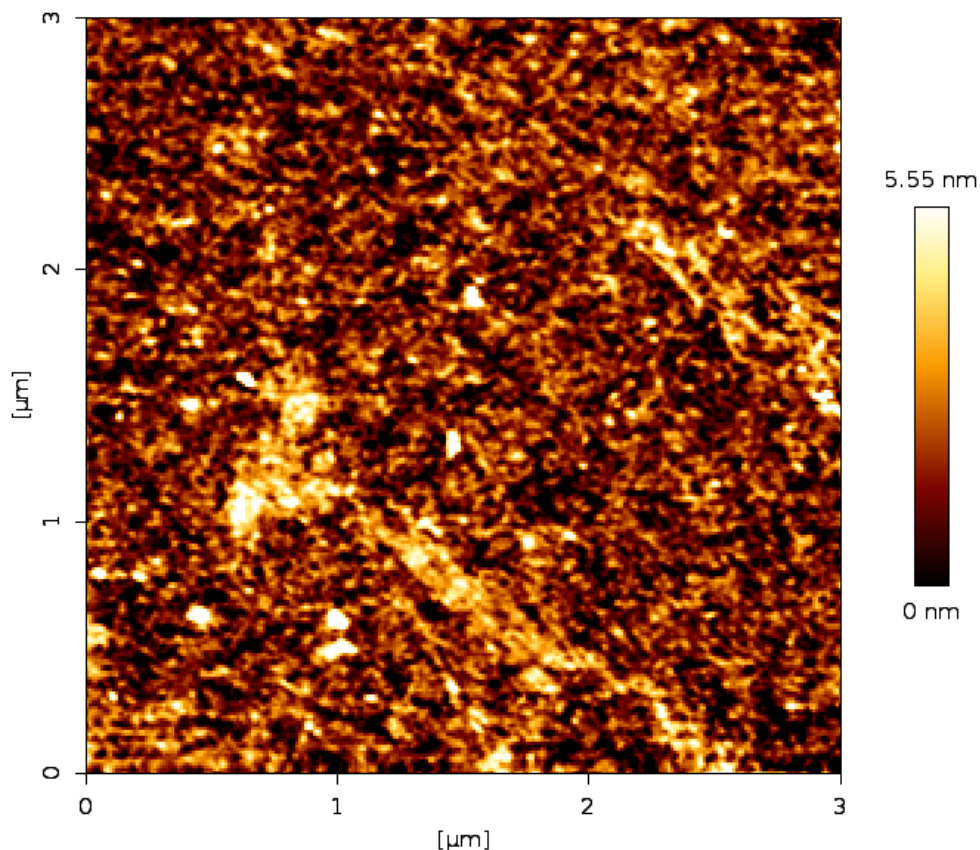
Toto měření bylo provedeno a vyhodnoceno po zjištění výsledku z kapitoly 5.4.3, kdy velká část čipů plazmovaných po dobu 128 sekund byla znehodnocena, tím že došlo k prasknutí krycího sklíčka na povrchu čipu. Byly pozorovány dvě PDMS části čipu, jedna PDMS část čipu byla vystavena plazmování po dobu 42 sekund a druhá plazmování po dobu 128 sekund. Obě měřené PDMS části byly staré 7 dní a byly vyrobeny na stejné křemíkové masce. Dvě měření na AFM mikroskopu byla prováděna pomocí cantilveru SNL 10 s, s poměrně nízkou spring konstantou. Čipy byly při měření ponořeny ve vodě a měření probíhala ve stejný den jako plazmování obou částí.



Obrázek 18: Struktura 7 dní staré PDMS části čipu plazmované po dobu 42 sekund naměřená pomocí AFM mikroskopu

Na snímku jsou viditelné póry, které jsou pospojovány. Velikost největších pórů byla pomocí AFM mikroskopu stanovena na 15,2 nm. Porovnáním obrázku 18 s obrázkem 17 bylo zjištěno, že již při plazmování PDMS části čipu po dobu 42 sekund se drsnost povrchu zmenší přibližně

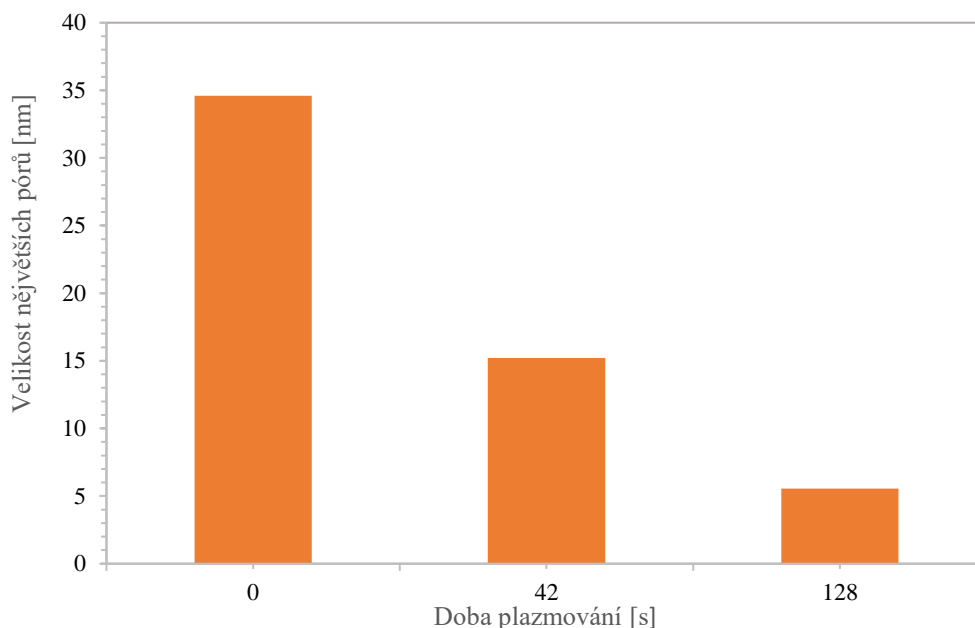
na polovinu původní. Tento výsledek odpovídal výsledkům dosažených v práci zhotovenou S. Vlassovem a kolektivem. V jejich práci bylo pozorováno zmenšení drsnosti povrchu PDMS po úpravě plazmou. Velikost pórů v publikované práci byla 0,68 nm před úpravou plazmou, 0,51 nm při 15sekundovém plazmování a 0,34 nm při plazmování po dobu 30 sekund. Měření ve zmíněné práci bylo prováděno na AFM mikroskopu s použitím cantilveru 20 mikrometrů s tuhostí 0,15 N/m pomocí tapping módu [35]. V této bakalářské práci bylo pozorováno zmenšení pórů z 34,6 nm na 15 nm.



*Obrázek 19: Struktura 7 dní staré PDMS části čipu plazmované po dobu 128 sekund naměřená pomocí AFM mikroskopu*

Obrázek 19 zobrazuje PDMS část čipu plazmovanou po dobu 128 sekund a bylo předpokládáno, že struktura povrchu bude ještě méně drsná než při době plazmování 42 sekund. To bylo také ověřeno a největší póry měly velikost 5,55 nm. Ovšem tyto póry nejsou pospojovány, jak je vidět na obrázku. Póry v tomto obrázku jsou ve shlucích, což by mohlo napovídat vytvoření silanových skupin na povrchu PDMS po plazmování. To by naznačovalo, proč většina čipů nebyla těsných nebo praskla při plazmování po dobu 128 sekund. Toto tvrzení bylo podpořeno v práci publikovanou G. Bar a kolektivem. V této práci byly zveřejněny výsledky, kdy byl povrch PDMS vystaven plazmě po dobu 5 minut a na povrchu byly pomocí AFM mikroskopie viditelné trhliny. Ve výše zmíněné práci byla publikována teorie, že trhliny vznikly zahřátím a natažením PDMS, které se po ochlazení smrštilo a prasklo [31]. Tato teorie

by se tedy mohla vztáhnout i na čipy zhotovené v této bakalářské práci, kdy byly vystaveny plazmě po dobu 128 sekund.



*Graf 1: Závislost doby plazmování na velikosti největších pórů*

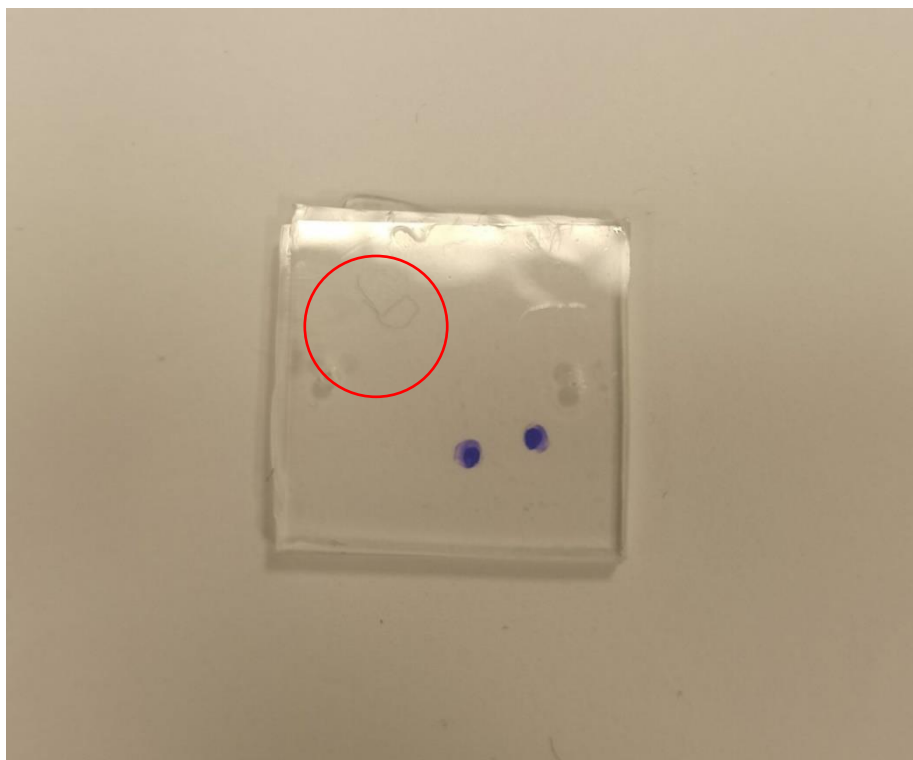
Na grafu 1 jsou viditelné změny velikosti póru, které jsou s delším časem plazmování menší. Tyto změny procentuálně odpovídají změnám v práci S. Vlassova a kolektivu.

## **5.6 Vliv vnějších podmínek na těsnost čipu**

V rámci bakalářské práce byl studován vliv vnějších podmínek na vlastnosti připravovaných čipů. Bylo zjištěno, že vnější podmínky mají výrazný vliv na kvalitu připravovaných čipů.

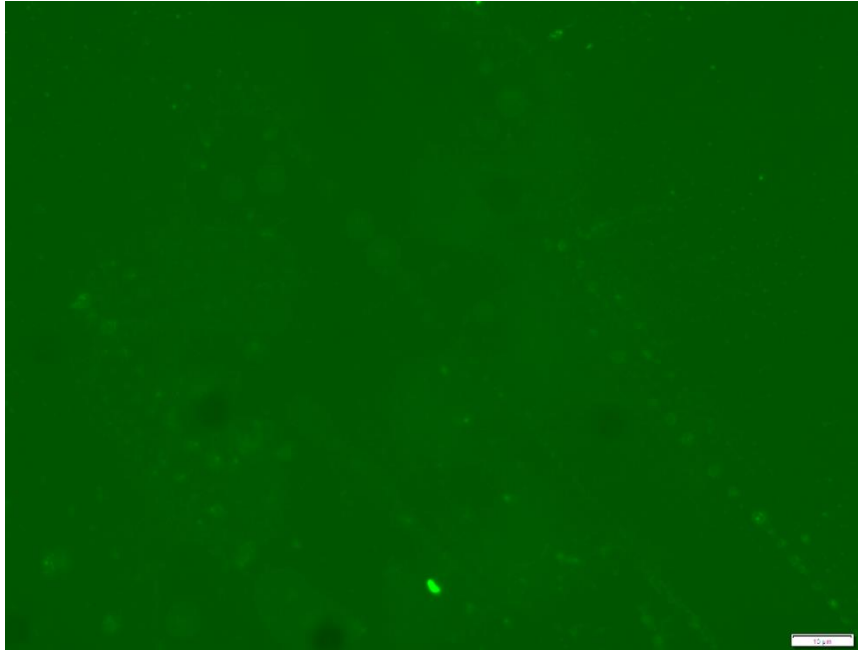
### **5.6.1 Vnější faktory ovlivňující těsnost čipů**

Čipy byly zhotovovány v prostorách laboratoří FCH VUT. Při zhotovování čipů byly čipy přenášeny v Petriho miskách nebo skleněné nádobě s deionizovanou vodou. Při vyřezávání, čištění a lepení čipů bylo dbáno na čistotu čipů. Na PDMS části i krycí sklíčka byla používána pinzeta, aby nedošlo k umaštění struktur lidskou rukou. Ovšem pinzeta byla vyhodnocena jako špatný nástroj při pokládání krycího sklíčka na PDMS část čipu, jelikož v pinzetě není dostatečný cit při práci. To bylo příčinou prasknutí několika krycích sklíček a následným poškozením čipu. Největším problémem byl všude přítomný prach a jemná smítka, která se mohla dostat mezi PDMS část čipu a krycí sklíčko. Pokud k tomuto jevu došlo bylo jasné, že čip nebude těsnit a jeho funkce nebudou odpovídat požadovaným.



*Obrázek 20: Zhotovený netěsnící čip s vadou v rozhraní krycí sklička a PDMS část, v obrázku označena červenou barvou*

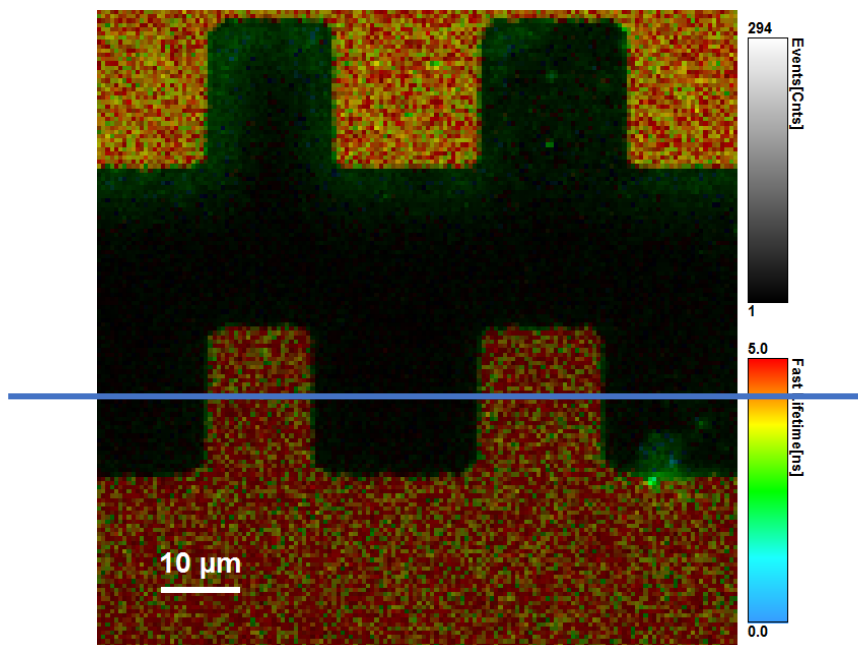
Na obrázku 20 je viditelné černé vlákno anorganického původu, které zabraňuje hladkému a pevnému spoji krycího sklíčka s PDMS částí čipu. Netěsnost čipu byla ověřena pomocí fluorescenční metody. Na obrázku 21 je vidět, že tento čip opravdu netěsnil a podtekl. Zelená barva po celém snímku bez jakékoliv struktury PDMS značí, že celé rozhraní je zaplněno fluorescenční sondou ATTO 488. Problém čistoty prostředí, kdy je s PDMS částí čipu nebo s krycím sklíčkem manipulováno by mohl být vyřešen tak, že by se s těmito komponenty manipulovalo pouze v Laboratoři čistých prostor. Při použití Laboratoře čistých prostor by byla eliminována možnost proniknutí nežádoucích materiálů mezi PDMS strukturu čipu a krycí sklíčko. Příprava čipů v Laboratoři čistých prostor by mohla být předmětem navazující práce.



Obrázek 21: Struktura čipu na rozhraní krycího s polymerem v místě, kde se nachází mikrofluidní kanálky, netěsnící čip; měřítko má rozměr 10  $\mu\text{m}$

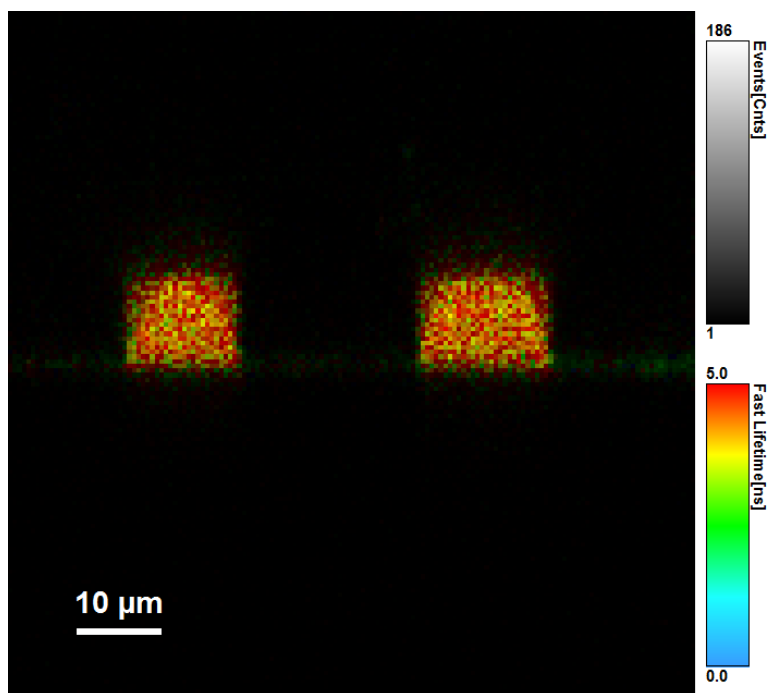
### 5.7 Zkoumání struktury čipu pomocí metody FLIM

Pomocí metody FLIM (zobrazování na základě doby života fluoroforu) byla vytvořena sken vnitřní struktury čipu. Pro toto měření byla použita sonda ATTO 448. Metoda FLIM byla provedena, aby bylo zjištěno, zda je možné spolehlivě určit těsnost čipu, když je použita fluorescenční metoda.



Obrázek 22: Sken čipu na rozhraní PDMS části a krycího sklíčka pomocí metody FLIM, zobrazení v ploše vodorovné s krycím sklíčkem. Modrou čarou označena oblast zájmu pro další skenování; měřítko má rozměr 10  $\mu\text{m}$

Na obrázku 23 je vidět sken pomocí metody FLIM v oblasti zájmu, kde jsou kanálky celkově zaplněny roztokem sondy. V místě modré čáry viz. obrázek 22 byl proveden sken podle osy y, aby byla nalezena rovina v ose y, ve které je spoj mezi polymerem a krycím sklíčkem.

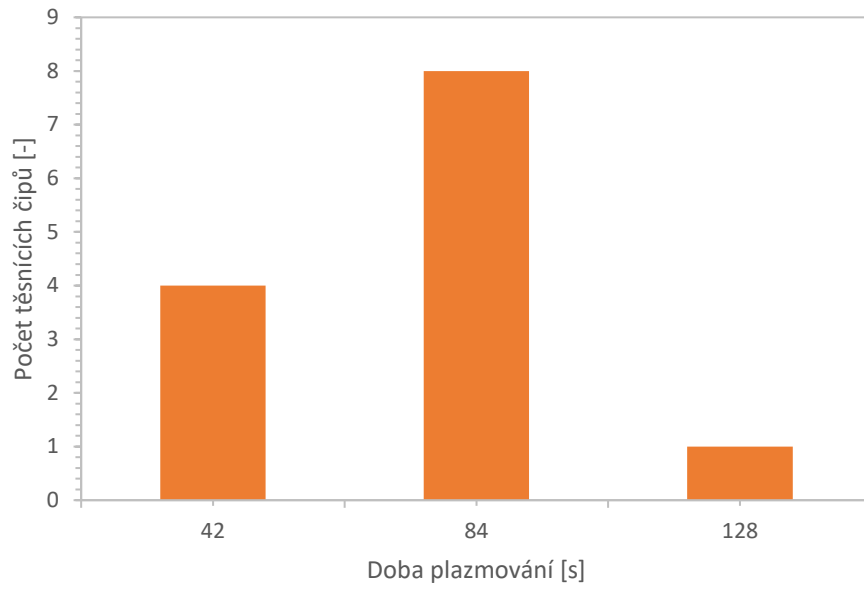


Obrázek 23: Sken čipu na rozhraní PDMS části a krycího sklíčka pomocí metody FLIM, sken kolmý na rovinu krycího sklíčka; měřítko má rozměr 10  $\mu\text{m}$

Tyto provedené skeny odhalily, že fluorescenční metoda, která byla v této práci použita, je dostatečně přesná pro stanovení těsnosti čipu. Na obrázku jsou vidět průřezy mikrofluidních kanálků naplněné fluorescenční sondou. Zároveň v rovině spoje mezi krycím sklíčkem a polymerem nejsou žádné body v odstínech červené a žluté a nedochází tedy k průniku roztoku sondy do tohoto spoje. Jiným zajímavým poznatkem je rozmití hranice kanálku v jeho vrchní části, to můžeme vysvětlit částečnou difuzí roztoku do odlitku porézního polymeru a pro další použití čipu je potřeba brát tento fakt v úvahu.

### 5.8 Vyhodnocení vhodné doby plazmování

Vybráním tří dob plazmování pro experiment byla stanovena vhodná doba plazmování, kdy nebude docházet k rozlepování ani praskání čipů. Z grafu 2 jasně vyplývá, že nejlepší výsledky byly dosaženy při zvolení doby plazmování 84 sekund. Při této době nebyl shledán rozdíl v plazmování pouze PDMS části nebo při plazmování PDMS části i krycího sklíčka. Bylo tedy změněn postup přípravy mikrofluidního čipu kdy se doba plazmování změnila na 84 sekund pro obě části čipu. Zvolení plazmování obou částí čipu bylo zvoleno z důvodu, že povrchy obou lepených částí jsou plazmatickou úpravou dodatečně čištěny. Toto čištění není příliš účinné, ale může přinést alespoň o pár procent větší čistotu při lepení čipů.



*Graf 2: Závislost doby plazmování na počtu těsnících čipů*

## 6 Závěr

Cílem této práce bylo vytvořit funkční mikrofluidní čip a navrhnout metodiku vhodnou k ověření jeho těsnosti. Byla vypracována rešerše v oblastech souvisejících s touto bakalářskou prací. V rešerši byly popsány poznatky o mikrofluidních čipech a metodách pro zkoumání jejich těsnosti.

V experimentální části této práce byly odhaleny některé problémy, které zabraňovaly vyrobení těsnícího mikrofluidního čipu. Tyto problémy jsou popsány v jednotlivých kapitolách. K problémům jednotlivých kapitol je vždy navrženo řešení, případně změna, která proběhla v metodě přípravy čipu. Vyhodnocením tří vybraných dob plazmování obou částí čipu nebo pouze PDMS části čipu bylo zjištěno, že jako nejvhodnější doba plazmování je 84 sekund. Při tomto čase nebyl shledán podstatný rozdíl mezi plazmováním pouze PDMS části čipu nebo plazmováním PDMS části i krycího sklíčka. Čipy, které byly vyrobeny na nové křemíkové masce vydrželi těsnit po dobu 21 dní. Doba 21 dní byla na začátku experimentu stanovena jako doba, které jsme chtěli dosáhnout pro těsnost čipu. Čipy byly podrobeny zkoumání pomocí AFM mikroskopu, kdy byly měřeny povrchy čipů. Bylo zjištěno, že na povrch čipů má vliv jak stáří, tak i doba plazmování. Zkoumáním pomocí metody FLIM bylo zjištěno, že fluorescenční metoda je vhodná k ověřování těsnosti čipu a zároveň roztok sondy částečně difunduje do porézního polymeru a tento fakt je při dalších měřeních třeba brát v potaz. Při výrobě čipů bylo zjištěno, že čistota prostředí hraje velkou roli v těsnosti čipů, protože byť je jedno vlákno nebo větší částice prachu může mít za následek netěsnost čipu. Návrhem na další studii přípravy mikrofluidních čipů bylo vyzkoušení přípravy čipu v Laboratoři čistých prostor.

Téma mikrofluidních čipů není zdaleka vyčerpáno a dalším možným studiem je ověření počtu odlevání a stáří křemíkové masky. Dalším zkoumáním může být optimalizace způsobu lepení krycího sklíčka na PDMS část čipu. V tomto kroku by nemusela být používána pinzeta, ale mohlo by být použito tiskařské razítko. To by zabraňovalo vytvoření bublin mezi PDMS částí a krycím sklíčkem a zároveň by se snížila možnost prasknutí krycího sklíčka při jeho přitlačení na povrch PDMS pomocí pinzety. Využití mikrofluidních čipů může v budoucnosti spočívat ve vytvoření buněčných membrán ve struktuře kanálek a komůrek, kdy může být sledována jejich stabilita v různých prostředích. Vytvoření buněčných membrán může být provedeno i na čipech připravených v našich laboratořích. Důležité je ovšem nalézt vhodný způsob připevnění konektorů a hadiček do vyražených otvorů v mikrofluidním čipu. Tvorba buněčných membrán a sledování stabilit v různých prostředích bude studiem následujících diplomových prací na téma mikrofluidních čipů a buněčných membrán.

## Citace

- [1] TESAŘ, Václav. *Mikrofluidika. AUTOMA. 2008, 2008(10), 1-4. /1*
- [2] PŘIBYL, Michal, ed. *Inženýrské mikrosystémy pro biotechnologické aplikace: sborník workshopu konaného dne 19.6.2007, [Praha ...]. V Praze: Vysoká škola chemicko-technologická, 2007. ISBN isbn978-80-7080-020-1. /6-2*
- [3] PŘIBYL, Michal a Jitka ČEJKOVÁ. *Mikrofluidní zařízení: experimentální aplikace a matematické modelování. 2. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2007. ISBN 978-80-7080-654-8. /7-3*
- [4] URUBA, Václav. *Turbulence [online]. 2009, 1-414 [cit. 2021-5-12]. Dostupné z: [http://www2.it.cas.cz/~uruba/docs/Aero/Turbulence\\_45.pdf](http://www2.it.cas.cz/~uruba/docs/Aero/Turbulence_45.pdf) 9-4*
- [5] *Laminární a turbulentní proudění [online]. [cit. 2021-5-12]. Dostupné z: [https://physics.mff.cuni.cz/kfpp/skripta/kurz\\_fyziky\\_pro\\_DS/display.php/kontinuum/4\\_5/10-5](https://physics.mff.cuni.cz/kfpp/skripta/kurz_fyziky_pro_DS/display.php/kontinuum/4_5/10-5)*
- [6] *Encyklopedie fyziky [online]. 2006-2011 [cit. 2021-5-12]. Dostupné z: <http://fyzika.jreichl.com/main.article/view/555-reynoldsovo-cislo/11-6>*
- [7] *Reynoldsovo číslo [online]. 2014 [cit. 2021-5-12]. Dostupné z: [http://www.multimediaexpo.cz/mmecz/index.php/Reynoldsovo\\_cislo/12-7](http://www.multimediaexpo.cz/mmecz/index.php/Reynoldsovo_cislo/12-7)*
- [8] P. Klusoňa<sup>a,b</sup>, P. Staváreka, S. Hejdaa, V. Pěnkavová, M. Bendováa, and H. Vychodilováa ( *a Institute of Chemical Process Fundamentals, Academy of Sciences of the Czech Republic; b Institute for Environmental Studies, Faculty of Science, Charles University*): *Microreactors and Microfluidic Reactors for Synthesis of Fine Chemicals* 13-8
- [9] Pasmaan T, Grijpma D, Stamatialis D, Poot A. 2018 Flat and microstructured polymeric membranes in organs-on-chips. *J. R. Soc. Interface* 15: 20180351. <http://dx.doi.org/10.1098/rsif.2018.0351> 14-9
- [10] VELVE-CASQUILLAS, Guilhem, Maël LE BERRE, Matthieu PIEL a Phong T. TRAN. *Microfluidic tools for cell biological research. Nano Today [online]. 2010, 5(1),*

28-47 [cit. 2021-0-21]. DOI: 10.1016/j.nantod.2009.12.001. ISSN 17480132. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1748013209001340/>

- [11] *Měkká litografie pro mikro a nanoskopické modelování [online].* [cit. 2021-6-21]. Dostupné z: <https://cze.bioconus.com/soft-lithography-micro-966008#menu-3>
- [12] VELVE-CASQUILLAS, Guilhem, Maël LE BERRE, Matthieu PIEL a Phong T. TRAN. *Microfluidic tools for cell biological research.* *Nano Today [online].* 2010, 5(1), 28-47 [cit. 2020-06-20]. DOI: 10.1016/j.nantod.2009.12.001. ISSN 17480132. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1748013209001340>
- [13] WISSER, F. M., B. SCHUMM, G. MONDIN, J. GROTHE a S. KASKEL. *Precursor strategies for metallic nano- and micropatterns using soft lithography [online].* [cit. 2020-06-20]. DOI: 10.1039/C4TC02418D. ISBN 10.1039/C4TC02418D. Dostupné z: [http://xlink.rsc.org/?DOI=C4TC02418D\\*19-13](http://xlink.rsc.org/?DOI=C4TC02418D*19-13)
- [14] FLORES, Angel, Michael R., G. MONDIN, J. GROTHE a S. KASKEL. *Soft Lithographic Fabrication of Micro Optic and Guided Wave Devices [online].* [cit. 2020-06-20]. DOI: 10.5772/8185. ISBN 10.5772/8185. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/lithography/soft-lithographic-fabrication-of-microoptic-and-guided-wave-devices/20-14>
- [15] Wikipedia contributors. (2021, June 9). Polydimethylsiloxane. In Wikipedia, The Free Encyclopedia. Retrieved 18:33, June 21, 2021, from <https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Polydimethylsiloxane&oldid=1027765496>  
[21-15](https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Polydimethylsiloxane&oldid=1027765496)
- [16] POLÁŠEK, Jaromír. *Nové metody optické mikroskopie. Pokroky matematiky, fyziky a astronomie [online].* 1996, 1(41), 1-24 [cit. 2022-02-17]. Dostupné z: [https://dml.cz/bitstream/handle/10338.dmlcz/139719/PokrokyMFA\\_41-1996-1\\_1.pdf](https://dml.cz/bitstream/handle/10338.dmlcz/139719/PokrokyMFA_41-1996-1_1.pdf)
- [17] OCKENGA, Wymke. *Fluorescence in Microscopy.* Leica-microsystems [online]. Philipps University Marburg, Institute of Cytobiology and Cytopathology, Germany, 2011 [cit. 2022-02-18]. Dostupné z: <https://www.leica-microsystems.com/science-lab/fluorescence-in-microscopy/>
- [18] KUBÍNEK, Roman; MAŠLÁN, Miroslav; VŮJTEK, Milan. *Mikroskopie skenující sondou.* Vydavatelství Univerzity Palackého, 2003.

- [19] *Chemistry LibreTexts* [online]. 2022 [cit. 2022-05-24]. Dostupné z: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical\\_and\\_Theoretical\\_Chemistry\\_Textbook\\_Maps/Supplemental\\_Modules\\_\(Physical\\_and\\_Theoretical\\_Chemistry\)/Spectroscopy/Electronic\\_Spectroscopy/Radiative\\_Decay/Fluorescence](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Spectroscopy/Electronic_Spectroscopy/Radiative_Decay/Fluorescence)
- [20] *ATTO barviva. Generi Biotech* [online]. [cit. 2022-02-21]. Dostupné z: <https://www.generi-biotech.com/cs/produkty/atto-barviva/>
- [21] HALL, J. RICHARD, CAROLYN A. L WESTERDAHL a M. J BODNAR. *ACTIVATED GAS PLASMA SURFACE TREATMENT OF POLYMERS FOR ADHESIVE BONDING: PART II*. 1970. PICATINNY ARSENAL DOVER, NEW JERSEY, 1970. Dostupné také z: <https://apps.dtic.mil/sti/pdfs/AD0711011.pdf>
- [22] KULHÁNEK, Petr. *Úvod do teorie plazmatu*. Praha: AGA, 2011. ISBN 978-80904582-2-2.
- [23] M.Králová, *Luminiscence*, [https://edu.techmania.cz/cs/encyklopedie/fyzika/kvant\\_a\\_luminiscence](https://edu.techmania.cz/cs/encyklopedie/fyzika/kvant_a_luminiscence)
- [24] M. Konečný, *Co je to luminiscence?* <http://vnuf.cz/sbornik/prispevky/13-14-Konecny.html>
- [25] kol. autorů, *Sborník konference projektu Heuréka* [https://kdf.mff.cuni.cz/heureka/sborniky/DilnyHeureky\\_2013.pdf](https://kdf.mff.cuni.cz/heureka/sborniky/DilnyHeureky_2013.pdf)
- [26] J. Reichl, *Encyklopedie fyziky, Aktivní prostředí, luminiscence* <http://fyzika.jreichl.com/main.article/view/779-aktivni-prostredi-luminiscence>
- [27] *Microfluidics and microfluidic devices: a review* [online]. Elveflow. [cit. 2022-02-20]. Dostupné z: <https://www.elveflow.com/microfluidic-reviews/generalmicrofluidics/microfluidics-and-microfluidic-device-a-review/>
- [28] Jan Svoboda [online]. Brno, 2022 [cit. 2022-05-08]. Dostupné z: <https://www.jansvoboda.cz/Prutokomer-Dr-Eddy-c38701>
- [29] VARGOVÁ, A. *Pokročilé membránové systémy*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 52 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Filip Mravec, Ph.D..
- [30] *Fluorescenční mikroskopie* [online]. Praha [cit. 2022-05-08]. Dostupné z: <http://kfrserver.natur.cuni.cz/studium/prednasky/mikro/mscope/fluor/fluor.htm>

- [31] BAR, G. *Investigation of the stiffness change in, the indentation force and the hydrophobic recovery of plasma-oxidized polydimethylsiloxane surfaces by tapping mode atomic force microscopy*. *Polymer* [online]. 2001, **42**(8), 3627-3632 [cit. 2022-05-08]. Dostupné z: doi: [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(00\)00738-2](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(00)00738-2)
- [32] PDMS: a review. *Elveflow* [online]. [cit. 2022-05-13]. Dostupné z: <https://www.elveflow.com/microfluidic-reviews/general-microfluidics/the-polydimethylsiloxane-pdms-and-microfluidics/>
- [33] TARN, Mark a Nicole PAMME. *Microfluidics* [online]. 2013, 1-7 [cit. 2022-05-12]. Dostupné z: doi: 10.1016/b978-0-12-409547-2.05351-8
- [34] DE LA GUARDIA, M. a S. ARMENTA. *Chapter 7 - Downsizing the Methods*. *Comprehensive Analytical Chemistry* [online]. 2011, **57**, 157-184 [cit. 2022-05-24]. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53709-6.00007-0>
- [35] VLASSOV, Sergei. *Adhesion and Mechanical Properties of PDMS-Based Materials Probed with AFM: A Review*. *Reviews on Advanced Materials Science* [online]. 56-62 [cit. 2022-05-24]. Dostupné z: doi:10.1515/rams-2018-0038

## 8 SEZAM POUŽITÝCH ZKRATEK

PDMS	polydimethylsiloxan
SV poměr	poměr velikosti povrchu a vnitřního objemu zařízení
Re	Reynoldsovo číslo
AFM mikroskop	mikroskop atomárních sil
FLIM	zobrazování na základě doby života fluoroforu