**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS**

GABRIELA RODRIGUES MENDES DUARTE

Análises Genéticas em Sistemas Microfabricados

**São Carlos
2010**

GABRIELA RODRIGUES MENDES DUARTE

Análises Genéticas em Sistemas Microfabricados

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Emanuel Carrilho.

**São Carlos
2010**

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, que tanto sonharam com a
realização deste sonho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por seu infinito amor e por tantas bênçãos derramadas sobre mim.

Muitas pessoas me ajudaram durante essa longa jornada do doutorado, tanto em São Carlos quanto nos Estados Unidos, além, é claro, de muitas pessoas em Goiânia que, mesmo de longe, me ajudaram bastante. Gostaria de agradecer imensamente a todas as pessoas que de alguma forma me ajudaram, direta ou indiretamente, não só durante o doutorado, mas também àquelas me ajudaram a chegar até ele.

À minha família maravilhosa, aos meus pais Hélio (*in memorian*) e Joventina, que tanto lutaram e desejaram que eu chegasse até aqui. Infelizmente meu pai não pôde ver a concretização deste sonho, mas sei o quanto ele sonhou com isso. Pai muito obrigada por tudo que você representou para mim! E mãe, você é meu tudo! Aos meus irmãos, Leandro e Kamila, que me deram todo apoio para conseguir chegar até aqui. Sem eles com certeza não teria conseguido. A minha cunhada Ludimila e aos meus sobrinhos Sophia e Lucas, que encheram a minha vida de alegria.

Ao meu amor, Mauro Caetano, por todo carinho e momentos felizes compartilhados durante todo este tempo. Sua ajuda é sempre fundamental, e você me faz acreditar que tudo sempre dá certo. Te amo!

Ao Prof. Dr. Emanuel Carrilho, pela orientação deste trabalho, por todos os ensinamentos e, principalmente por sua amizade. Obrigada pelo apoio e por toda dedicação dispensada sempre que precisei.

Ao Prof. Dr. Fernando Mauro Lanças pela oportunidade em trabalhar em seu grupo de pesquisa nos primeiros anos do doutorado e pelas contribuições no exame de qualificação.

À Prof. Dr. Fernanda Canduri pelas sugestões no exame de qualificação.

Aos amigos do Biomics pela amizade e convivência em um ambiente de trabalho construtivo: Karina, Juliana, Juliane, Maribel, Fayene, Patrícia, Thiago, Renato e Eduardo. Sentirei saudade de todos!

Aos ex-alunos do Biomics que já seguiram seu caminho e estão exercendo com sucesso a carreira acadêmica. À Valéria, pela grande amizade e muitos momentos alegres no laboratório, ao Wendel, pela amizade e por toda ajuda durante o doutorado e ao amigo Evandro.

Aos amigos do Laboratório Nacional de Luz Síncroton, Maria Helena, Ângelo, André e Vinícios, por toda ajuda com o trabalho dos nanocanais.

Ao Prof. Dr. James P. Landers, pela oportunidade em trabalhar em um grupo de pesquisa de elevado nível na Universidade da Virginia, e pelo entusiasmo com o trabalho com os microchips de PT. Com certeza a oportunidade de trabalhar em um laboratório de pesquisa nos Estados Unidos mudou os rumos deste trabalho e da minha vida profissional.

À grande amiga Carol Price, que sem ela não teria conseguido tudo que consegui nos Estados Unidos. Sua ajuda foi fundamental para a adaptação no laboratório e para o desenvolvimento de todo o projeto.

Ao Brian Poe, pela ajuda com o sistema de IV-PCR, que possibilitou que a PCR fosse realizada nos microchips de PT.

As minhas amigas brasileiras-americanas, Vanda e Linda, que me deram todo apoio emocional para permanecer nos Estados Unidos. Com a ajuda de vocês tudo ficou mais fácil.

À todos os amigos que me deram todo apoio e torceram por mim, Tatiana Zuppa, Fernanda Dias, Fabiane e Juliana Rodrigues. Muito obrigada pela amizade de vocês. E a minha afilhada Laura pela alegria que traz a minha vida.

Aos professores do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás. Eles foram meus primeiros incentivadores. Especialmente aos professores Nelson (orientador de iniciação e mestrado), Romualdo (quem me incentivou a iniciar na pesquisa) ,e minhas grandes amigas Gizelda e Inês Leles.

À Vanessa, à Odete e às secretárias da Pós-Graduação, Andréia e Silvia por toda ajuda e suporte

Ao Romano, sempre prestativo a me ajudar com as finanças.

Ao CNPq e à FAPESP (processo 2005/04473-4) pelas bolsas de concedidas.

RESUMO

A produção de microssistemas de análises totais (μ TAS) tem sido objeto de esforços intensos pela comunidade científica. A necessidade de produção de uma plataforma que realize extração, amplificação e separação de DNA--um verdadeiro "*lab on a chip*"--é impulsionada pelas vantagens associadas com as análises em plataformas miniaturizadas. Esta Tese foca no desenvolvimento de métodos para análises de DNA em dispositivos microfluídicos que podem ser associados em μ TAS. Inicialmente, foi feito o desenvolvimento de um novo método de extração em fase sólida em que a eficiência de extração depende da manipulação magnética das partículas e não do fluxo da solução através da fase sólida. A utilidade desta técnica em isolar DNA puro de alta qualidade (amplificável) a partir de uma amostra biológica complexa foi demonstrada através da purificação de DNA a partir de sangue total e a subsequente amplificação do fragmento do gene β -globina. A técnica descrita é rápida, simples e eficiente, permitindo uma recuperação de mais de 60% de DNA a partir de 600 nL de sangue em concentração suficiente para amplificação via reação em cadeia da polimerase (PCR). Após o desenvolvimento da extração dinâmica de DNA em fase sólida (dSPE) em microchip de vidro, o método foi adaptado para o uso em microchips de poliéster-toner (PT). Além da extração, a amplificação e separação de DNA também foram realizadas em microchips de PT. O processo convencional de fabricação dos dispositivos de PT produz canais com 12 μ m de profundidade. Este trabalho descreve um novo processo de fabricação dos microchips de PT com canais mais profundos. Uma cortadora a laser de CO₂ é usada para definir a estrutura desejada no filme de poliéster recoberto com toner. Estes filmes de poliéster recobertos com toner e os canais recortados são utilizados com partes intermediárias no microchip. A tampa e a base (filmes de poliéster) são laminadas juntamente com as partes intermediárias. Desta forma microchips com canais mais profundos podem ser criados. Microchips com 4 filmes de poliéster (base, tampa, e dois filmes centrais) foram utilizados para realizar dSPE. Estes microchips possuem canais com ~270 μ m de profundidade. A dSPE adaptada para os microchips de PT demonstrou ser capaz de extrair eficientemente DNA (~65%), e o DNA purificado apresentou qualidade suficiente para PCR. A PCR realizada em microchips de PT demonstrou que os dispositivos de PT são compatíveis com os reagentes da PCR e o sucesso da reação de PCR foi demonstrado através da amplificação do fragmento de 520 pares de bases do λ -DNA. A possibilidade de manipular diferentes soluções que são necessárias para realizar a extração e a PCR demonstra o grande potencial desta plataforma para realizar análises genéticas. Além da extração e amplificação, a separação também foi demonstrada nos dispositivos de PT. Duas integrações foram feitas nos microchips de PT, dSPE-PCR e PCR-separação. Na primeira integração a dSPE e PCR foram realizadas em uma única câmara, e a amplificação do fragmento de 520 pb do λ -DNA foi demonstrada. Na segunda integração, o dispositivo foi fabricado com espessuras diferentes para os diferentes domínios. No domínio da PCR as câmaras possuem profundidade de ~270 μ m de profundidade, e para o domínio da eletroforese os canais apresentam 12 μ m de profundidade. A integração realizada sem válvulas foi demonstrada através da amplificação e detecção do fragmento de 520 pb do λ -DNA em um mesmo microchip. Este trabalho demonstra o grande potencial dos microchips de PT para produzir dispositivos descartáveis totalmente integrados para análise genética.

ABSTRACT

Efforts to develop a microfluidic-based total analysis system (μ TAS) have been intense in the scientific community. The goal of achieving a device comprising DNA extraction, amplification, and detection in a single device, a true “lab on a chip,” is driven by the substantial advantages associated with such a device. This Thesis focus on development of methods for DNA analysis on microdevices, that can be associated with μ TAS. Sequentially, the first step was the development of a novel solid-phase extraction technique in which DNA is bound and eluted from magnetic silica beads in a manner that efficiency is dependent on the magnetic manipulation of the beads and not on the flow of solution through a packed bed. The utility of this technique in the isolation of reasonably pure, PCR-amplifiable DNA from complex samples is shown by isolating DNA from whole human blood, and subsequently amplifying a fragment of the β -globin gene. The technique described here is rapid, simple, and efficient, allowing for recovery of more than 60% of DNA from 600 nL of blood at a concentration which is suitable for PCR amplification. The second step was the use of polyester-toner (PT) microchips for DNA analysis (extraction, PCR and separation). The laser-printing of toner onto polyester films has been shown to be effective for generating PT microfluidic devices with channel depths on the order of 12 μ m. We describe a novel and innovative process that allows for the production of multilayer PT microdevices with substantially larger channel depths. Utilizing a CO₂ laser to create the microchannel in polyester sheets containing a uniform layer of printed toner, multilayer devices can easily be constructed by sandwiching the channel layer between uncoated cover sheets of polyester containing precut access holes. The process allows for the fabrication of channels several hundred microns in depth, with ~270 μ m deep microchannels utilized here to demonstrate the effectiveness of multilayer PT microchips for dynamic solid phase extraction (dSPE) and PCR amplification. Dynamic SPE adapted for PT microchip was able to recover more than 65% of DNA from 600 nL of blood and the DNA was compatible with downstream microchip-based PCR amplification. The compatibility of PT microchips was demonstrated by successful amplification of a 520 bp fragment of λ -phage DNA. The ability to handle the diverse chemistries associated with DNA purification and extraction is a testimony to potential utility of PT microchips beyond separations, and presents a promising new platform for genetic analysis that is low cost and easy to fabricate. Two integrations were carrying out on PT microchip, dSPE - PCR and PCR-ME. The first integration was made in a single chamber and the amplification of 520 bp fragment of λ -phage was demonstrated. The second integration describes a process that allows the production of a multidomain microchip with different channel depths for the different domains for genetic analysis. The final device was made by the conventional sandwiching of the four polyester films of the PCR domain with the two polyester films for the electrophoresis domain. The successful valveless integration of PCR and separation was demonstrated by amplification and detection of a 520 bp fragment of λ -phage DNA. This work shows the enormous potential of PT microchips to be used for total genetic analysis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1 - Estrutura da molécula de DNA fita dupla.	17
Figura 1.2 - Perfil típico de ciclos de aquecimento de uma PCR mostrando as três diferentes temperaturas normalmente empregadas.....	28
Figura 1.3 - Desenho esquemático dos componentes de um equipamento de eletroforese capilar.....	30
Figura 2.1 (A) - Imagem de microscopia eletrônica das partículas de Magnesil™ e (B) - Desenho esquemático da formação do movimento de “pinwheel” característico das partículas de MagneSil® na presença de DNA.	39
Figura 2.2 - Desenho esquemático do microdispositivo de vidro.	42
Figura 2.3 (A) - Microchip de vidro utilizado nos experimentos de extração de DNA com fase estacionária empacotada no canal e (B) - Partículas empacotadas no canal e retidas pela barreira.....	45
Figura 2.4 (A) - Microchip de vidro com partículas de MagneSil® no canal microfluídico, (B) - Ampliação da região do canal contendo as partículas de Magnesil® na presença de DNA e (C) - Ampliação da região do canal contendo as partículas de Magnesil na ausência de DNA.....	47
Figura 2.5 (A) - Perfil de eluição a partir de amostra pré-purificada de DNA (preto) e sangue (vermelho) e (B) - Eficiência de extração a partir de amostra pré-purificada de DNA ($n=3$) e sangue ($n=9$).	49
Figura 2.6 (A) - Perfil de eluição da extração de DNA amostras de DNA puro e plasma adicionado DNA e (B) - Eficiência de extração em uma amostra pré-purificada de DNA e eficiência de extração para uma amostra de plasma enriquecida com DNA.	51
Figura 2.7 - Perfil de eluição do DNA extraído a partir de células brancas isoladas do sangue.	52
Figura 2.8 (A) - Perfil de eluição de amostras contendo tamanhos diferentes de fragmentos de DNA (sangue total, DNA pré-purificado e E.Coli e (B) - Eficiência de extração das três extrações.	54
Figura 2.9 - Efeito da sonificação sob eficiência de extração em diferentes amostras.	55
Figura 2.10 - Efeito da sonificação no perfil de eluição de uma amostra de sangue.	56
Figura 2.11 - Efeito a idade da amostra de sangue sob a eficiência de extração. ...	57
Figura 2.12 - Efeito idade da amostra de sangue no perfil de eluição. Em azul a amostra de sangue fresca e em vermelho amostra de sangue após 40 dias da coleta.....	58
Figura 2.13 - Eletroferograma mostrando a amplificação do fragmento de 380 pb do gene β -globina na primeira fração coletada na extração de DNA a partir de uma amostra de sangue usando dSPE.....	60
Figura 3.1 - Representação das etapas do processo de microfabricação. (I) filme de poliéster, (II). filme de poliéster recoberto com toner nos dois lados, (III). canal	

cortado com a cortadora a laser, (IV) alinhamento e laminação das quatro camadas de poliéster (base, tampa com dois furos para acesso aos reservatórios e os dois filmes do meio com os canais recortados).	70
Figura 3.2 - Fotografia dos dispositivos de PT usados para dSPE (A) dispositivo para uma única extração e (B) dispositivos contendo 8 canais para extrações simultâneas de DNA.....	71
Figura 3.3 - Materiais e equipamentos utilizados para a produção do microchip de PT multicamadas.	76
Figura 3.4 - Perfil de eluição de uma extração de DNA a partir de uma amostra de sangue em microchip de PT. (n=3)	78
Figura 3.5 (A) - Perfil de eluição de oito extrações simultâneas no mesmo microchip e (B) - Perfil de eluição médio de oito extrações realizadas simultaneamente em um mesmo microchip. (n=3).....	80
Figura 3.6 - Eficiência de extração para cada um dos oito canais para as 8 extrações simultâneas (n=3) e a média das 24 extrações.	81
Figura 3.7 - Eletroferograma mostrando a amplificação do gene β -globina na primeira fração coletada na extração de DNA a partir de uma amostra de sangue, usando dSPE em microchip de PT.	82
Figura 3.8 (A) - Comparação entre o perfil de eluição de DNA extraído por dSPE em microchip de vidro e em microchip de PT e (B) - Recuperação de DNA nas três primeiras frações eluídas em relação ao total recuperado em microchip de vidro e PT.....	84
Figura 4.1 - Esquema ilustrando os processos que ocorrem na PCR. A) Mostra o perfil de um ciclo de aquecimento típico de uma PCR, contendo B) desnaturação, C) anelamento, e D) extensão da molécula de DNA.	91
Figura 4.2 - Layout do microchip de PT utilizado nos experimentos de IV-PCR. ...	96
Figura 4.3 - Desenho esquemático do sistema de IV-PCR usado neste trabalho... ..	99
Figura 4.4 - Foto do sistema completo de IV-PCR utilizado neste trabalho.	99
Figura 4.5 (A) - Foto do dispositivo usado em IV-PCR com o termopar inserido na câmara de referência e (B) - Foto tirada com microscópio eletrônico (Olympus MIC-D) mostrando o termopar dentro da câmara de referência.	101
Figura 4.6 - Eletroferograma mostrando a amplificação do fragmento de 520 pb do λ DNA em microchip de PT em termociclador de bancada.....	103
Figura 4.7 - Perfil de ciclos de aquecimento mediado por IV em microchip de PT.	104
Figura 4.8 - Eletroferograma mostrando a amplificação do fragmento de 520 pb do λ DNA através da IV-PCR.....	105
Figura 4.9 (A) - Eletroferograma mostrando a amplificação do fragmento de 520 pb do λ DNA contendo PEG na mistura reacional da PCR e (B) - Eletroferograma mostrando a ausência de DNA amplificado pois não foi utilizado PEG na mistura reacional da PCR.	106

Figura 5.1 - Representação das etapas dos processos de microfabricação dos dispositivos. (I). Filme de poliéster, (II). Filme de poliéster impresso com o desenho dos canais, (III). Alinhamento das duas partes, base e topo, (IV). Laminação, (V). Dispositivo pronto com os reservatórios com os reservatórios (a).	117
Figura 5.2 - Layout do microdispositivo de PT. (1). Reservatório da amostra, (2). Reservatório do tampão de corrida, (3) reservatório de descarte da amostra e (4) reservatório de descarte do tampão.....	117
Figura 5.3 - Representação do modo de introdução eletrocinética da amostra. 1, 2, 3 e 4 são respectivamente os reservatórios da amostra, tampão, descarte da amostra e descarte do tampão. AT representa o reservatório onde a alta tensão foi aplicada.....	119
Figura 5.4 - Eletroferograma mostrando a separação de marcador de fragmentos de DNA de 100 pb sob a aplicação de 200 V cm ⁻¹ . O fragmento de 500 pb é cerca de 3× mais concentrado do que os demais fragmentos.	123
Figura 5.5 - Mobilidade do DNA versus tamanho dos fragmentos (pb) sob a aplicação de diferentes campos elétricos.....	125
Figura 5.6 - Linearidade entre o log pb versus log da mobilidade dos fragmentos entre 200 e 1000 pb com r ² = 0,9974.	126
Figura 5.7 - Cinco injeções sequencias da amostra de DNA marcador de tamanho de 100 a 1000 pb em um mesmo microchip e mesma matriz matriz de separação. Em vermelho (primeira injeção), azul (segunda), preto (terceira) e verde (quarta) e roxo (quinta).	129
Figura 5.8 - Eletroferograma mostrando a separação do fragmento de 520 pb no microchip de PT.	130
Figura 6.1 - Layout do microchip de PT utilizado nos experimentos de IV-PCR. .	140
Figura 6.2 - Desenho esquemático das etapas realizadas na integração entre dSPE e IV-PCR em uma mesma câmara em um microchip de PT.....	142
Figura 6.3 - Partes utilizadas para produzir o microchip integrado para PCR-ME. (A) Tampa, (B e C) Partes intermediárias e (D) tampa. 1- reservatório para descarte da amostra, 2 - reservatório para tampão, 3 – reservatório para amostra, 4 – reservatório para descarte do tampão, 5 e 6 reservatórios para PCR.	146
Figura 6.4 - Foto do dispositivo integrado entre PCR e ME mostrando os domínios da PCR, da separação e a região onde é feita a integração entre os dois domínios.	147
Figura 6.5 - Eletroferograma mostrando a amplificação do fragmento de 520 pb do λDNA na presença de partículas de MagneSil®	150
Figura 6.6 - Eletroferograma mostrando a amplificação do fragmento de 520 pb do λDNA no microchip integrado de SPE-PCR em uma mesma câmara.A análise foi realizada no Bioanalyzer.	152
Figura 6.7 - Eletroferograma do controle negativo de partículas de MagneSil® no experimento de integração de SPE-PCR em uma única câmara.....	153
Figura 6.8 - Eletroferograma mostrando a detecção do fragmento de 520 pb do λDNA amplificado na PCR e detectado em um mesmo microchip integrado.....	155

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Comparação da eficiência de extração e concentração de DNA nas duas primeiras frações coletadas entre SPE dinâmica e outros métodos de extração.	59
Tabela 3.1 - Comparação entre microchip de PT e microchip de vidro.	77
Tabela 3.2 - Comparação da eficiência de extração e concentração de DNA nas duas primeiras frações coletadas entre SPE dinâmica em microchip de PT e outros métodos de extração.	85
Tabela 5.1 - Resolução calculada entre os picos, usando a fórmula $R_s = 2\Delta t_m / (W_b^1 + W_b^2)$ sob a aplicação de 200 V cm^{-1}	122
Tabela 5.2 - Eficiência de separação calculada usando a fórmula $N = 5,55 (t_m/W_{h/2})^2$ sob a aplicação de 200 V cm^{-1} no canal de separação.	124

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PCR – Reação em cadeia da polimerase (*polimerase chain reaction*)

SPE – Extração em fase sólida (*solid phase extraction*)

dSPE - Extração dinâmica em fase sólida (*dynamic solid phase extraction*)

GuHCl - hidrocloreto de guanidina

Tris – Tris[hidroximetil]aminometano

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

TE - 1 mol/L Tris / 0,1 mol/L EDTA

pb – pares de base

μTAS – microssistemas de análises totais (*micro total analysis systems*)

PET – poli(etileno tereftalato)

CST – camada simples de toner

CDT – camada dupla de toner

PT – poliéster-toner

dNTP – didesoxinucleotídeos

BSA – albumina sérica bovina (*bovine serum albumin*)

PEG – polietilenoglicol

IV – infravermelho

LIF – fluorescência induzida a laser (*laser induced fluorescence*)

ME – eletroforese em microchip (*microchip electrophoresis*)

HPC – hidroxipropilcelulose

HEC – hidroxietilcelulose

PC – poli(carbonato)

PMMA – poli(metil metacrilato)

PDMS – poli(dimetilsiloxano)

PU – poli(uretana)

EOF – fluxo eletrosmótico (*electroosmotic flow*)

SUMÁRIO

ABSTRACT	VII
CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO GERAL E APRESENTAÇÃO DA TESE.....	16
1.1. INTRODUÇÃO	17
1.2. FABRICAÇÃO DE DISPOSITIVOS MICROFLUÍDICOS	20
1.3. EXTRAÇÃO DE DNA	22
1.3.1 Métodos convencionais de extração de DNA	22
1.3.2 Métodos de extração de DNA em microchips	25
1.4. AMPLIFICAÇÃO DE DNA ATRAVÉS DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	27
1.4.1 PCR em escala convencional	27
1.4.2 PCR em microchip	29
1.5. SEPARAÇÃO ELETROFORÉTICA	29
1.5.1 Separação eletroforética convencional	29
1.5.2 Separação eletroforética em microchip	31
1.6. APRESENTAÇÃO DA TESE	31
REFERÊNCIAS	33
CAPÍTULO 2: EXTRAÇÃO DINÂMICA DE DNA EM FASE SÓLIDA COM PARTÍCULAS MAGNETICAMENTE CONTROLADAS EM MICROCHIP DE VIDRO.....	36
2.1. INTRODUÇÃO.....	37
2.2. OBJETIVO	40
2.3. EXPERIMENTAL	40
2.3.1. Materiais, amostras e reagentes	40
2.3.2. Fabricação do microchip de vidro	41
2.3.3. Preparo das amostras	42
2.3.4. Extração dinâmica de DNA em fase sólida.....	43
2.3.5. Extração de DNA em microchip com a fase sólida estacionária (empacotada no canal)	44
2.3.6. Avaliação da qualidade do DNA extraído através da amplificação do DNA pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	46
2.4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	46
2.4.1. Extração dinâmica de DNA em fase sólida a partir de amostra pré- purificada de DNA e amostra de sangue humano.....	48
2.4.2. Efeito do tamanho dos fragmentos de DNA na eficiência de extração	52
2.4.3. Influência da idade da amostra de sangue sob a eficiência de extração..	56
2.4.4. Comparação entre dSPE e outras técnicas de extração	58
2.4.5. Amplificação através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) do DNA extraído a partir de dSPE	59
2.5. CONCLUSÃO	61
REFERÊNCIAS.....	62
CAPÍTULO 3: EXTRAÇÃO DINÂMICA DE DNA EM FASE SÓLIDA (DSPE) EM MICROCHIP DE POLIÉSTER-TONER (PT).....	64
3.1. INTRODUÇÃO.....	65

3.2.	OBJETIVO	67
3.3.	EXPERIMENTAL	68
3.3.1.	Materiais, amostras e reagentes	68
3.3.2.	Produção dos microdispositivos	69
3.3.3.	Preparo das amostras	71
3.3.4.	Extração dinâmica de DNA em fase sólida (dSPE).....	72
3.3.5.	Avaliação da qualidade do DNA extraído em microchip de PT através da amplificação do DNA pela PCR.....	73
3.4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	74
3.4.1	Produção dos microchips de PT	74
3.4.2	Extração dinâmica de DNA em fase sólida em microchip de PT.....	77
3.4.3	Extrações simultâneas de DNA em um mesmo microchip de PT	79
3.4.4	Avaliação da qualidade do DNA extraído em microchip de PT	81
3.4.5	Comparação entre dSPE em microchip de PT e dSPE em microchip de vidro.....	82
3.4.6	Comparação entre dSPE em microchip de PT e dSPE em microchip de vidro	Er
	ro! Indicador não definido.	
3.5.	CONCLUSÃO	85
	REFERÊNCIAS.....	86
CAPÍTULO 4: AMPLIFICAÇÃO DE DNA VIA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) EM MICROCHIP DE PT		90
4.1.	INTRODUÇÃO.....	91
4.2.	OBJETIVO	94
4.3.	EXPERIMENTAL	95
4.3.1.	Materiais e reagentes	95
4.3.2.	Produção do microchip.....	95
4.3.3.	PCR em termocicladores de bancada.....	97
4.3.4.	IV-PCR em microchip de PT.....	98
4.4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	101
4.4.1.	PCR em termocicladores de bancada.....	102
4.4.2.	IV-PCR em microchip de PT.....	103
4.5.	CONCLUSÃO	107
	REFERÊNCIAS.....	108
CAPÍTULO 5: SEPARAÇÃO ELETROFORÉTICA DE DNA EM MICROCHIP DE POLIÉSTER-TONER (PT).....		111
5.1.	INTRODUÇÃO.....	112
5.2.	OBJETIVO	115
5.3.	EXPERIMENTAL	116
5.3.1.	Produção do dispositivo de PT	116
5.3.2.	Separação eletroforética de um padrão de DNA de 100 a 1000 pb	118
5.3.3.	Deteção de um fragmento de 520 pb amplificado por PCR	120
5.4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	121
5.4.1.	Separação do padrão de DNA de 100 a 1000 pb	121
5.4.2.	Eficiência de separação	123
5.4.3.	Influência do campo elétrico na mobilidade	125

5.4.4. Linearidade.....	126
5.4.5. Injeções sequenciais da amostra em mesmo chip e mesma matriz ...	127
5.4.6. Separação de um fragmento de DNA produto de uma reação de PCR	129
5.5. CONCLUSÃO	131
REFERÊNCIAS.....	131
CAPÍTULO 6: DISPOSITIVOS INTEGRADOS DE PT PARA ANÁLISES GENÉTICAS	135
6.1. INTRODUÇÃO.....	136
6.2. OBJETIVO	138
6.3. EXPERIMENTAL.....	139
6.3.1. Materiais e reagentes	139
6.3.2. Integração das etapas de dSPE e IV-PCR em um única câmara reacional (single chamber).....	140
6.3.3. Integração sem válvula entre as etapas de IV-PCR e eletroforese em microchip (ME)	145
6.3.4. Procedimento experimental da integração entre as etapas de IV-PCR e eletroforese em microchip (ME).....	147
6.4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	149
6.4.1. Compatibilidade das partículas de MagneSil® com os reagentes da PCR.....	150
6.4.2. dSPE e IV-PCR em uma única câmara reacional	151
6.4.3. Integração entre as etapas de IV-PCR e ME	153
6.5. CONCLUSÃO	156
REFERÊNCIAS.....	157

Capítulo 1: Introdução Geral e Apresentação da Tese

1.1. INTRODUÇÃO

O foco principal desta Tese é a realização de análises genéticas em plataformas microfluídicas que podem ser utilizadas tanto para diagnósticos clínicos quanto para identificação humana, através da análise de DNA. Do ponto de vista químico, o DNA é um longo polímero constituído de unidades simples chamadas monômeros. Cada monômero consiste de um açúcar, um grupo fosfato e uma das quatro bases, adenina (A), guanina (G), timina (T) ou citosina (C). Watson e Crick¹ foram os primeiros a determinarem a estrutura de dupla hélice do DNA e descobriram que o DNA consiste de duas fitas antiparalelas. Na Figura 1.1 a estrutura química do DNA é mostrada por um fragmento de DNA fita dupla. A estrutura externa do DNA é formada por açúcares e fosfatos. Os açúcares são unidos por grupos fosfatos que formam ligações fosfodiéster com os átomos de carbono dos anéis de açúcar adjacentes. Do lado de dentro da hélice estão as bases que se ligam em pares, a adenina (A) se liga especificamente com a timina (T) e a guanina (G) com a citosina (C)²⁻⁴.

Figura 1.1 - Estrutura da molécula de DNA fita dupla.

O DNA é uma cadeia de 2,0 a 2,4 nanômetros de diâmetro e a distância entre as duas bases é de 0,34 nm. Cada 10 pares de base ou 3,4 nm forma uma volta completa da hélice. A dupla hélice do DNA é estabilizada por ligações de hidrogênio entre as bases presas às duas fitas e as interações hidrofóbicas entre as bases adjacentes. Cada grupo fosfato externo à molécula DNA possui carga negativa, porém a densidade efetiva de carga é consideravelmente baixa devido a neutralização de cargas por interações eletrostáticas⁵.

Cada vez mais as comunidades clínicas e forenses buscam novos caminhos para melhorar as análises de DNA para identificação de seres humanos e diagnósticos de doenças, de forma que se torne mais rápida, eficiente e produza resultados confiáveis. Nesse sentido, a busca por novas plataformas para análise de DNA têm sido cada vez mais crescente⁶. Atualmente, sistemas microfluídicos se tornaram uma ferramenta analítica poderosa para análise de DNA tanto para diagnóstico clínico quanto para análise forense. A extração⁷⁻¹⁰, amplificação¹¹⁻¹⁴ e separação¹⁵⁻¹⁷ de DNA já são realizadas em plataformas miniaturizadas. Com o sucesso da adaptação destes processos em dispositivos microfluídicos, os quais já estão razoavelmente bem estabelecidos em microchips (em particular em microchips de vidro), as pesquisas atuais têm focado na integração destas etapas e na busca de novos materiais para produção dos dispositivos. Devido a natureza de múltiplas etapas da análise de DNA, algumas considerações importantes devem ser levadas em conta, como compatibilidade das soluções, tamanho da amostra e interfaceamento fluídico, para a produção de microsistemas de análises totais (*micro total analysis systems*, μ TAS), também chamados de *lab-on-a-chip*. Desta forma, tem-se dado atenção não só a busca de novos materiais para a produção

mais simples de microchips, mas também ao desenvolvimento de novos *desings* e arquitetura dos dispositivos.

Plataformas microfluídicas oferecem soluções para muitos problemas que afetam as análises genéticas tradicionais, tanto para aplicações forenses quanto para aplicações em diagnóstico clínico. Primeiramente, as análises genéticas requerem múltiplas etapas analíticas e consomem muito tempo, além de utilizar múltiplos instrumentos e manipulação das soluções entre as etapas. A manipulação manual das soluções entre as etapas cria diversas oportunidades de contaminação ou perda da amostra. Sistemas microfluídicos integrados apresentam a oportunidade de automatização da manipulação das soluções, reduzindo o contato manual com a amostra. Além da redução do tempo e custo necessário para realizar todas as etapas em dispositivos microfluídicos, a redução da quantidade de amostra necessária para análise é uma das grandes vantagens, inerente ao uso de plataformas miniaturizadas.

Embora os microchips já sejam usados para realizar uma variedade de processos analíticos, esta Tese foca no desenvolvimento de um novo método de purificação de DNA em fase sólida em sistemas microfluídicos, realizada tanto isoladamente quanto integrada com outras etapas da análise genética, além do desenvolvimento de novas arquiteturas do microchip de poliéster-toner (PT) para ser utilizado como plataforma para realização de análises genéticas.

1.2. FABRICAÇÃO DE DISPOSITIVOS MICROFLUÍDICOS

Os experimentos desta Tese utilizaram dois substratos diferentes para a produção dos microchips. Primeiramente para o desenvolvimento do método de extração de DNA em fase sólida com partículas magneticamente controladas, chamado de “dynamic SPE” (dSPE), utilizou-se microchip de vidro¹⁸. Para a produção do microchip de vidro utilizou-se métodos padrão de litografia ótica. A palavra litografia (*lito*: pedra; *grafia*: escrita) se refere ao processo inventado em 1796 por Aloys Senefelder para transferência de imagens de pedra para o papel¹⁹. Atualmente, a litografia é utilizada para designar qualquer processo de gravação de imagens sob um substrato. A litografia com radiação UV, por ser um método óptico, é comumente denominada de fotolitografia com radiação UV e é o método litográfico mais utilizado na fabricação de microdispositivos. A fotolitografia se resume à fotogração de imagens (preparadas em uma máscara) em um substrato a partir da exposição à radiação UV, tornando possível a obtenção de microestruturas.

A fotolitografia funciona projetando-se luz através de uma máscara, para se produzir padrões sobre um substrato recoberto quimicamente. A luz altera a estrutura química do recobrimento do substrato (fotorresiste). Dependendo do tipo de fotolitografia, ou o padrão projetado ou a sua sombra, são retirados do substrato no passo subsequente. Mas o resultado final é sempre um padrão gravado sobre esse substrato.

O processo de gravação de imagens através da fotolitografia se resume nas seguintes etapas: 1) limpeza do substrato, 2) recobrimento com uma camada de fotorresiste através do spinning, 3) exposição à radiação UV e 4) revelação.

Os fotorresistes utilizados no processo fotolitográfico são classificados como negativos ou positivos e são polímeros orgânicos de alta massa molecular. Se a

área exposta à radiação permanecer intacta após a revelação com o solvente, e a área não-irradiada for removida com um solvente apropriado, conhecido como revelador, o resiste é denominado de fotorresiste negativo. Se área exposta à radiação for dissolvida em um solvente orgânico que não remove a área não irradiada o resiste é denominado de fotorresiste positivo¹⁹.

Além do dispositivo de vidro, utilizaram-se também microchips de poliéster-toner (PT) para desenvolver métodos de extração, amplificação e separação de DNA. O processo de fabricação dos microdispositivos de poliéster-toner é um processo alternativo para a produção de dispositivos de baixo custo proposto por Lago e colaboradores em 2003²⁰. O processo de impressão direta baseia-se na impressão de padrões de imagem em um filme de poliéster (uma transparência de retroprojeção) seguido de uma etapa de laminação. O desenho das estruturas a serem produzidas podem ser feitos usando *softwares* como *Corel Draw* ou *AutoCad*. A estrutura desejada é criada na transparência com o auxílio do toner, através de uma impressora a laser. O toner é composto por uma base polimérica, contendo poliestireno e poli(metilmetacrilato) (45-55%) além de óxido de ferro (45-55%). O filme de poliéster é composto de polietileno tereftalato (PET) revestido com uma camada de sílica²⁰. A estrutura dos microcanais no dispositivo microfluídico é definida por filmes de poliéster e toner, sendo a base dos canais constituída pelo filme de poliéster e as paredes pelo toner. O método de fabricação dos microchips de PT desenvolvido por Lago representa um dos mais simples e baratos métodos de produção de dispositivos microfluídicos.

O trabalho desenvolvido nesta Tese utilizou pela primeira vez os microchips de PT para realizar as etapas das análises genéticas, que são: extração, amplificação e separação de DNA. Inicialmente as etapas foram realizadas

isoladamente e depois de forma integrada. Nesse sentido, será feito a seguir uma breve introdução sobre cada uma destas etapas, primeiramente como é feito no formato convencional e em seguida como é no formato de microchip.

1.3. EXTRAÇÃO DE DNA

1.3.1 Métodos convencionais de extração de DNA

Embora exista um grande número de métodos empregados para extração de DNA a partir de amostras biológicas, as análises convencionais clínicas e forenses utilizam basicamente três técnicas: extração orgânica (mais comumente utilizada), purificação com a resina Chelex[®] e o uso de cartões FTATM⁶. A extração orgânica é realizada através da adição sequencial de vários diferentes reagentes e múltiplas etapas de centrifugação. Brevemente, um detergente (dodecilsulfato de sódio (SDS)) e proteinase K são adicionados para lisar as células e liberar as proteínas. Para completar a lise das células, uma mistura de fenol/clorofórmio é adicionada para separar as proteínas lisadas dos ácidos nucleicos⁶. O DNA é mais solúvel na porção aquosa da mistura e permanece nesta, enquanto as proteínas são mais solúveis na fase orgânica. Após a centrifugação, as duas fases são separadas e os ácidos nucleicos purificados encontram-se na fase aquosa.

O uso da resina Chelex[®] para purificação de DNA foi feito pela primeira vez em 1992 e envolve o uso de uma resina de troca iônica adicionada diretamente na amostra²¹. Para este método de purificação, uma suspensão de 5% de Chelex[®] é adicionada na amostra e aquecida até ebulição para lise das células. Após a centrifugação, o sobrenadante é removido e utilizado diretamente nas reações de amplificação por PCR.

O terceiro método comumente utilizado, o cartão de FTATM foi desenvolvido por Burgoyne²² em 1994. De acordo com que a amostra entra em contato com papel de celulose, os reagentes químicos presentes no papel previnem a degradação do DNA e preservam a amostra do crescimento de bactérias. Além disso, as células são lisadas e imobilizadas na matriz do papel. Após a imobilização, o papel pode ser estocado por um longo período de tempo ou um pequeno pedaço do papel contendo a amostra lisada pode ser recortado e usado para purificação. A etapa de purificação requer uma simples lavagem com água para remoção dos inibidores e contaminantes e subsequentemente o pedaço de papel pode ser usado diretamente na amplificação¹.

Os dois últimos métodos (Chelex[®] e cartões FTATM) envolvem a ligação das moléculas de DNA em uma fase sólida, enquanto o primeiro trata-se de uma extração líquido-líquido. Todos estes métodos são utilizados com sucesso para purificação de DNA de alto peso molecular tanto para análises clínicas quanto para análises forenses; entretanto apresentam alguns inconvenientes, principalmente para a conversão para o formato microfluídico. Em particular, a extração orgânica requer um longo tempo, utiliza reagentes tóxicos e necessita de várias transferências entre tubos, aumentando o risco de contaminação. Na extração com Chelex[®], se muita amostra é utilizada pode ocorrer inibição na etapa subsequente (PCR). No método usando cartões FTATM, o pedaço de papel contendo a amostra frequentemente “salta” do tubo devido a eletricidade estática durante o processamento da amostra, causando problemas de contaminação. Além disso, embora dois dos métodos de purificação discutidos acima sejam realizados em fase sólida, eles requerem múltiplas etapas de agitação em *vortex*, centrifugação e transferências da amostra, fazendo que estes métodos sejam laboriosos e consumam muito tempo.

Recentemente, foram desenvolvidas técnicas de purificação de DNA que utilizam sílica como fase sólida, reduzindo o tempo total da extração enquanto mantém a pureza e integridade da amostra. Além disso, estes métodos são mais facilmente adaptados para plataformas microfluídicas. As partículas de sílica podem ser facilmente empacotadas em canais microfluídicos para criar uma coluna de fase sólida para purificação de DNA.

Nos métodos que utilizam sílica como fase sólida para purificação de DNA, a adsorção das moléculas de DNA nas partículas de sílica é feita na presença de um sal caotrópico, seguida pela eluição das proteínas com isopropanol ou etanol e a subsequente eluição das moléculas de DNA com água ou tampão apropriado. Estes métodos encontram-se bem estabelecidos em escala convencional (macroescala) e já existem trabalhos mostrando o uso de sílica como fase sólida para extração de DNA em microescala (microchips)^{23,24}. Quando adaptado para o formato microfluídico, este método representa um novo caminho para purificação de DNA sem a necessidade de mudanças significativas no princípio do método, que envolve as principais etapas: adsorção das moléculas de DNA na fase sólida, lavagem com isopropanol (para retiradas das proteínas e impurezas) e eluição do DNA purificado da fase sólida. Todas as soluções são levadas através do microchip com o auxílio de bomba seringa.

1.3.2 Métodos de extração de DNA em microchips

A primeira extração de DNA em fase sólida (SPE) em microchip foi realizada por Christel *et al.*²⁵ em 1999. Neste trabalho, foi utilizado um microchip contendo pilares para aumentar a razão área/volume da superfície e assim aumentar a adsorção das moléculas de DNA. Embora esta tenha sido a primeira vez que um microchip foi utilizado para purificação e concentração de DNA, o método sofisticado de fabricação para produzir os pilares limitou a potencialidade do uso desta plataforma para purificação de DNA. Além disso, a recuperação do método usando λ DNA pré-purificado foi apenas 50%, o que é consideravelmente menor do que o esperado para o método que utiliza partículas de sílica como fase sólida, especialmente partindo de uma amostra que não contém proteínas e dejetos celulares (como o sangue). Este microchip, entretanto, representa o primeiro exemplo de uma purificação de DNA realizada em um formato miniaturizado e representou o passo inicial para o desenvolvimento de outros métodos de extração de DNA em microchip.

Uma adaptação mais direta dos métodos baseados no uso de sílica como fase sólida para purificação de DNA em formato miniaturizado foi realizada pelo grupo do Prof. Landers. Este tipo de extração foi realizada no formato miniaturizado pela primeira vez em capilar, para demonstrar a utilidade do uso do método em microescala. Tian *et al.*²⁶ empregaram um capilar como câmara de 500 nL empacotado com partículas de sílica e obtiveram DNA adequado para amplificação com a PCR (remoção de 80 – 90% das proteínas) a partir de células brancas com alta eficiência (70%). Este trabalho demonstrou a grande aplicabilidade da extração em fase sólida em formato miniaturizado a partir de uma variedade de amostras biológicas (células brancas, cultura de células e sangue total).

A técnica de extração em microescala desenvolvida por Tian foi então extrapolada para o formato de microchip por Wolfe *et al.*²⁴ que utilizou sílica e sol-gel como fase sólida para extração de DNA. Neste trabalho, os problemas associados com o empacotamento das partículas em um canal microfluídico foram evidenciados. A tendência das partículas em se tornarem cada vez mais empacotadas pela passagem do fluxo das soluções após o uso repetido afeta a reprodutibilidade e repetibilidade das extrações. Alternativamente, o uso de sol-gel (suspensão de sílica coloidal) demonstrou ser eficiente e reutilizável para extrações subsequentes. As soluções são simplesmente levadas para dentro da câmara com o auxílio de uma bomba seringa na forma líquida e o gel poroso é formado posteriormente dentro da câmara é usado como uma coluna de fase sólida para extração de DNA. A reação de catálise da formação do gel pode ser controlada para criar poros com área superficial suficientemente grande para a adsorção eficiente de DNA, como demonstrado por Wu *et al.*⁹, que obteve uma eficiência de extração de 65% a partir de uma amostra de sangue.

Em seguida, Breadmore *et al.*⁸ otimizaram a taxa do fluxo, o pH das soluções e realizaram a purificação de DNA a partir de sangue total em 15 minutos com eficiência de 79%. O uso da extração em fase sólida para extração de DNA em microchips foi demonstrada também a partir de células de esperma⁷ o que evidenciou o potencial do método de extração para análises forenses.

Até o presente momento, todos os métodos de extração em fase sólida baseados no uso de partículas de sílica, utilizaram as partículas empacotadas em um canal, fazendo uma coluna estática de fase sólida para purificação de DNA. Esta Tese apresenta o desenvolvimento de um novo método de extração que utiliza partículas magnéticas de sílica controladas magneticamente. A diferença principal

entre os métodos já publicados e o método desenvolvido neste trabalho é a não necessidade do empacotamento da fase sólida, uma vez que a fase sólida neste caso é “dinâmica” e permanece em movimento durante o processo de extração através da aplicação de um campo magnético. O desenvolvimento do método é descrito no Capítulo 2 sendo utilizado primeiramente o microchip de vidro. Posteriormente o método foi adaptado para os microchips de PT, e os resultados encontram-se no Capítulo 3.

1.4. AMPLIFICAÇÃO DE DNA ATRAVÉS DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

1.4.1 PCR em escala convencional

A PCR, um processo enzimático em que uma região específica do DNA é replicada repetidamente para produzir um grande número de cópias de uma sequência particular, foi descrita pela primeira vez por Mullis *et al.*²⁷ em 1985. O processo de amplificação envolve o aquecimento e resfriamento (termociclo) da amostra utilizando um controle preciso da temperatura, tipicamente através de três patamares de temperaturas, como descrito na Figura 1.2. Primeiramente, a desnaturação do DNA (94 °C), em seguida o anelamento específico do primer (~60 °C) e por fim a extensão do fragmento (~72 °C).

Figura 1.2 - Perfil típico de ciclos de aquecimento de uma PCR mostrando as três diferentes temperaturas normalmente empregadas.

Os ciclos de aquecimento podem ser feitos utilizando diferentes fontes de aquecimento. Os sistemas convencionais utilizam blocos metálicos que são aquecidos e resfriados de forma a aquecer e resfriar o tubo que contém os reagentes para PCR. Este aquecimento indireto, combinado com o grande volume utilizado nos tubos reacionais (10 – 50 μL), limita as taxas de aquecimento e resfriamento e resulta em um longo tempo de amplificação (1 – 2 horas). A reação em cadeia da polimerase é, teoricamente, uma amplificação exponencial do fragmento de interesse em que após cada ciclo o número de fragmentos é dobrado, sendo produzido aproximadamente 30 bilhões de cópias do fragmento de interesse⁶. Entretanto, o DNA molde utilizado na reação de PCR deve ser livre de contaminantes que interferem na ação da enzima *polimerase* e de outros reagentes necessários para a reação da PCR ocorrer. Consequentemente, a etapa de purificação da amostra é essencial para garantir que o DNA molde seja livre de contaminantes e apropriado para a reação enzimática de amplificação.

1.4.2 PCR em microchip

A miniaturização do recipiente da amostra proporciona um mecanismo para diminuição do tempo total da reação de amplificação, através do aumento da razão área/volume da superfície. O uso de microchips para realizar as reações de PCR proporciona homogeneidade da temperatura da solução que pode ser aquecida e resfriada rapidamente, reduzindo o tempo de cada ciclo e o tempo total da reação. Além disso, o uso de microchips para a PCR proporciona o uso de diferentes formas de aquecimento. Alguns grupos^{11,14,28,29}, utilizaram métodos de aquecimento diretamente no microchip para produzir os ciclos de aquecimento, similar àqueles utilizados em termocicladores de bancada. O grupo do Prof. Landers utilizou além do método convencional de aquecimento um novo método indireto de aquecimento para aquecer e resfriar a solução, produzindo análises mais rápidas. Este método utiliza radiação de infravermelho próximo para seletivamente aquecer a solução^{12,13,30} através dos modos vibracionais de excitação das moléculas de água. Com isso, o tempo necessário para aquecer a solução é diminuído, resultando na diminuição do tempo total da amplificação. Este modo de aquecimento foi utilizado nos experimentos de amplificação de DNA em microchip de PT que encontra-se no Capítulo 4.

1.5. SEPARAÇÃO ELETROFORÉTICA

1.5.1 Separação eletroforética convencional

Historicamente, a separação eletroforética de DNA para aplicações clínicas e forenses envolve o uso da eletroforese em gel^{1,31}. Gel de agarose ou poliacrilamida com tamanho de poros controlados são usados para proporcionar separações de DNA com alta resolução, permitindo a separação de várias amostras simultaneamente, entretando, existem vários inconvenientes desta técnica. Os géis

levam muito tempo para serem preparados, o tempo para separação é longo além de requer extensiva manipulação manual⁶. Atualmente a separação eletroforética de DNA é realizada em capilares ao invés de placa de gel na maioria das análises de rotina.

Basicamente, a eletroforese capilar utiliza um capilar de vidro, dois frascos contendo tampão e dois eletrodos conectados à uma fonte de alta tensão, como descrito na Figura 1.3. A separação eletroforética das moléculas de DNA com alta resolução é realizada com uma coluna contendo a matriz polimérica.

Figura 1.3 - Desenho esquemático dos componentes de um equipamento de eletroforese capilar.

Devido a razão carga/tamanho das moléculas de DNA serem constantes para qualquer tamanho de DNA, as moléculas de DNA são separadas com base no tamanho, migrando através de uma matriz polimérica porosa, que funciona como uma “peneira”. Desta forma, as moléculas maiores sofrem maiores impedimentos para sua passagem e demoram mais tempo para percorrer a matriz polimérica, enquanto as moléculas menores movem-se mais rapidamente devido ao menor impedimento à passagem das moléculas. Sendo assim, os fragmentos de DNA,

marcados fluorescentemente, são separados por tamanho e podem ser detectados com um detector de fluorescência induzida a laser (LIF)⁶. A eletroforese capilar oferece inúmeras vantagens à eletroforese em placa, incluindo a habilidade de automatizar a injeção, separação e detecção e realizar análises rápidas, e atualmente é considerado um método eficiente de separação e detecção de ácidos nucleicos.

1.5.2 Separação eletroforética em microchip

Talvez uma das adaptações de maior sucesso da escala convencional para o formato miniaturizado seja a separação eletroforética. A eletroforese em microchip (ME) é realizada da mesma forma que na eletroforese capilar. Uma matriz polimérica é inserida no canal microfluídico no microchip e eletrodos inseridos nos reservatórios aplicam a voltagem desejada. A eletroforese em microchip é atualmente utilizada para aplicações clínicas^{15,16,17,32} e forenses³³ e o grande sucesso da transição para o formato microfluídico se deve em grande parte à similaridade com os métodos em escala convencional. A separação eletroforética de DNA foi realizada neste trabalho em microchips de PT e os resultados encontram-se no Capítulo 5.

1.6. APRESENTAÇÃO DA TESE

Esta Tese está dividida em seis Capítulos que apresentam estrutura completa (Introdução, Objetivos, Experimental, Resultados e Discussões, Conclusão e Referências), os quais apresentam métodos desenvolvidos para análises genéticas em microchips. Os assuntos abordados na Tese tratam da extração, amplificação e separação de DNA, primeiramente realizadas individualmente nos microchips e em

seguida a integração destas etapas. A seguir é dada uma sinopse do assunto abordado em cada Capítulo.

Capítulo 1: **Introdução Geral e estruturação da Tese** - apresenta uma introdução geral dos métodos utilizados em análise genética que são utilizados nesta Tese, comparando a escala convencional com o formato miniaturizado.

Capítulo 2: **Extração dinâmica de DNA em fase sólida com partículas magneticamente controladas em microchip de vidro** – este capítulo mostra o desenvolvimento de um novo método de extração em fase sólida que utiliza partículas magneticamente controladas para purificação de DNA, desenvolvido em microchip de vidro.

Capítulo 3: **Extração dinâmica de DNA em fase sólida (dSPE) em microchip de Poliéster-Toner (PT)** – este capítulo apresenta pela primeira vez o uso de microchips de PT para realizar extração de DNA em fase sólida. Uma nova arquitetura dos microchips de PT foi desenvolvida para possibilitar o uso desta plataforma para extração em fase sólida e é mostrada neste capítulo. O método de extração desenvolvido para os microchips de vidro foi adaptado para os microchips de PT.

Capítulo 4: **Amplificação de DNA via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em microchip de PT** – este capítulo mostra o uso do microchips de PT para realizar a PCR, demonstrando que a plataforma é compatível com os reagentes da PCR e com a utilização do aquecimento mediado por radiação infravermelha para produzir os ciclos de aquecimento.

Capítulo 5: **Separação eletroforética de DNA em microchip de Poliéster-Toner (PT)** – este capítulo mostra o uso de microchips de PT para realizar a

separação eletroforética de DNA, tanto de uma amostra padrão de tamanho de DNA quanto de uma amostra produto de uma reação de PCR.

Capítulo 6: **Dispositivos integrados de PT para análises genéticas** – este capítulo final mostra os avanços em direção a produção de um microchip de PT totalmente integrado para análises genéticas, através da integração entre as etapas de extração e amplificação e das etapas de amplificação e separação.

REFERÊNCIAS

1. WATSON, D. J.; CRICK F. H. C. Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid, **Nature**, v.171, n. 4356, p.737-738, 1953.
2. ZAHA, A. **Biologia molecular básica**. Porto Alegre: Mercado Aberto, 1996. p.13-62.
3. SMITH, C. A.; WOOD, E.J. **Molecular biology and biotechnology**: molecular and cell biochemistry. London: Chapman & Hall, 1991. p.1-16.
4. ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Molecular biology of the cell**. 3. ed. New York: Garland, 1994, p. 1294.
5. STORM, Arnoulds Jan. **Single molecule experiments on DNA with novel silicom nanostructures**. 2004. 125f. Tese (Doutorado), Delft University of Technology, Holanda, 2004.
6. BUTLER, J. M. **Forensic DNA typing**: biology and technology behind STR markers. 2 ed. San Diego: Academic Presss, 2001. 311p.
7. BIENVENUE, J. M.; DUNCALF, N.; MARCHIARULLO, D.; FERRANCE, J. P.; LANDERS, J. P. Microchip-based cell lysis and DNA extraction from sperm cells for application to forensic analysis. **Journal of Forensic Sciences**, v. 51, n. 2, p. 266-273, 2006.
8. BREADMORE, M. C.; WOLFE, K. A.; ARCIBAL, I. G.; LEUNG, W. K.; DICKSON, D.; GIORDANO, B. C.; POWER, M. E.; FERRANCE, J. P.; FELDMAN, S. H.; NORRIS, P. M.; LANDERS, J. P. Microchip-Based Purification of DNA from Biological Samples. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 8, p. 1880-1886, 2003.
9. WU, Q. R.; BIENVENUE, J. M.; HASSAN, B. J.; KWOK, Y. C.; GIORDANO, B. C.; NORRIS, P. M.; LANDERS, J. P.; FERRANCE, J. P. Microchip-based macroporous silica sol-gel monolith for efficient isolation of DNA from clinical samples. **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 16, p. 5704-5710, 2006.

10. CADY, N. C.; STELICK, S.; BATT, C. A. Nucleic acid purification using microfabricated silicon structures. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 19, n. 1, p. 59-66, 2003.
11. KOOP, M. U.; MELLO, A. J.; MANZ, A. Chemical amplification: continuous-flow PCR on a chip. **Science**, v. 280, n. 5366, p. 1046-1048, 1998.
12. HÜHMER, A.; LANDERS, J. P. Noncontact infrared-mediated thermocycling for effective polymerase chain reaction amplification of DNA in nanoliter volumes. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 21, p. 5507-5512, 2000.
13. GIORDANO, B. C.; FERRANCE, J. P.; SWEDBERG, S.; HÜHMER, A.; LANDERS, J. P. Polymerase chain reaction in polymeric microchips: DNA amplification in less than 240 seconds. **Analytical Biochemistry**, v. 291, n. 1, p. 124-132, 2001.
14. HASHIMOTO, M.; CHEN, P. C.; MITCHELL, M. W.; NIKITOPOULOS, D. E.; SOPER, S. A.; MURPHY, M. C. Rapid PCR in a continuous flow device. **Lab on a Chip**, v. 4, n. 6, p. 638-645, 2004.
15. CHEN, Y. H.; WANG, W. C.; YOUNG, K. C.; CHANG, T. T.; CHEN, S. H. Plastic microchip electrophoresis for analysis of PCR products of hepatitis C virus. **Clinical Chemistry**, v. 45, p. 1938-1943.
16. WOOLLEY, A. T.; MATHIES, R. A. Ultra-high-speed DNA fragment separations using microfabricated capillary array electrophoresis chips. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, p. 11348-11352, 1994.
17. EFFENHAUSER, C. S.; PAULUS A.; MANZ, A.; WIDMER, H. M. High-speed separation of antisense oligonucleotides on a micromachined capillary electrophoresis device. **Analytical Chemistry**, v. 66, p. 2949-2953, 1994.
18. DUARTE, G. R. M.; PRICE, C. W.; LITTLEWOOD, J. L.; HAVERSTICK, D. M. FERRANCE, J. P.; CARRILHO, E.; LANDERS, J. P. Characterization of dynamic solid phase DNA extraction from blood with magnetically controlled silica beads, **Analyst**, v. 135, n. 3, p. 531-537, 2010.
19. MADOU, M. J. **Fundamentals of microfabrication: The Science of Miniaturization**. 2.ed., Boca Raton: CRC Press, 2002. 589 p.
20. DO LAGO, C. L.; SILVA, H. D. T.; NEVES, C. A.; BRITO-NETO, J. G. A.; SILVA, J. A. F. A dry process for production devices base on the lamination of laser-printed polyester films. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 15, p. 3853-3858, 2003.
21. WALSH, P. S.; VARLARO, J.; REYNOLDS, R. A rapid chemiluminescent method for quantitation of human DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 20, n. 19, p. 5061-5065, 1992.
22. BURGOYNE, L.; KIJAS, J.; HALLSWOTH, P.; TUNER, J.; MADISON, WISCONSIN. Cost-effectiveness in sample processing using the FTATM treated stain card for high throughput. **Promega Corporation**, 163, 1994.
23. BREADMORE, M. C.; WOLFE, K. A.; ARCIBAL, I. G.; LEUNG, W. K.; DICKSON, D.; GIORDANO, B. C.; POWER, M. E.; FERRANCE, J. P.; FELDMAN, S. H.;

NORRIS, P. M.; LANDERS, J. P. Microchip-based purification of DNA from biological samples. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 8, p. 1880-1886, 2003.

24. WOLFE, K. A.; BREADMORE, M. C.; FERRANCE, J. P.; POWER, M. E.; CONROY, J. F.; NORRIS, P. M.; LANDERS, J. P. Toward a microchip-based solid-phase extraction method for isolation of nucleic acids. **Electrophoresis**, v. 23, n. 5, p. 727-733, 2002.

25. CHRISTEL, L. A.; PETERSEN, K.; McMILLAN, W.; NORTHRUP, M. A. Rapid, automated nucleic acid probe assays using silicon microstructures for nucleic acid concentration. **Journal of Biomechanical Engineering**, v. 121, n. 1, p. 22-27, 1999.

26. TIAN, H.; HUHMER, A. F.; LANDERS, J. P. Evaluation of silica resins for direct and efficient extraction of DNA from complex biological matrices in a miniaturized format. **Analytical Biochemistry**, v. 283, n. 2, p. 175-191, 2000.

27. MULLIS, K.; FALOONA, F.; SCHARF, S.; SAIKI, R.; HORNA, G.; ERLICH, H. Genetic diagnosis - development of new methodologies: specific enzymatic amplification of DNA In vitro: the polymerase chain reaction. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 51, p. 263-273, 1986.

28. LAGALLY, E. T.; SCHERER, J. R.; BLAZEJ, R. G.; TORIELLO, N. M.; DIEP, B. A.; RAMCHANDANI, M.; SENSABAUGH, G. F.; RILEY, L. W.; MATHIES, R. A. Integrated portable genetic analysis microsystem for pathogen/infectious disease detection. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 11, p. 3162-3170, 2004.

29. KRISHNAN, M.; AGRAWAL, N.; BURNS, M. A.; UGAZ, V. M. Reactions and fluidics in miniaturized natural convection systems. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 21, p. 6254-6265, 2004.

30. ODA, R.; STRAUSBAUCH, M.; BORSON, N.; HÜHMER, A.; JURRENS, S.; CRAIGHEAD, J.; WETTSTEIN, P.; ECKLOFF, B.; KLINE, B.; LANDERS, J. P. Infrared-mediated thermocycling for ultrafast polymerase chain reaction amplification of DNA. **Analytical Chemistry**, v. 70, n. 20, p. 4361-4368, 1998.

31. LANDERS, J. P. **Handbook of capillary and microchip electrophoresis and associated microtechniques**. 3. ed. New York: CRC, 2007. 1564p.

32. SCHMALZING, D.; BELENKY, A.; NOVOTNY, M. A.; KOUTNY, L.; SALAS-SOLANO, O.; EL-DIFRAWY, S.; ADOURIAN, A.; MATSUDAIRA, P.; EHRLICH, D. Microchip electrophoresis: a method for high-speed SNP detection. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 9, p. e-43, 2000.

33. YEUNG, S. H. I.; GREENSPOON, S. A.; MCGUCKIAN, A.; CROUSE, C. A.; EMRICH, C. A.; BAN, J.; MATHIES, R. A. Rapid and high-throughput forensic short tandem repeat typing using a 96-lane microfabricated capillary array electrophoresis microdevice. **Journal Forensic Science**, v. 51, n. 4, p.740-747, 2006.

Capítulo 2: Extração dinâmica de DNA em fase sólida com partículas magneticamente controladas em microchip de vidro

2.1. INTRODUÇÃO

A extração eficiente de DNA de amostras biológicas é uma etapa crucial para pesquisas biomédicas, clínicas e para diagnósticos clínicos¹. Para isso é necessário isolar o DNA de componentes celulares ou extracelulares que podem inibir análises posteriores, como a PCR. Vários tipos de métodos de extração são utilizados para esta proposta, incluindo extração orgânica (fenol/clorofórmio), purificação com Chelex[®], ou purificação com o uso do cartão FTA², como descrito no Capítulo 1. Como já discutido, estes métodos embora sejam efetivos para a extração de DNA de alto peso molecular, requerem múltiplas etapas de agitação, centrifugação e transferência da solução.

Recentemente, foram desenvolvidos métodos de purificação de DNA em macro-escala baseados na adsorção do DNA em fase sólida, reduzindo o tempo de extração enquanto mantém boa eficiência de extração, pureza e integridade do DNA extraído^{3,4}. Estes métodos de extração em fase sólida (SPE) proporcionam uma forte interação entre o DNA e o suporte sólido, usualmente envolvendo ligações de hidrogênio ou eletrostática e permitindo que as espécies indesejadas possam ser retiradas (lavadas) antes que o DNA purificado seja removido das partículas sólidas⁵. Atualmente são comercializados no mercado *kits* para SPE que utilizam sílica como fase sólida, um sal caotrópico para proporcionar a ligação do DNA na fase sólida e um tampão de baixa força iônica para a eluição. Uma desvantagem em relação a estes métodos de extração é a necessidade de várias etapas de centrifugação, deixando a amostra susceptível a contaminações. Uma excelente alternativa, que reduz etapas de transferência de amostra e conseqüentemente reduz fontes de contaminação é a implementação da SPE em microchip. A SPE em microchip (μ chipSPE) consome pequeno volume de amostra e reagentes, permite a

integração entre outras etapas do processo analítico em uma mesma plataforma e, além disso, a μ chipSPE ocorre em um ambiente fechado, o que é extremamente útil quando se trabalha com amostras biológicas⁶⁻⁸.

O novo método de extração de DNA desenvolvido neste trabalho, chamado de SPE dinâmica, ou no inglês “dynamic SPE” (dSPE), utiliza o mesmo princípio da adsorção de DNA em sílica, porém utiliza uma fase sólida dinâmica (móvel) ao invés de uma fase sólida estática como nos métodos de extração em microchip atualmente utilizados. Neste último, o canal é empacotado com partículas de sílica. Ao invés de fazer o empacotamento do canal microfluídico com sílica, o método desenvolvido neste trabalho utiliza uma “fase sólida móvel” manipulada através de um campo magnético⁹. Para isso, utilizam-se partículas magnéticas de sílica, disponíveis comercialmente como MagneSil[®] ¹⁰.

Essas partículas de sílica recobertas com material paramagnético são utilizadas com grande sucesso na extração de DNA pela Divisão de Ciências Forenses da Virginia em uma plataforma robótica automatizada. O grupo do Professor James P. Landers tem realizado a transposição destes métodos que utilizam partículas de MagneSil[®] para o formato de microchip, o que permite o uso da tecnologia já desenvolvida de μ SPE em microchip utilizando partículas de sílica^{11,12}.

As partículas de MagneSil[®] são partículas paramagnéticas de sílica com grande afinidade a ácidos nucleicos sob determinadas condições. As partículas são compostas de dióxido de silício (SiO_2) juntamente com um composto de Fe_3O_4 na razão de 1:1. A Figura 2.1 (A) mostra uma imagem de microscopia eletrônica das partículas de MagneSil[®]. A estrutura das partículas e a composição da solução podem ser alteradas para adsorver seletivamente ácidos nucleicos de diferentes

tipos e tamanho. Essas propriedades são utilizadas para desenvolver métodos de purificação baseados em três etapas: adsorção do DNA nas partículas, lavagem dos contaminantes e eluição do DNA purificado. As propriedades do MagneSil® combinam as vantagens da química sílica-DNA com uma excelente resposta ao campo magnético¹³.

Figura 2.1 (A) - Imagem de microscopia eletrônica das partículas de MagneSilTM e (B) - Desenho esquemático da formação do movimento de “pinwheel” característico das partículas de MagneSil® na presença de DNA.

Esta excelente resposta ao campo magnético torna as partículas de MagneSil® extremamente interessante para o uso em μ SPE para extração de DNA. A aplicação do campo magnético faz com que as partículas magnéticas possam se movimentar dentro do canal microfluídico. Este movimento das partículas faz com que a dessorção das moléculas de DNA seja mais efetiva, promovendo assim uma recuperação de uma quantidade maior de DNA purificado. Além disso, o movimento característico das partículas de MagneSil® sob a aplicação do campo magnético na presença de DNA serve como um detector visual da presença de DNA na amostra. As moléculas de DNA quando submetidas ao campo magnético rotacional são adsorvidas nas partículas de forma a aglomerar as partículas de MagneSil®, formando pequenos turbilhões, provocando um movimento chamado de “pinwheel”

pelo grupo do Prof. Landers¹⁴. O movimento de “pinwheel” ocorre devido à aglomeração das partículas de MagneSil[®] na presença de DNA como mostrado na Figura 2.1B.

Os resultados apresentados neste Capítulo foram publicados em um artigo da revista Analyst, em 2010⁹.

2.2. OBJETIVO

Desenvolver um novo método de extração de DNA em fase sólida, em microchip de vidro. O novo método utiliza fase sólida “móvel” e baseia-se no uso de partículas de sílica magnéticas (MagneSil[®]) não empacotadas e a aplicação de campo magnético externo para promover o movimento das partículas dentro do canal microfluídico. Inicialmente, o objetivo foi otimizar o método para amostra de DNA pré-purificada e posteriormente aplicar o método para extração de DNA em amostras reais (sangue) e avaliar a influência de parâmetros como tamanho dos fragmentos de DNA na amostra e tempo de acondicionamento da amostra de sangue na eficiência de extração e perfil de eluição. Finalmente, pretende-se comparar os resultados obtidos por dSPE em microchip com resultados obtidos com outros métodos de extração, para avaliar a performance do método desenvolvido em relação aos métodos de extração disponíveis atualmente.

2.3. EXPERIMENTAL

2.3.1. Materiais, amostras e reagentes

Os reagentes Tris(hidroximetil)aminometano (Tris), o sal dissódico etilenodiaminotetracético (EDTA), o detergente Triton X-100 e o isopropanol foram

adquiridos junto à Sigma Chemical (St. Louis, MO). O hidrocloreto de guanidina (GuHCl) e os reagentes para PCR foram adquiridos junto à Fisher Scientific (Fairlawn, NJ). Os primers para a amplificação do fragmento de 380 pb do gene β -globina foram sintetizados pela MWG Biotech (High Point, NC). O intercalador de DNA PicoGreen, usado para marcar fluorescentemente as moléculas de DNA, foi adquirido junto à Invitrogen (Carlsbad, CA). As partículas de MagneSil[®] adquiridas junto à Promega (Madison, WI) foram diluídas 3,3 vezes em GuHCl 8 mol/L (pH 7,6). Amostras de sangue total com o valor da quantidade de células brancas conhecidas foram fornecidas pelo Hospital da Universidade da Virgínia, doados por pacientes anônimos. As amostras de DNA humano pré-purificadas foram preparadas a partir de amostras de sangue também fornecidas pelo Hospital da Universidade da Virgínia, usando kits comerciais QIAmp DNA da Qiagen (Valencia, CA).

2.3.2. Fabricação do microchip de vidro

Os microdispositivos de vidro usados para dSPE foram fabricados em substrato de borossilicato (Telic Company, Valencia, CA) usando métodos padrões de fotolitografia e corrosão úmida. As dimensões dos canais do microchip de vidro foram: 1,5 cm de comprimento efetivo, 1,4 mm de largura e 200 μ m de profundidade. Os reservatórios foram criados utilizando uma broca de diamante de 1,1 mm de diâmetro. Uma tampa de vidro foi usada para selagem térmica do dispositivo. A Figura 2.2 mostra um esquema do microdispositivo usado em dSPE. O volume do canal, usado como câmara para extração, é de 4 μ L.

Figura 2.2 - Desenho esquemático do microdispositivo de vidro.

O microdispositivo usado nas extrações com fase sólida estacionária tem as mesmas dimensões do dispositivo para dSPE, com exceção à existência de um estrangulamento, ou seja, uma região mais estreita para conter as partículas durante o empacotamento. Esta barreira tem $\sim 15\ \mu\text{m}$ de largura e está localizada à $2/3$ do comprimento do canal.

2.3.3. Preparo das amostras

As amostras pré-purificadas de DNA humano foram diluídas na concentração desejada com GuHCl 8 mol/L pH 7,6. As amostras de sangue foram preparadas misturando 6 μL de sangue com 5 μL de proteinase K (20 mg/mL) e 9 μL de GuHCl 8 mol/L pH 7,6 + 1% triton X-100, fazendo um volume total de 20 μL de solução. A mistura foi agitada em vortex e incubada em banho maria a 56 °C por 10 min. Uma alíquota de 2 μL da amostra, equivalente a 600 nL de sangue foi utilizada em cada extração. A quantidade de DNA em 600 nL de sangue era calculada através da quantidade conhecida de células brancas em cada amostra de sangue (informação fornecida pelo Hospital da Universidade da Virgínia) e considerando que cada célula branca possui 6,25 pg de DNA.

Para o preparo das amostras de plasma, amostras de sangue foram centrifugadas a 3000x g por 10 minutos e a parte clara correspondente ao plasma foi coletada. Para as amostras de plasma enriquecidas com DNA, 6 μL de plasma foram misturados com 5 μL de proteinase K e 8,67 μL de GuHCl 8 mol/L pH 7,6 + 1% de triton X-100, e foram incubadas em banho maria a 56 °C por 10 min. DNA puro foi então adicionado para completar o volume para 20 μL e a concentração final de DNA na amostra de plasma foi de 10 ng/ μL , sendo 2 μL da amostra usados para cada extração.

2.3.4. Extração dinâmica de DNA em fase sólida

O procedimento de extração de DNA em fase sólida compreende basicamente três etapas: introdução da amostra (adsorção do DNA na fase sólida), lavagem com isopropanol (lavagem das impurezas) e eluição do DNA com tampão apropriado. Antes de iniciar o procedimento de extração, o canal era sempre lavado com HCl 2 mol/L para limpeza do canal entre as extrações. Para dar início a extração, o canal foi preenchido com 4 μL de GuHCl 8 mol/L pH 7,6, seguida da adição das partículas magnéticas (MagneSil®). As partículas magnéticas foram adicionadas ao canal com o auxílio de um íma posicionado no topo do microchip para prender as partículas no interior do canal e o excesso da solução, acima da capacidade máxima (4 μL) coletado no reservatório de saída. Com o magneto prendendo as partículas, 2 μL da amostra foi adicionada no canal e 2 μL de GuHCl 8 mol/L foi coletada no *outlet*. O microchip foi colocado em um agitador magnético operando em velocidade máxima e as partículas permaneceram em movimento através da combinação de dois campos magnéticos atuando simultaneamente, o campo magnético proveniente do agitador magnético e o segundo proveniente de

um magneto suspenso no topo do microchip. Nesta etapa, de adsorção do DNA na fase sólida, o movimento foi mantido por 10 minutos. As partículas foram então lavadas com 6 μL de isopropanol 80% e em seguida o DNA foi eluído das partículas magnéticas com 0,1 $\times$ TE (1 mol/L Tris/0,1 mol/L EDTA, pH 8,0) através da mesma manipulação magnética por 2 minutos para cada alíquota de 2 μL coletada. Foram coletadas um total de dez frações. Para a quantificação do DNA extraído e cálculo da eficiência de extração, a cada fração de 2 μL coletada em tubo Eppendorf, adicionou-se 18 μL de 0,1 $\times$ TE e 2 μL de PicoGreen 0,5%, para as medidas de fluorescência das amostras no espectrofluorímetro NanoDrop 3300 (Thermo Scientific, Wilmington, DE). Uma curva analítica utilizando DNA humano pré-purificado foi preparada para a comparação de fluorescência com as amostras.

2.3.5. Extração de DNA em microchip com a fase sólida estacionária (empacotada no canal)

Realizou-se a extração de DNA em microchip com a fase sólida empacotada no canal para efeito de comparação com a eficiência de extração obtida com a extração dinâmica de DNA, realizada neste trabalho.

Para isto, primeiramente as partículas magnéticas foram empacotas no canal microfluídico. Como as partículas de MagneSil[®] têm apenas 5 μm de diâmetro, e não podem ser retidas pela barreira existente no canal, que é de 15 μm , adicionou-se primeiramente uma pequena quantidade de partículas de sílica de 30 μm de diâmetro (Supelco, Bellefonte, PA) e em seguida foram adicionadas as partículas de MagneSil[®] até o empacotamento de 2/3 do canal. A Figura 2.3A mostra um microchip de vidro utilizado para os experimentos de SPE com fase estacionária

empacotada no canal. A Figura 2.3B é uma ampliação da região da barreira no canal, mostrando que as partículas empacotadas no canal são retidas pela barreira.

Figura 2.3 (A) - Microchip de vidro utilizado nos experimentos de extração de DNA com fase estacionária empacotada no canal e (B) - Partículas empacotadas no canal e retidas pela barreira.

As partículas empacotadas foram condicionadas antes de cada experimento com GuHCl 6 mol/L pH 7,6 com uma vazão de fluxo de 7,0 $\mu\text{L}/\text{min}$ por 30 min. Em todas as etapas, introdução da amostra, lavagem e eluição, as soluções foram levadas através das partículas empacotadas por uma bomba seringa operando com fluxo de 7,0 $\mu\text{L}/\text{min}$. O procedimento de extração iniciou-se pela introdução de 2 μL da amostra de sangue preparada como descrito no item 2.3.3, (equivalente a 600 nL de sangue) e levada através das partículas empacotadas com o auxílio da bomba seringa. Em seguida, as partículas foram lavadas com 35 μL de isopropanol 80%. DNA purificado foi eluído com 0,1 $\times$ TE pH 8.0 e foram coletadas 10 frações de 2 μL para quantificação via ensaio com PicoGreen. A cada tudo adicionou-se 18 μL de 0,1 $\times$ TE e 2 μL de PicoGreen 0,5%, para as medidas de fluorescência das amostras

no espectrofluorímetro NanoDrop 3300 (Thermo Scientific, Wilmington, DE). Uma curva analítica utilizando DNA humano pré-purificado foi preparada para a comparação de fluorescência com as amostras.

2.3.6. Avaliação da qualidade do DNA extraído através da amplificação do DNA pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A amplificação do DNA extraído do sangue foi realizada no termociclador da Bio-Rad MyCycler usando primers para amplificação do fragmento do gene β -globin através do seguinte protocolo de aquecimento: 95 °C por 1 minuto (desnaturação inicial), 30 ciclos de 95 °C por 30 segundos (desnaturação), 60° C por 30 segundos (anelamento) e 72 °C por 30 segundos, seguido por 72 °C por 2 minutos (extensão final). Todos os produtos de PCR foram analisados pelo Bioanalyzer 2100 de acordo com o protocolo do fabricante.

2.4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

O método de extração dinâmica de DNA em fase sólida envolve primeiramente o preenchimento do canal com a solução de GuHCl 8 mol/L seguido da adição de partículas de MagneSil[®] de 5 μ m de diâmetro. A quantidade de partículas utilizadas em cada extração depende da concentração de células brancas no sangue ou quantidade de DNA na amostra pura. A melhor relação encontrada nos experimentos, que proporcionou maior eficiência de extração, foi de 1,0 μ L de solução de MagneSil[®] (diluição 3:1) para o sangue contendo $7,0 \times 10^3$ células brancas/ μ L de sangue ou 25 ng de DNA em 2 μ L de amostra. Para amostras de sangue com concentrações maiores de células brancas utilizou-se um volume maior

da solução de MagneSil[®], mantendo-se sempre a mesma proporção. Após a adição das partículas de MagneSil[®], elas permanecem presas no canal com o auxílio de um ímã no topo do microchip e adiciona-se 2 µL da amostra. A combinação do campo magnético rotacional (CMR) com o ímã suspenso no topo do microchip proporcionam um movimento intenso das partículas dentro do canal e uma interação efetiva da amostra com a fase sólida.

A Figura 2.4 ilustra a resposta das partículas magnéticas ao campo magnético na ausência e na presença de DNA. Quando as partículas magnéticas são expostas ao CMR na ausência de DNA, as partículas dispersam e não demonstram evidência de agregação. Sob as mesmas condições, mas na presença de 15 ng de DNA, interessante existe uma mudança de distribuição das partículas magnéticas, com a formação clara de pequenos agregados de partículas, os quais respondem ao campo magnético rotativo formando pequenos turbilhões (“pinwheel”).

Figura 2.4 (A) - Microchip de vidro com partículas de MagneSil[®] no canal microfluídico, (B) - Ampliação da região do canal contendo as partículas de MagneSil[®] na presença de DNA e (C) - Ampliação da região do canal contendo as partículas de MagneSil[®] na ausência de DNA.

Enquanto as partículas magnéticas respondem sempre da mesma forma quando são expostas ao CMR, independentemente da fonte de DNA, se DNA puro ou amostra de sangue humano. O mesmo não acontece para a eficiência da extração que apresenta diferenças entre as extrações de DNA proveniente de amostra pura e amostra de sangue e demonstrou depender do tamanho da molécula de DNA.

2.4.1. Extração dinâmica de DNA em fase sólida a partir de amostra pré-purificada de DNA e amostra de sangue humano

Em trabalhos anteriores de extração de DNA em microchip^{8,15,16} a adsorção de DNA geralmente é realizada através de uma coluna de sílica empacotada no canal microfluídico e utilizam bomba seringa para controlar o fluxo da solução. Os maiores problemas destes sistemas são a inconsistência inerente com (1) o empacotamento da coluna de sílica, (2) pressão gerada pelo empacotamento da coluna, (3) eluição e (4) vazão do eluente. Além disso, algumas vezes o DNA extraído usando este tipo de extração não possui concentração suficiente para aplicações posteriores como PCR, por exemplo¹⁷. A alternativa de usar dSPE ao invés de coluna empacotada elimina muitas das variáveis relacionadas com o empacotamento da fase sólida e permite um controle fluídico manual.

Os experimentos iniciais foram realizados com amostra pré-purificada de DNA, de forma a otimizar o método e verificar a eficiência da técnica de extração dinâmica especialmente a partir de volumes reduzidos.

Para os experimentos de extração de DNA a partir de uma amostra pré-purificada utilizou-se 2 µL de amostra na concentração de 10 ng/µL em GuHCl 8 mol/L pH 7,6 (20 ng de DNA) e 1 µL de MagneSil[®] e foram coletadas 10 frações de 2

μL cada. A Figura 2.5A (em preto) mostra o perfil de eluição do DNA extraído a partir de uma amostra pré-purificada de DNA humano. As duas primeiras frações coletadas são majoritariamente isopropanol 80%, proveniente das lavagens e espera-se não ter DNA nestas frações ou pelo menos muito pouco DNA. A primeira fração coletada contendo DNA, eluído após o início do movimentos das partículas em contato com o tampão, é a terceira fração (6 μL) como visto na Figura 2.5A, e contém a maior parte do DNA recuperado (~50% do total recuperado, o que corresponde a 5,2 ng de DNA).

Figura 2.5 (A) - Perfil de eluição a partir de amostra pré-purificada de DNA (preto) e sangue (vermelho) e (B) - Eficiência de extração a partir de amostra pré-purificada de DNA ($n=3$) e sangue ($n=9$).

Após o sucesso da extração a partir de amostra pré-purificada de DNA (eficiência de extração de $55 \pm 3,2\%$, Figura 2.5B), determinou-se a capacidade do método em extrair DNA a partir de uma amostra real (sangue). Como mostrado na Figura 2.5 o perfil de eluição para amostra de sangue apresenta um perfil diferente daquele bem formado apresentado pela amostra pura de DNA. O perfil mais extenso

apresentado pelas amostras de sangue foi sempre consistente para amostras de sangue fresco. Os dados utilizados para construir a Figura 2.5 foram provenientes de amostras de sangue coletadas no mesmo dia da extração. Enquanto na extração de DNA a partir de amostra pré-purificada quase todo DNA é coletado na primeira fração após o início do movimento das partículas (~50%) e nas frações seguintes pouco DNA é eluído, nas extrações a partir de amostras de sangue a primeira fração não é tão concentrada (~18%) e as adições seguintes de tampão e agitação das partículas de MagneSil[®] proporcionaram eluição de quantidades significativas de DNA. A Figura 2.5A (em vermelho) mostra o perfil de eluição da extração de DNA a partir de uma amostra de sangue. Embora a extração de DNA a partir de amostra de sangue não possua perfil tão acentuado para a primeira fração eluída, a eficiência de extração é comparável a eficiência de extração de uma amostra de DNA pré-purificada e muitas vezes apresentou uma eficiência de extração superior, especialmente quando se coletava mais do que 10 frações. Quando frações adicionais foram coletadas (12 frações), 2 frações a mais, a eficiência de extração aumentou de $63,9 \pm 6,0\%$ (10 frações) para $71,8 \pm 5,8\%$ (12 frações).

Embora a eficiência de extração para amostras de sangue tenha sido ligeiramente superior, o perfil de eluição estendido indica que a cinética de desorção é diferente daquela apresentada pela amostra de DNA pré-purificada. Para compreender a base deste fenômeno e se esta mudança é provocada em função de componentes proteicos ou material celular, amostra de plasma (sangue total menos os componentes celulares) foi isolada do sangue, adicionado DNA purificado e em seguida foi realizada a extração. A Figura 2.6A mostra o perfil de eluição para a extração de DNA a partir da amostra de plasma na qual foi adicionada 20 ng de DNA. O perfil de eluição é praticamente idêntico ao apresentado nas extrações a

partir de amostras pré-purificadas de DNA. Além disso, a eficiência de extração das duas amostras são comparáveis (Figura 2.6B). Isso sugere que o perfil de eluição estendido das extrações de DNA em sangue não é provocado pela presença das proteínas, já que as proteínas compõem cerca de 8% do sangue em volume.

Figura 2.6 (A) - Perfil de eluição da extração de DNA amostras de DNA puro e plasma adicionado DNA e (B) - Eficiência de extração em uma amostra pré-purificada de DNA e eficiência de extração para uma amostra de plasma enriquecida com DNA.

A partir do conhecimento que as proteínas sozinhas não são a causa da desorção mais lenta do DNA das partículas magnéticas, experimentos complementares envolvendo a extração dinâmica de DNA a partir de células brancas isoladas do sangue, as únicas células do sangue que contém DNA, foram realizados. As extrações a partir de células brancas apresentaram perfil de eluição similar ao perfil de eluição de amostra de DNA pré-purificada (Figura 2.7), porém com uma eficiência de extração bem menor (21,6%). Esta diminuição na eficiência de extração pode ser devido a perda de células brancas durante o processo de isolamento. O perfil de eluição similar ao perfil de eluição de amostra pura de DNA

sugere que o perfil de eluição estendido, característico das extrações a partir de sangue, não é inerente as células brancas presentes no sangue. A combinação destes dois experimentos, extração de DNA a partir de plasma enriquecido com DNA e a partir de células brancas isoladas do sangue, sugere que a base para a explicação do perfil de eluição estendido para amostras de sangue total não está associado com proteínas e dejetos celulares e talvez seja inerente a extração de DNA intactos a partir sangue total.

Figura 2.7 - Perfil de eluição do DNA extraído a partir de células brancas isoladas do sangue.

2.4.2. Efeito do tamanho dos fragmentos de DNA na eficiência de extração

A diferença na eficiência de extração é principalmente no perfil de eluição da extração de DNA a partir de sangue total e amostra pré-purificada de DNA provocou a investigação do efeito do tamanho dos fragmentos de DNA na extração, uma vez que os experimentos descritos anteriormente não foram conclusivos, não sendo possível relacionar as diferenças entre os perfis de eluição com as proteínas do

sangue ou como sendo inerentes às células brancas. Interessantemente, nenhuma informação clara pode ser obtida na literatura em termos do comprimento da molécula de DNA purificada a partir de células eucarióticas¹⁸. A purificação de DNA reduz o tamanho da molécula de DNA, porém a extensão desta redução depende de muitos fatores, incluindo o método de purificação utilizado e a manipulação da amostra¹⁸. Portanto, é provável que os fragmentos da molécula de DNA na amostra pré-purificada, utilizada para os experimentos de otimização da dSPE, eram de tamanho menor que as moléculas de DNA extraídas diretamente do sangue total. Para verificar o efeito do tamanho dos fragmentos das moléculas de DNA na extração, comparou-se a eficiência de extração e perfil de eluição de três fontes diferentes de DNA com tamanhos de fragmentos diferentes: amostra intacta de sangue total, amostra de DNA pré-purificado (espera-se que neste caso os fragmentos de DNA sejam menores) e amostra pré-purificada de *E-coli*. O genoma intacto da *E-coli* possui 4,6 kpb, enquanto o genoma humano intacto possui 3 bilhões de pares de bases. Os dados da Figura 2.8 dão suporte a teoria de que o tamanho do fragmento de DNA tem influência na eficiência de extração. A eficiência de extração de amostra de sangue (~70%) é um pouco maior que da amostra pré-purificada de DNA (~55%), porém a eficiência da amostra de *E-coli* é muito menor (23%), sugerindo que fragmentos menores de DNA são mais difíceis de serem eluídos. Fragmentos menores de DNA demonstram se ligar mais fortemente à sílica, sendo mais difícil de serem eluídos. Este efeito pode ser devido a porosidade das partículas de sílica, que dificultam a desorção destas moléculas de DNA^{3,19}.

Figura 2.8 (A) - Perfil de eluição de amostras contendo tamanhos diferentes de fragmentos de DNA (sangue total, DNA pré-purificado e E.Coli e (B) - Eficiência de extração das três extrações.

Para confirmar o efeito do tamanho dos fragmentos de DNA no perfil de eluição e na eficiência de extração as amostras foram submetidas a sonificação, um método efetivo para fragmentação das moléculas de DNA²⁰. As amostras foram submetidas a sonificação, com o auxílio de um ultrassom de sonda, submetidas a números de pulsos variados e em seguida as amostras foram submetidas a extração para verificar a eficiência de extração e perfil de eluição.

Uma diminuição de 55% na eficiência de extração foi observada para extração a partir da amostra pré-purificada de DNA quando a amostra foi submetida a 20 pulsos curtos com a sonda do ultrassom. A Figura 2.9A mostra que a eficiência de extração da amostra pré-purificada caiu de 61% para 27% quando foi submetida aos 20 pulsos com a sonda do ultrassom. O efeito da sonificação foi mais dramático para as amostras de sangue (Figura 2.9B), quando a amostra foi submetida apenas a dois pulsos de sonificação a eficiência de extração caiu de 57% para 20%

(diminuição de 65%). A sonificação para as amostras de *E-coli* não foi muito significativa, caindo de 23,1% para 15,2% (Figura 2.9C). Acredita-se que pelo fato dos fragmentos de *E-coli* já serem suficientemente pequenos para proporcionar uma eficiência de extração baixa, a sonificação não tenha um efeito muito acentuado.

Figura 2.9 - Efeito da sonificação sob eficiência de extração em diferentes amostras.

Uma correlação interessante entre a sonificação e a eficiência de extração e perfil de eluição foi observada para as amostras de sangue. Como pode ser observado na Figura 2.10, a sonificação da amostra de sangue alterou o perfil de eluição de um perfil estendido para um perfil acentuado, com alta concentração de DNA na primeira fração eluída, tornando um perfil similar ao de amostras puras de DNA. Os experimentos de sonificação indicaram que a diminuição na eficiência de extração e a mudança no perfil de eluição, principalmente para as amostras de sangue, pode estar relacionada com o tamanho dos fragmentos de DNA.

Figura 2.10 - Efeito da sonificação no perfil de eluição de uma amostra de sangue.

2.4.3. Influência da idade da amostra de sangue sob a eficiência de extração

A capacidade em extrair DNA de amostras de sangue “velhas”, estocadas há algum tempo é um fator importante, pois nem sempre é possível a obtenção de amostras de sangue fresco, principalmente em análises forenses. Desta forma, realizou-se extração dinâmica de DNA em fase sólida de amostras de sangue durante 40 dias. A mesma amostra de sangue (mesmo indivíduo) estocada em sala fria a 4°C foi utilizada para este experimento. A Figura 2.11 mostra que a eficiência

de extração da amostra de sangue do mesmo paciente contendo $9,9 \times 10^3$ células brancas/ μL de sangue permaneceu quase que inalterada ao longo de 40 dias. Desta forma, pode-se considerar que a extração dinâmica de DNA pode ser utilizada com sucesso não só para amostras frescas de sangue como também para amostras de sangue coletadas após semanas.

Figura 2.11 - Efeito a idade da amostra de sangue sob a eficiência de extração.

Embora os experimentos de extração tenham demonstrado que não há diminuição significativa na eficiência de extração após 40 dias, uma mudança notável no perfil de eluição foi observada após 40 dias (Figura 2.12). O perfil mais estendido típico de uma amostra de sangue fresco foi alterado para um perfil mais acentuado na primeira fração eluída contendo DNA, se aproximando do perfil de extração das amostras de DNA pré-purificadas (em vermelho na Figura 2.12). Enquanto para a amostra de sangue fresco as três primeiras frações mais concentradas apresentaram 43,7% do DNA extraído, para a mesma amostra após 40 dias da

coleta as três primeiras frações mais concentradas de DNA apresentou 60% do total de DNA extraído.

Figura 2.12 - Efeito idade da amostra de sangue no perfil de eluição. Em azul a amostra de sangue fresca e em vermelho amostra de sangue após 40 dias da coleta.

2.4.4. Comparação entre dSPE e outras técnicas de extração

Qualquer técnica viável de SPE deve ser capaz de extrair DNA em concentração suficiente para aplicações posteriores como, por exemplo, PCR. Para verificar a eficiência do método (dSPE) em relação aos outros métodos de extração existentes, comparou-se dSPE com um método comercial, Qiagen QIAamp, e com um método de extração em fase sólida em microchip com a fase sólida empacotada no canal microfluídico. A Tabela 2.1 mostra a comparação entre a eficiência de extração dos três métodos e a quantidade de DNA recuperada nas duas primeiras frações mais concentradas de DNA. A dSPE apresentou uma eficiência de extração comparável ao método comercial e eficiência de extração maior que a SPE com fase sólida empacotada. Um fator mais importante que a eficiência de extração é a concentração da solução de DNA purificado, e para a extração dinâmica de DNA as

duas primeiras frações mais concentradas foram 15 vezes mais concentradas que o método comercial.

Tabela 2.1 - Comparação da eficiência de extração e concentração de DNA nas duas primeiras frações coletadas entre SPE dinâmica e outros métodos de extração.

	Eficiência de Extração (%)	Concentração de DNA (ng/μL) nas duas primeiras frações
dSPE	65,7 ± 2,0	1,7±0,4
Fase sólida empacotada	42,5 ± 5,6	2,3±0,5
Qiagen	65,4 ± 3,0	0,1±0,01

2.4.5. Amplificação através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) do DNA extraído a partir de dSPE

Outro requisito para que um método de extração seja considerado um bom método é o de extrair DNA de alta qualidade, ou seja, que possa ser amplificado. A qualidade do DNA extraído através da dSPE foi verificada demonstrando que o DNA é amplificável através da reação da PCR do fragmento de 318 pb do gene β -globina. Nos primeiros esforços de amplificar o DNA proveniente da dSPE somente as frações menos concentradas apresentaram produto da reação da PCR, provavelmente porque as primeiras frações continham ainda isopropanol ou proteínas residuais do sangue, que são inibidores da PCR. Desta forma, para possibilitar a amplificação do DNA na primeira fração (mais concentrada) inseriu-se no processo de extração lavagens extras das partículas com 0,1× TE. Após as lavagens das partículas com isopropanol, as partículas foram lavadas com quatro frações extras de 2 μL de 0,1× TE sem agitação das moléculas. Esta etapa foi

adicionada para garantir a eliminação total do isopropanol da primeira fração mais concentrada e permitir a amplificação do DNA nesta fração. Apenas uma quantidade muito pequena de DNA é perdida na lavagem extra com TE ($7,8 \pm 1,7\%$), sendo que $92,2 \pm 1,7\%$ do total extraído só é eluído após o início do movimento das partículas. Desta forma, como a eluição do DNA é dependente do movimento das partículas é possível controlar o processo de uma forma simples. As extrações incluindo lavagens extras com TE apresentaram amplificação de DNA na primeira fração mais concentrada (Figura 2.13) e nas frações subsequentes, indicando que o DNA purificado por dSPE é amplificável, viabilizando desta forma uma posterior integração entre dSPE e PCR.

Figura 2.13 - Eletroferograma mostrando a amplificação do fragmento de 380 pb do gene β -globina na primeira fração coletada na extração de DNA a partir de uma amostra de sangue usando dSPE.

2.5. CONCLUSÃO

Um novo método de extração em fase sólida em microchip, dSPE, foi caracterizado a partir de uma amostra biológica complexa (sangue) para extração de DNA. Os dados de eficiência de extração e perfil de eluição demonstram que mesmo um pequeno volume de amostra (600 nL de sangue) proporciona uma extração eficiente de DNA de alta qualidade, ou seja, DNA amplificável e frações altamente concentradas de DNA. Em contraste com outros métodos de extração em fase sólida, que apresentam limitações como a inconsistência inerente ao empacotamento da coluna de sílica e o grande volume para a eluição de DNA, em SPE dinâmica a fase estacionária é facilmente manipulada pela ação do campo magnético. Além disso, a eluição de DNA é dependente do movimento das partículas e produz frações 15 vezes mais concentradas quando comparado com métodos convencionais de extração em macroescala. O ambiente fechado do microchip diminui as possibilidades de contaminação durante o processo de extração. Outra vantagem importante da SPE dinâmica é que os reagentes utilizados na extração são compatíveis com a PCR. Desta forma, o DNA eluído por este método, incluindo-se a primeira fração, demonstrou ser amplificável. Sendo assim, o método de extração apresentado é conveniente para integração com a amplificação, devido ao pequeno volume necessário para eluição e alta concentração das frações eluídas. A SPE dinâmica também é passível de automação, uma vez que o movimento das partículas requer apenas um agitador magnético e um íma suspenso no topo do microchip. O uso de equipamentos simples e baratos faz desta técnica atrativa o bastante, tanto para aplicações de “point of care” quanto para o uso em lugares com poucos recursos, objetivos da utilização de microchips. Devido a

qualidade e a concentração do DNA extraído o método demonstra ser viável para uma incorporação em um dispositivo integrado para análises de amostras reais.

REFERÊNCIAS

1. WILSON, I. G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. **Applied and environmental microbiology**, v. 63, n. 10, p. 3741-3751, 1997.
2. BIENVENUE, J. M. **DNA Purification in microfluidic systems for clinical and forensic application**. 2007. 196f. Tese (Doutorado em Filosofia) - Departamento de Química, Universidade da Virgínia, Charlottesville, 2007.
3. BOOM, R.; SOL, C. J. A.; SALIMANS, M. M. M.; JANSEN, C. L.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P. M. E.; VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids, **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 495–503, 1990.
4. CARTER, M. J.; MILTON, I. D. An inexpensive and simple method for DNA purifications on silica particles, **Nucleic Acids Research**, v. 21, n. 4, p. 1044, 1993.
5. WEN, J.; LEGENDRE, L. A.; BIENVENUE, J. M.; LANDERS, J. P. Purification of nucleic acids in microfluidic devices. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 17, p. 6472-6479, 2008.
6. BREADMORE, M. C.; WOLFE, K. A.; ARCIBAL, I. G.; LEUNG, W. K.; DICKSON, D.; GIORDANO, B. C.; POWER, M. E.; FERRANCE, J. P.; FELDMAN, S. H.; NORRIS, P. M.; LANDERS, J. P. Microchip-based purification of DNA from biological samples. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 8, p. 1880-1886, 2003.
7. TIAN, H.; HUHMER, A. F. R.; LANDERS, J. P. Evaluation of silica resins for direct and efficient extraction of DNA from complex biological matrices in a miniaturized format. **Analytical Biochemistry**, v. 283, p. 175-191, 2000.
8. WOLFE, K. A.; BREADMORE, M. C.; FERRANCE, J. P.; POWER, M. E.; CONROY, J. F.; NORRIS, P. M.; LANDERS, J. P. Toward a microchip-based solid-phase extraction method for isolation of nucleic acids. **Electrophoresis**, v. 23, n. 5, p. 727-733, 2002.
9. DUARTE, G. R. M.; PRICE, C. W.; LITTLEWOOD, J. L.; HAVERSTICK, D. M. FERRANCE, J. P.; CARRILHO, E.; LANDERS, J. P. Characterization of dynamic solid phase DNA extraction from blood with magnetically controlled silica beads, **Analyst**, v. 135, n. 3, p. 531-537, 2010.
10. WHITE, D.; BUTLER, D.; CRESWELL, D.; SMITH, C. MagneSil™ Paramagnetic Particles: Novel Magnetics for DNA Purification. **Promega Notes Number 69**, p. 12, 1998.

11. REEDY, C. R.; BIENVENUE, J. M.; COLETTA, L.; STRACHAN, B. C.; BHATRI, N.; GREENSPOON, S.; LANDERS, J. P. Volume reduction solid phase extraction of DNA from dilute, large-volume biological samples. **Forensic Science International: Genetics**, v. 4, n. 3, p. 206-212, 2010.
12. LEGENDRE, L. A.; MORRIS, C. J.; BIENVENUE, J. M.; BARRON, A.; McCLURE, R.; LANDERS, J. P. Toward a simplified microfluidic device for ultra-fast genetic analysis with sample-in/answer-out capability: application to T-cell lymphoma diagnosis, **Journal of the Association for Laboratory Automation**, v. 13, n. 6, p. 351-360, 2008.
13. OTTO, P. MagneSil™ paramagnetic particles: magnetics for DNA purification. **Journal of the Association for Laboratory Automation**, v. 7, n. 3, p. 34-37, 2002.
14. FINKLER, D. M.; PRICE, C.; DUARTE, G. R. M.; LEGENDRE, L. A.; LeDUC, P. J.; LANDERS, J. P. A visual microfluidic DNA detector. **The proceedings of μ TAS**, v. 2, p. 1153-1155, 2008.
15. FERRANCE, J. P.; WU, Q.; GIORDANO, B.; HERNANDEZ, C.; KWOK, Y.; SNOW, K.; THIBODEAU, S.; LANDERS, J. P. Developments toward a complete micro-total analysis system for Duchenne muscular dystrophy diagnosis. **Analytica Chimica Acta**, v. 500, n. 1-2, p. 223-236, 2003.
16. WEN, J.; GUILLO, C.; FERRANCE, J. P.; LANDERS, J. P. DNA extraction using a tetramethyl orthosilicate-grafted photopolymerized monolithic solid phase, **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 5, p. 1673-1681, 2006.
17. CADY, N. C.; STELICK, S.; BATT, C. A. Nucleic acid purification using microfabricated silicon structures. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 19, n. 1, p. 59-66, 2003.
18. PRICE, C. W.; LESLIE, D. C.; LANDERS, J. P. Nucleic acid extraction techniques and application to the microchip. **Lab on a Chip**, v. 9, n. 19, p. 2484-2494, 2009.
19. HENGEN, P. **Molecular Biology: Current Innovations and Future Trends**. Ed.; Scientific Press, Wymondham, England, 1995.
20. FRANÇA, L. T. C.; CARRILHO, E.; KIST, T. B. L. A review of DNA sequencing techniques, **Quarterly Reviews of Biophysics**, v. 35, n. 2, p. 169-200, 2002.

Capítulo 3: Extração dinâmica de DNA em fase sólida (dSPE) em microchip de Poliéster- Toner (PT)

3.1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de microssistemas totais de análises (μ TAS) capazes de realizar análises genéticas requer a miniaturização e integração de múltiplas etapas do processamento analítico¹. Vários avanços foram feitos nos últimos anos na área de miniaturização²⁻⁴ e recentemente, foi realizada a integração de todas as etapas de análises de DNA através do desenvolvimento de um microchip de vidro totalmente integrado pelo grupo do Prof. James P. Landers para análises genéticas⁵.

O grande interesse de produzir um sistema capaz de realizar extração, amplificação e detecção em um mesmo dispositivo, o verdadeiro conceito de “*lab on a chip*”, é implusionado pelas vantagens associadas à integração. Estas vantagens incluem 1) custo reduzido como resultado da diminuição do consumo de amostra, reagente e o curto tempo analítico, 2) etapas reduzidas de manipulação da amostra, reduzindo as possibilidades de contaminação e 3) potencial para revolucionar análise de amostras *on-site* e aumento do acesso a lugares remotos. Em direção a consolidação deste conceito (“*lab on a chip*”), a comunidade científica tem buscado diferentes materias e novos *designs* de dispositivos microfluídicos⁶⁻⁸.

Com o crescimento do uso de microchips como uma plataforma poderosa para análise de DNA, o uso de vidro e quartzo, materiais inicialmente utilizados como substrato para produção de microchips⁹⁻¹¹, tem dado lugar ao uso de materiais poliméricos. Estes novos sistemas, idealmente, devem oferecer benefícios significativos sobre o vidro, como por exemplo: facilidade e rapidez no processo de microfabricação, reproduzir canais com alta fidelidade e baixo custo.

Whitesides e colaboradores¹² descreveram pela primeira vez o procedimento para fabricar sistemas microcluídicos fechados usando um polímero que, futuramente se tornaria o polímero mais popular para fabricação de dispositivos

microfluídicos, o poli(dimetilsiloxano) (PDMS). A técnica permitiu a produção de microdispositivos em menos de 24 horas, o que representou uma redução significativa no tempo de fabricação em relação a produção dos microchips de vidro⁹. Outros polímeros foram utilizados para a produção de microchips. Ablação a *laser* tem sido usada para criar dispositivos em policarbonato, poliestireno, e polie(etilenoftalato) (PET)¹³⁻¹⁵, enquanto outros grupos tem usado estampagem a quente e impressão com ferro a quente para criar canais usando moldes metálicos aquecidos pressionados contra materiais poliméricos¹⁶⁻²¹.

Na busca por materiais alternativos e métodos mais simples de fabricação de microfabricação, em 2003 Lago e colaboradores descreveram um outro processo alternativo, ainda mais simples e mais barato, para produção de dispositivos microfluídicos²². O método descrito por Lago para produção dos microchips utiliza uma camada de toner depositada em filme de poliéster (transparência) para definir os canais microfluídicos, além de servir como adesivo para vedação do dispositivo através de uma etapa de laminação a quente. A profundidade do canal criado pela laminação de dois filmes de poliéster é determinada pela altura da camada de toner – 6 μm de toner por filme de poliéster. Se o dispositivo impresso é laminado contra um filme de poliéster branco (sem toner) o dispositivo contém uma camada de toner simples (CTS) ou se o dispositivo impresso for laminado contra sua imagem especular, o dispositivo produzido possui uma camada de toner dupla (CTD). Os canais nestes dispositivos possuem 6 μm ou 12 μm de profundidade, respectivamente.

Em ambos os casos, a superfície do canal (base e topo) é composta pelo filme de poliéster enquanto as paredes do canal é composta por toner. Este método, chamado de impressão direta, tem sido usado para fabricar microchips com

detecção amperométrica²³ e outros métodos de detecção eletroquímica²⁴. Técnicas utilizando toner em etapas intermediárias na produção de outros tipos de dispositivos também foram publicadas²⁵⁻²⁹.

Convencionalmente, análises genéticas em microchips são realizadas em microchip de vidro³⁰⁻³³. Porém os microchips de PT representam uma alternativa simples e barata para produção de dispositivos que tem potencial para revolucionar as análises genéticas. Até o presente momento os microchips de PT eram usados apenas para separação e detecção de analitos^{23,34,35}. A proposta deste trabalho é utilizar estes dispositivos de baixo custo em uma nova arquitetura que permita a realização de extração de DNA em fase sólida.

A extração dinâmica de DNA em fase sólida (dSPE) que utiliza fase sólida dinâmica ao invés de fase sólida estática (empacotada no canal) que foi demonstrada anteriormente em microchip de vidro³⁶ pode ser facilmente adaptada aos microchips de PT devido a simplicidade da técnica, não sendo necessário o empacotamento do canal e dispensa o uso de bomba seringa.

3.2. OBJETIVO

O objetivo principal desta Tese é a produção de um dispositivo de PT descartável e integrado para análises genéticas. Para a obtenção deste objetivo, primeiramente trabalhou-se em cada etapa separadamente, para o desenvolvimento das condições experimentais e otimização de cada etapa, uma vez que a realização das etapas de uma análise genética (extração, amplificação e separação de DNA) em microchip de PT é completamente desconhecida.

Desta forma, os trabalhos foram iniciados com a extração de DNA nos microchips de PT. Portanto, o objetivo deste Capítulo é adaptar a metodologia de

extração dinâmica de DNA em fase sólida (dSPE), desenvolvida em microchip de vidro (Capítulo 2), para os microchips de PT. Para viabilizar o uso dos microchips de PT para extração em fase sólida (SPE) é necessário o desenvolvimento de microchips de PT com canais mais profundos do que os tradicionalmente utilizados para eletroforese, uma vez que a profundidade do canal produzido nestes dispositivos convencionais não é suficiente para realização de SPE. Sendo assim, o primeiro objetivo deste Capítulo foi desenvolver um novo método de fabricação de microchips de PT que proporcione a produção de microchips com canais mais profundos, os quais podem ser utilizados para inserir partículas para extração em fase sólida ou outras aplicações que necessitem de canais mais profundos.

Após a otimização do novo processo de fabricação dos microchips de PT, seguiu-se para a utilização destes microchips para realizar dSPE para extração de DNA. Os objetivos seguintes foram: a) comparação dos resultados obtidos com a extração de DNA em microchip de PT com os obtidos com o microchip de vidro, b) avaliação da qualidade do DNA extraído em microchip de PT, ou seja, se o DNA extraído nesta plataforma pode ser amplificado e c) produção de microchips contendo multicanais para extrações simultâneas de DNA em um mesmo microchip de PT.

3.3. EXPERIMENTAL

3.3.1. Materiais, amostras e reagentes

Os reagentes Tris(hidroximetil)aminometano (Tris), o sal dissódico etilenodiaminotetracético (EDTA), o detergente Triton X-100 e o isopropanol foram adquiridos junto à Sigma Chemical (St. Louis, MO). O hidrocloreto de guanidina (GuHCl) e os reagentes para PCR foram adquiridos junto à Fisher Scientific

(Fairlawn, NJ). Os primers para a amplificação do fragmento de 389 pb do gene β -globina foram sintetizados pela MWG Biotech (High Point, NC). O intercalador de DNA PicoGreen, usado para marcar fluorescentemente as moléculas de DNA, foi adquirido junto à Invitrogen (Carlsbad, CA). As partículas de MagneSil[®] adquiridas junto à Promega (Madison, WI) foram diluídas 3,3 vezes em GuHCl 8 mol/L (pH 7,6). Amostras de sangue total com o valor da quantidade de células brancas conhecidas foram fornecidas pelo Hospital da Universidade da Virgínia, doados por pacientes anônimos.

3.3.2. Produção dos microdispositivos

O processo de fabricação dos microchips de PT foi modificado do processo apresentado por Lago e colaboradores em 2003²². Foram feitas duas mudanças importantes: 1) utilizou-se quatro filmes de poliéster ao invés de 2 filmes que é originalmente usado, 2) os canais foram definidos por uma cortadora a laser de CO₂. Estas mudanças foram feitas para proporcionar a produção de canais mais profundos nos microchips de PT.

A Figura 3.1 mostra como foi produzido o microchip com quatro camadas de filme de poliéster. Primeiramente, os filmes de poliéster (I) foram cobertos totalmente com toner dos dois lados com o auxílio de uma impressora a laser HP LaserJet 4000 (II). Para proporcionar uma cobertura mais homogênea, em cada lado do filme de poliéster foram impressas três camadas de toner. A geometria dos canais foram desenhadas utilizando o *software* CorelDraw 11.0 e os canais foram criados com o auxílio de uma cortadora a laser com laser de CO₂ de 50 W (VersaLaser 350, Universal Laser Systems). Estes filmes de poliéster recobertos com toner e com os microcanais recortados foram usados como partes intermediárias nos microchips

(III). Para base e o topo do microchip foram utilizados apenas o filme de poliéster. Para os microchips com quatro camadas de poliéster utilizou-se duas camadas intermediárias (IV).

Figura 3.1 - Representação das etapas do processo de microfabricação. (I) filme de poliéster, (II). filme de poliéster recoberto com toner nos dois lados, (III). canal cortado com a cortadora a laser, (IV) alinhamento e laminação das quatro camadas de poliéster (base, tampa com dois furos para acesso aos reservatórios e os dois filmes do meio com os canais recortados).

Como cada filme de poliéster tem em média 100 μm e cada camada de toner depositada pela impressora a laser tem cerca de 6 μm , a profundidade do canal no microchip com duas camadas de poliéster intermediárias e 12 camadas de toner é de 272 μm .

Para montar os dispositivos, as quatro camadas foram alinhadas (IV) e laminadas juntas em uma laminadora operando a 120 °C e 45 cm min⁻¹. Antes da etapa de laminação, furos de 2 mm foram feitos no filme de poliéster do topo do microchip para servirem de acesso aos reservatórios. Para os microchips de PT

usados na extração de DNA a dimensão do canal recortado pela cortadora a laser foi de 14 mm x 1,2 mm. Desta forma, para o microchip com quatro camadas de poliéster as dimensões do canal são: 14 mm x 1,2 mm x 272 μm e o volume do canal 4 μL (Figura 3.2A). Os microchips com 8 canais para extrações paralelas de DNA foram desenhados de forma em que os 8 canais eram idênticos, com as seguintes dimensões: 14 mm x 1,2 mm x 272 μm e o volume do canal 4 μL (Figura 3.2B).

Figura 3.2 - Fotografia dos dispositivos de PT usados para dSPE (A) dispositivo para uma única extração e (B) dispositivos contendo 8 canais para extrações simultâneas de DNA.

3.3.3. Preparo das amostras

As amostras de sangue foram preparadas misturando 6 μL de sangue com 5 μL de proteinase K (20 mg/mL) e 9 μL de GuHCl 8 mol/L pH 7,6 + 1% triton X-100, fazendo um volume total de 20 μL de solução. A mistura foi agitada em vortex e incubada em banho maria a 56 $^{\circ}\text{C}$ por 10 min. Uma alíquota de 2 μL da amostra, equivalente a 600 nL de sangue foi utilizada em cada extração. A quantidade de DNA em 600 nL de sangue era calculada através da quantidade conhecida de células brancas em cada amostra de sangue (informação fornecida pelo Hospital da Universidade da Virgínia) e considerando que cada célula branca possui 6,25 pg de DNA.

3.3.4. Extração dinâmica de DNA em fase sólida (dSPE)

O procedimento de extração nos microchips de PT foi similar ao procedimento de extração desenvolvido para os microchips de vidro³⁶. Uma diferença importante é que não foi necessário a etapa de lavagem do microchip com HCl 2 mol/L antes do início da extração, uma vez que os dispositivos de PT são descartáveis e são utilizados apenas uma vez para cada extração. Para dar início á extração, o canal foi preenchido com 4 µL de GuHCl 8 mol/L pH 7,6, seguida da adição das partículas magnéticas. As partículas de MagneSil[®] foram adicionadas ao canal com o auxílio de um magneto posicionado no topo do microchip para prender as partículas no interior do canal e o excesso da solução, acima da capacidade máxima (4 µL) foi coletada no reservatório de saída. Com o magneto prendendo as partículas, 2 µL da amostra foram adicionados no canal e 2 µL de GuHCl 8 mol/L foram coletados no reservatório de saída. O microchip foi colocado em um agitador magnético Thermix 120S (Fisher Scientific, Fairlawn, NJ) operando em velocidade máxima e as partículas permaneceram em movimento através da combinação de dois campos magnéticos atuando simultaneamente, o campo magnético proveniente do agitador magnético e o segundo proveniente de um magneto mantido no topo do microchip. Nesta etapa de adsorção do DNA na fase sólida o movimento foi mantido por 5 minutos. As partículas foram então lavadas com 6 µL de isopropanol 80% e com quatro frações de 2 µL de 0,1× TE sem agitação e em seguida o DNA foi eluído das partículas magnéticas com 0,1× TE através da manipulação magnética por 2 minutos para cada fração de 2 µL. Foram coletadas um total de dez frações. Para a quantificação do DNA extraído e cálculo da eficiência de extração, a cada fração de 2 µL coletada em tubo Ependorff, adicionou-se 18 µL de 0,1× TE e 2 µL de PicoGreen 0,5%, para as medidas de fluorescência das amostras no

espectrofluorímetro NanoDrop 3300 (Thermo Scientific, Wilmington, DE). Uma curva analítica utilizando DNA humano pré-purificado foi preparada para a comparação de fluorescência com as amostras. Para os experimentos de oito extrações simultâneas de DNA em um mesmo microchip de PT, o procedimento experimental foi exatamente igual ao descrito acima para uma única extração. Cada microchip de PT foi utilizado apenas uma vez (devido ao baixo custo do dispositivo) e em seguida descartado, embora possa ser utilizado mais de uma vez, desde que seja adicionada uma etapa de lavagem do canal entre cada extração.

3.3.5. Avaliação da qualidade do DNA extraído em microchip de PT através da amplificação do DNA pela PCR

A amplificação do DNA extraído do sangue em microchip de PT foi realizada no termociclador da Bio-Rad MyCycler usando primers para amplificação do fragmento do gene β -globina através do seguinte protocolo de aquecimento: 95 °C por 1 minuto (desnaturação inicial), 30 ciclos de 95 °C por 30 segundos (desnaturação), 60°C por 30 segundos (anelamento) e 72 °C por 30 segundos, seguido por 72 °C por 2 minutos (extensão final). Todos os produtos de PCR foram analisados pelo Bioanalyzer 2100 de acordo com o protocolo do fabricante.

3.4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.4.1 Produção dos microchips de PT

A produção dos microchip de PT representa um método rápido, simples e de baixo custo de fabricação de dispositivos microfluídicos. Neste trabalho, demonstrou-se o grande potencial destes microchips em fazer parte de análises genéticas. As vantagens da simplicidade de fabricação dos dispositivos, além da rapidez e baixo custo tanto de matéria prima quanto da instrumentação para o processo de fabricação são as principais razões do uso destes dispositivos.

Para a realização da extração dinâmica de DNA em fase sólida, os microchip de PT foram fabricados diferentemente dos métodos convencionais, que utilizam apenas dois filmes de poliéster (base e topo) impressos com o desenho dos padrões desejados dos canais²². Para possibilitar a inserção e o movimento das partículas de MagneSil[®] através da aplicação de um campo magnético no canal microfluídico, os microchips de PT foram fabricados de modo a produzir canais mais profundos. Os canais produzidos nos microchips de PT convencionais possuem 6 µm de altura, se em somente uma das partes for impresso o padrão dos canais (camada de toner simples, CTS), ou podem possuir 12 µm de altura se na tampa do microchip for impresso a imagem especular do padrão dos canais (camada de toner dupla, CTD). Desta forma, usando o método convencional de fabricação de microchips de PT a profundidade máxima do canal é 12 µm. Esta profundidade não é suficiente para a inserção da fase sólida para extração. Sendo assim, foi necessário uma modificação para produzir canais mais profundos nos microchips de PT. Nesta modificação utilizou-se mais do que dois filmes de poliéster, ou seja, utilizou-se multicamadas de filmes de poliéster para proporcionar maior profundidade ao canal. Para viabilizar

este procedimento foi necessário utilizar uma cortadora a laser para recortar a área dos canais nos filmes de poliéster intermediários no microchip (Figura 3.1). Foram fabricados microchips com três e quatro filmes de poliéster e a eficiência de extração foi avaliada utilizando os dois dispositivos. Os resultados mostraram que os microchips com três filmes de poliéster apresentaram menor eficiência de extração do que os microchips com 4 filmes de poliéster. A provável explicação para isto é fato da eluição das moléculas de DNA da fase sólida depender da manipulação magnética efetiva das partículas. No microchip com canal mais profundo ($\sim 270 \mu\text{m}$ de profundidade) as partículas possuem maior liberdade de movimento sob a aplicação do campo magnético facilitando a desorção das moléculas de DNA do que em um microchip com 3 filmes de poliéster em que a profundidade do canal é $\pm 135 \mu\text{m}$.

O novo método de fabricação dos microchips de PT mantém as mesmas características de simplicidade de fabricação dos dispositivos de PT. A Figura 3.3 mostra os materiais e equipamentos necessários para a produção do microchip de PT desenvolvido neste trabalho. Os materiais utilizados para a fabricação dos microchips são apenas transparência e toner e em relação aos equipamentos são: impressora, cortadora a laser e laminadora. A impressora a laser e a laminadoras comumente utilizadas como materiais de escritório custam em torno de US \$ 200 e US \$ 100 respectivamente. A cortadora a laser utilizada neste trabalho custa em torno de US \$ 10.000,00. Porém existem alternativas mais baratas para recortar com precisão os canais, como a ploter de corte, que custa menos de US \$ 5.000,00³⁷ ou outra alternativa ainda mais barata seria usar uma ploter de corte compacta que custa entre US \$ 150-300³⁸. Além da simplicidade e baixo custo de fabricação do

dispositivo, uma das maiores vantagens desta plataforma é o tempo gasto para a sua produção (menos de 10 minutos) e grande potencial para produção em massa.

computador

impressora a laser

filme de poliéster + toner

Cortadora a laser

laminadora

furador de papel

Figura 3.3 - Materiais e equipamentos utilizados para a produção do microchip de PT multicamadas.

Os microchips de PT representam uma plataforma promissora para análises genéticas não só pelas razões apresentadas até o presente momento, mas também por outras vantagens que são apresentadas na Tabela 3.1. A tabela apresenta uma comparação direta das vantagens dos microchips de PT em relação aos microchips de vidro.

Tabela 3.1 - Comparação entre microchip de PT e microchip de vidro.

	Chip de PT	Chip de vidro
Custo por chip	~\$ 0.15	~\$ 40.0
Tempo de fabricação	Menos que 10 min	~24 horas
Reprodutibilidade	Moderado	Excelente
Durabilidade	descartável	Reutilizável
Compatibilidade com solventes	Compatível com reagentes para SPE e PCR	Excelente

3.4.2 Extração dinâmica de DNA em fase sólida em microchip de PT

O primeiro trabalho com dSPE em microchip de vidro demonstrou que a plataforma é capaz de extrair eficientemente DNA (eficiência maior que 60%) a partir de um pequeno volume de amostra de sangue (600 nL) e a concentração da solução de DNA purificado é conveniente para amplificação³⁶. As vantagens da técnica alternativa, que usa fase sólida dinâmica (partículas magnéticas) ao invés de fase sólida empacotada, incluem a eliminação do uso de bomba seringa e a remoção das variáveis associadas com o fluxo através de uma coluna empacotada em um canal microfluídico.

O método desenvolvido para microchips de vidro foi adaptado com sucesso para os microchips de PT. A extração dinâmica de DNA em fase sólida em microchip de PT mostrou ser um excelente método para extração de DNA combinando diversas vantagens, como rapidez (extração em cerca de 10 minutos) e um excelente perfil de eluição (Figura 3.4), visto que 73,2% do total de DNA extraído são eluídos nas três primeiras frações após o início do movimento da fase sólida. As duas primeiras frações coletadas são majoritariamente isopropanol 80%, proveniente das lavagens e as quatro frações seguintes são coletadas a partir das lavagens com 0,1× TE sem o movimento das partículas. A sétima fração (14 µL) corresponde a

primeira fração de DNA eluído após o início o movimento das partículas para a desorção das moléculas de DNA da fase sólida. O método mostrou-se altamente eficiente para a extração de DNA a partir de uma amostra de sangue, proporcionando uma eficiência de extração de $69,7 \pm 5,7\%$ e frações altamente concentradas, $3,2 \pm 0,08 \text{ ng}/\mu\text{L}$ considerando os primeiros 4 μL (duas primeiras frações).

Figura 3.4 - Perfil de eluição de uma extração de DNA a partir de uma amostra de sangue em microchip de PT. (n=3)

A extração de DNA no microchip com três filmes de poliéster apresentou eficiência de extração de 27%, um valor bem menor do que a extração de DNA no microchip com quatro filmes de poliéster que apresentou uma eficiência de extração de quase 70%. Acredita-se que esta diminuição na eficiência de extração no microchip com três filmes de poliéster seja devido ao fato de que a eluição das moléculas de DNA das partículas de MagneSil[®] dependem da liberdade com que estas partículas se movimentam sob a aplicação do campo magnético, e em um canal mais raso as moléculas têm dificuldade de se movimentarem.

3.4.3 Extrações simultâneas de DNA em um mesmo microchip de PT

Devido a facilidade em fabricar os microchips de PT, sendo extremamente fácil imprimir vários canais em um mesmo dispositivo, os microchips de PT têm grande potencial para realizar extrações paralelas, além disso, o tempo necessário para fazer um microchip de PT com um canal ou com vários canais é exatamente o mesmo. Sendo assim, fizeram-se simultaneamente oito extrações dinâmicas em fase sólida de DNA em um mesmo microchip. A Figura 3.5A mostra o perfil de eluição médio das oito extrações. O perfil de eluição nas oito extrações paralelas manteve-se o mesmo de única extração de DNA em um microchip.

A Figura 3.5B mostra o perfil de eluição de todas as oito extrações e a Figura 3.6 mostra a eficiência de extração de cada uma das oito extrações em três experimentos e a média de todas as extrações (24 no total). Embora a eficiência de extração tenha reduzido de 70% para uma única extração para 50% nas 8 extrações realizadas simultaneamente, o perfil de eluição das oito extrações são muito próximos, mostrando o sucesso de todas as extrações.

Figura 3.5 (A) - Perfil de eluição de oito extrações simultâneas no mesmo microchip e (B) - Perfil de eluição médio de oito extrações realizadas simultaneamente em um mesmo microchip. (n=3).

Extrações simultâneas de DNA em um mesmo microchip de PT além da vantagem da economia de tempo tem a vantagem da redução do custo por extração.

um microchip de PT pode ser amplificado, ou seja, é considerado um DNA de alta qualidade, podendo ser utilizado em etapas posteriores à extração em uma análise genética.

Figura 3.7 - Eletroferograma mostrando a amplificação do gene β -globina na primeira fração coletada na extração de DNA a partir de uma amostra de sangue, usando dSPE em microchip de PT.

3.4.5 Comparação entre dSPE em microchip de PT e dSPE em microchip de vidro

A dSPE em microchip de PT apresentou vantagens sobre a dSPE em microchips de vidro. Mais importante que o pequeno aumento no valor da eficiência de extração, ($63,9 \pm 6,0\%$ para o vidro e $69,7 \pm 5,7 \%$ para PT), foi o aumento significativo na concentração das frações eluídas ($1,7 \pm 0,4$ ng/ μ L de DNA para o chip de vidro e $3,2 \pm 0,08$ ng/ μ L de DNA para o chip de PT, para os primeiros 4 μ L).

Embora a eficiência de extração tenha sido comparável em ambos microchips, o perfil de eluição foi significativamente diferente (Figura 3.8A). Enquanto o microchip de vidro apresentou um perfil de eluição alargado, em que o DNA é eluído ao longo das frações coletadas, a extração em microchip de PT apresentou um perfil bem acentuado, sendo boa parte do DNA eluído já na primeira fração (34% do total recuperado) e 73,5% do total de DNA recuperado foi eluído nas três primeiras frações (6 μ L), enquanto para o microchip de vidro apenas 34 % do total eluído foi recuperado nas três primeiras frações (Figura 3.8B).

Uma hipótese para a diferença significativa entre o perfil de eluição nos dois microchips se deve ao fato de que as partículas de MagneSil[®] inseridas no microchip de PT experimentam uma maior ação do campo magnético do que microchip de vidro, devido a espessura mais fina do filme de poliéster (~100 μ m) em relação ao substrato de vidro (~1 mm). Uma vez que a eluição das moléculas de DNA depende diretamente do movimento das partículas magnéticas, a agitação mais eficiente das partículas no microchip de PT facilita dessorção das moléculas de DNA e aumento da eficiência de extração nos microchips de PT. O fato da eficiência de extração ter sido significativamente menor no microchip com canal mais raso (três filmes de poliéster) do que no microchip com canal mais profundo (quatro filmes de poliéster) reforça essa hipótese, de que a agitação mais efetiva das partículas magnéticas favorece a eficiência de extração.

Outro fator que pode estar contribuindo para o melhor perfil de eluição no microchip de PT é a menor rugosidade da superfície do filme de poliéster quando comparado com o vidro após a corrosão com HF. Outro fator que também deve ser considerado é a natureza do substrato de vidro. Da mesma forma que as moléculas de DNA adsorvem nas partículas magnéticas de sílica, as moléculas de DNA podem

ser adsorvidas também na superfície do vidro, que possui grupos silanóis. Embora o tampão de eluição seja capaz de eluir as moléculas de DNA das partículas, o dispositivo em si não está sujeito a agitação magnética, o que foi demonstrado ser essencial a desorção das moléculas de DNA.

Figura 3.8 (A) - Comparação entre o perfil de eluição de DNA extraído por dSPE em microchip de vidro e em microchip de PT e (B) - Recuperação de DNA nas três primeiras frações eluídas em relação ao total recuperado em microchip de vidro e PT.

A comparação entre dSPE em microchip de PT com outras técnicas de extração disponíveis, em termos de eficiência de extração e concentração de DNA nas frações eluídas, é um bom parâmetro para avaliar a performance da técnica em relação a outras técnicas. A Tabela 3.2 mostra a comparação entre dSPE em microchip de PT com um método de extração comercial (QIAmp Qiagen), com a extração em microchip de vidro com as partículas de sílica empacotada e com dSPE em microchip de vidro. A tabela mostra a comparação da eficiência de extração e concentração de DNA nas duas primeiras frações eluídas (~4 μL), as quais são tipicamente as frações mais concentradas obtidas em extração em

microchip. A concentração de DNA obtida a partir do método comercial é baseada na quantidade total de DNA recuperado, uma vez que apenas uma fração de 200 μL é coletada. A dSPE em microchip de PT demonstrou eficiência de extração comparável ao método comercial e dSPE em microchip de vidro, porém foi mais eficiente que SPE em microchip que utiliza partículas empacotadas.

Entretanto a principal vantagem da dSPE é a concentração de DNA purificado, o qual apresentou uma concentração 30 vezes superior ao método comercial. dSPE em geral e, principalmente em microchip de PT, oferece grandes vantagens para análise de DNA em microchips sob os produtos comercialmente disponíveis para extração de DNA.

Tabela 3.2 - Comparação da eficiência de extração e concentração de DNA nas duas primeiras frações coletadas entre SPE dinâmica em microchip de PT e outros métodos de extração.

Método de extração	Eficiência de extração (%)	Concentração de DNA (ng/ μL) em 4 μL
dSPE em microchip de PT	69,7 $\pm$ 5,7	3,2 $\pm$ 0,1
dSPE em microchip de vidro	65,7 $\pm$ 2,0	1,7 $\pm$ 0,4
microchip de vidro com SPE estático	42,5 $\pm$ 5,6	2,3 $\pm$ 0,5
Kit Qiagen	65,4 $\pm$ 3,0	0,10 $\pm$ 0,01

3.5. CONCLUSÃO

O novo processo de fabricação do dispositivo de PT, que proporciona a arquitetura de canais mais profundos, permitiu que a extração dinâmica em fase sólida fosse realizada em um dispositivo simples e descartável. A facilidade do processo de fabricação, a simplicidade da técnica de dSPE e o baixo custo (tanto do

processo de fabricação quanto da extração) torna a técnica ainda mais atrativa quando oito extrações são feitas simultaneamente em um mesmo microchip. Além disso, a densidade de canais para realização de extrações simultâneas em um mesmo microchip de PT pode ainda ser aumentada futuramente para, por exemplo, 16 canais, fazendo com que o custo associado apenas com a plataforma seja insignificante ou quase “zero”.

O sucesso da dSPE em microchip de PT, proporcionando uma extração eficiente de DNA (~70%) e frações altamente concentradas de DNA de alta qualidade (amplificável), é um avanço importante em direção a integração da etapa de extração de DNA com etapas seguintes do processo analítico de uma análise genética.

A superioridade dos resultados apresentados na extração de DNA em microchip de PT em relação à outras técnicas de extração, inclusive ao método comercial (Qiagen QIAmp) que além da necessidade de aquisição de *kits* não tem potencial para integração com outras etapas, faz dos microchips de PT uma plataforma promissora de baixo custo para análises genéticas.

REFERÊNCIAS

1. MANZ, A.; GRABER, N.; WIDMER, H. M. Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing. **Sensor and Actuators B**, v. 1, n. 1-6, p. 244-248, 1990.
2. VILKNER, T.; JANASEK, D.; MANZ, A. Micro total analysis systems. Recent developments. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 12, p. 3373-3386, 2004.
3. WEST, J.; BECKER, M.; TOMBRINK, S.; MANZ, A. Micro total analysis systems. latest achievements. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 12, p. 4403-4419, 2008.
4. ONG, S.E.; ZHANG, S.; DU, H. J.; FU, Y. Fundamental principles and applications of microfluidic systems. **Frontiers in Bioscience**, v. 13, p. 2757-2773, 2008.

5. EASLEY, C. J.; KARLINSEY, J. M.; BIENVENUE, J. M.; LEGENDERE, L. A.; ROPER, M. G.; FELDMAN, S. H.; HUGHES M. A.; HEWLETT, E. L.; MERKEL, T. J.; FERRANCE, J. P.; LANDERS, J. P. A fully integrated microfluidic genetic analysis system with sample-in-answer-out capability. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.19, n. 19, p. 19272-10277, 2006.
6. VICKERS, J. A.; CAULUM, M. M.; HENRY, C. S. Generation of hydrophilic poly(dimethylsiloxane) for high-performance microchip electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 21, p. 7446–7452, 2006.
7. SHADPOUR, H.; HUPERT, M. L.; PATTERSON, D.; LIU, C.; GALLOWAY, M.; STRYJEWSKI, W.; GOETTERT, J.; SOPER, S. A. Multichannel microchip electrophoresis device fabricated in polycarbonate with an integrated contact conductivity sensor array. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 3, p. 870-878, 2007.
8. HOSMANE, S.; YANG, I. H.; RUFFIN, A.; THAKOR, N.; VENKATESAN, A. Circular compartmentalized microfluidic platform: Study of axon–glia interactions, **Lab on a Chip**, v. 10, n. 6, p. 741-747, 2010.
9. HARRISON, D. J.; FLURI, K.; FAN, Z.; EFFENHAUSER, C. S.; MANZ, A. Micromachining a miniaturized capillary electrophoresis-based chemical analysis system on a chip. **Science**, v. 261, n. 5123, p. 895-897, 1993.
10. EFFENHAUSER, C. S.; MANZ, A.; WIDMER, H. M. Glass chips for high-speed capillary electrophoresis separations with submicrometer plate heights, **Analytical Chemistry**, v. 65, n. 19, p. 2637-2642, 1993.
11. JACOBSON, S. C.; HERGENROTTER, R.; KOUTNY, L. B.; RAMSEY, J. M. High-Speed Separations on a Microchip. **Analytical Chemistry**, v. 66, n. 6, p. 1114-1118, 1994.
12. DUFFY, D. C.; MCDONALD, J. C.; SCHUELLER, O. J. A.; WHITESIDES, G. M. Rapid Prototyping of Microfluidic Systems in Poly(dimethylsiloxane). **Analytical Chemistry**, v. 70, n. 23, p. 4974-4984, 1998.
13. ROBERTS, M. A.; ROSSIER, J. S.; BERCIER, P.; GIRAULT, H. UV laser machined polymer substrates for the development of microdiagnostic systems. **Analytical Chemistry**, v. 69, n. 11, p. 2035 - 2042, 1997.
14. ROSSIER, J. S.; SCHWARZ, A.; REYMOND, F.; FERRIGNO, R.; BIANCHI, F.; GIRAULT, H. H. Microchannel networks for electrophoretic separations. **Electrophoresis**, v. 20, n. 4-5, p. 727-731, 1999.
15. ROSSIER, J. S.; FERRIGNO, R.; GIRAULT, H. H. J. Electrophoresis with electrochemical detection in a polymer microdevice. **Electroanalytical Chemistry**, v. 492, n. 1, p. 15-22, 2000.
16. MARTYNOVA, L.; LOCASCIO, L. E.; GAITAN, M.; KRAMER, G. W.; CHRISTENSEN, R.G.; MACCREHAN, W. A. Fabrication of plastic microfluid channels by imprinting methods. **Analytical Chemistry**, v. 69, n. 23, p. 4783-4789, 1997.

17. LOCASCIO, L. E.; PERSO, C. E.; LEE, C. S. Measurement of electroosmotic flow in plastic imprinted microfluid devices and the effect of protein adsorption on flow rate. **Journal of Chromatography A**, v. 857, n. 1-2, p. 275-284, 1999.
18. CHEN, Y.-H.; WANG, W.-C.; YOUNG, K.-C.; CHANG, T.-T.; CHEN, S.-H. Plastic microchip electrophoresis for analysis of PCR products of hepatitis C virus. **Clinical Chemistry**, v. 45, n. 11, p. 1938-1943, 1999.
19. CHEN, D.-C.; HSU, .-L.; ZHAN, D.-Z.; CHEN, C.-H. Palladium film decoupler for amperometric detection in electrophoresis chips. **Analytical Chemistry**, v. 73, n. 4, p. 758-762, 2001.
20. GRAß, B.; SIEPE, D.; NEYER, A.; HERGENRODER, R. Comparison of different conductivity detector geometries on an isotachophoresis PMMA-microchip. **Fresenius' Journal Analytical Chemistry**, v. 371, n. 2, p. 228-233, 2001.
21. GALLOWAY, M.; SOPER, S. A. Contact conductivity detection of polymerase chain reaction products analyzed by reverse-phase ion pair microcapillary electrochromatography. **Electrophoresis**, v. 23, n. 21, p. 3760-3768, 2002.
22. DO LAGO, C. L.; SILVA, H. D. T.; NEVES, C. A.; BRITO-NETO, J. G. A.; SILVA, J. A. F. A dry process for production devices base on the lamination of laser-printed polyester films. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 15, p. 3853-3858, 2003.
23. COLTRO, W. K. T.; DA SILVA, J. A. F.; DA SILVA, H. D. T.; RICHETER, E. M.; FURLAN, R.; ANGNES, L.; DO LAGO, C. L.; MAZO, L. H.; CARRILHO, E. Electrophoresis microchip fabricated by a direct-printing process with end-channel amperometric detection. **Electrophoresis**, v. 25, n. 21, p. 3832-3838, 2004.
24. HE, F. Y.; LIU, A. L.; YUAN, J. H.; COLTRO, W. K. T.; CARRILHO, E.; XIA, X. H. Electrokinetic control of fluid in plastified laser-printed poly(ethylene terephthalate)-toner microchips. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 382, n. 1, p. 192–197, 2005.
25. DANIEL, D.; GUTZ, I. G. R., Quick production of gold electrode sets or arrays and of microfluidic flow cells based on heat transfer of laser printed toner masks onto compact discs. **Electrochemistry Communication**, v. 5 n. 9, p. 782–790, 2003.
26. LIU, A. L.; HE, F. Y.; WANG, K.; ZHOU, T.; LU, Y.; XIA, X. H. Rapid method for design and fabrication of passive micromixers in microfluidic devices using a direct-printing process. **Lab on a Chip**, v. 5, n. 9, p. 974–978, 2005.
27. DO LAGO, C. L.; DE JESUS, D. P.; SILVA, H. D. T.; NEVES, C. A.; DA SILVA, J. A. F., Microfluidic devices obtained by thermal toner transferring on glass substrate. **Electrophoresis**, v. 25, n. 21-22, p. 3825–383, 2004.
28. COLTRO, W. K. T.; PICCIN, E.; DA SILVA, J. A. F.; DO LAGO, C. L.; CARRILHO, E., A toner-mediated lithographic technology for rapid prototyping of glass microchannels. **Lab on a Chip**, v. 7, n. 7, p. 931–934, 2007.

29. DE JESUS, D. P.; BLANES, L.; DO LAGO, C. L. Microchip free-flow electrophoresis on glass substrate using laser-printing toner as structural material. **Electrophoresis**, v. 27, n. 24, p. 4935–4941, 2006.
30. WOLFE, K. A.; BREADMORE, M. C.; FERRANCE, J. P.; POWER, M. E.; CONROY, J. F.; NORRIS, P. M.; LANDERS, J. P. Toward a microchip-based solid-phase extraction method for isolation of nucleic acids. **Electrophoresis**, v. 23, n. 5, p. 727-733, 2002.
31. BREADMORE, M. C.; WOLFE, K. A.; ARCIBAL, I. G.; LEUNG, W. K.; DICKSON, D.; GIORDANO, B. C.; POWER, M. E.; FERRANCE, J. P.; FELDMAN, S. H.; NORRIS, P. M.; LANDERS, J. P. Microchip-based purification of DNA from biological samples. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 8, p. 1880-1886, 2003.
32. LEGENDERE, L. A.; BIENVENUE, J. M.; ROPER, M. G.; FERRANCE, J. P.; LANDERS, J. P. A simple, valveless microfluidic sample preparation device for extraction and amplification of DNA from nanoliter-volume samples. **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 5, p. 1444-1451, 2006.
33. LEGENDRE, L. A.; MORRIS, C. J.; BIENVENUE, J. M.; BARRON, A.; McCLURE, R.; LANDERS, J. P. Toward a simplified microfluidic device for ultra-fast genetic analysis with sample-in/answer-out capability: application to T-cell lymphoma diagnosis. **Journal of the Association for Laboratory Automation**, v. 13, n. 6, p. 351-360, 2008.
34. COLTRO, W. K. T.; DA SILVA, J. A. F.; CARRILHO, E. Fabrication and integration of planar electrodes for contactless conductivity detection on polyester-toner electrophoresis Microchips. **Electrophoresis**, v. 29, n.11, p. 2260-2265, 2008.
35. LIU, A. L.; HE, F. Y.; HU, Y. L.; XIA, X. H. Plastified poly(ethylene terephthalate) (PET)-toner microfluidic chip by direct-printing integrated with electrochemical detection for pharmaceutical analysis. **Talanta**, v. 68, n. 4, p. 1303-1308, 2006.
36. DUARTE, G. R. M.; PRICE, C. W.; LITTLEWOOD, J. L.; HAVERSTICK, D. M.; FERRANCE, J. P.; CARRILHO, E.; LANDERS, J. P. Characterization of dynamic solid phase DNA extraction from blood with magnetically controlled silica beads, **Analyst**, v. 135, n. 3, p. 531-537, 2010.
37. FENTON, E. M.; MASCARENAS, M. R.; LÓPEZ, G. P.; SIBBETT, M. M. Multiplex lateral-flow test strips fabricated by two-dimensional shaping. **Applied Materials & Interfaces**, v. 1, n. 1, p. 124-129, 2009.
38. YUEN, P. K.; GORAL, V. N. Low-cost rapid prototyping of flexible microfluidic devices using a desktop digital craft cutter. **Lab on a Chip**, v. 10, n. 3, p. 384-387, 2010.

Capítulo 4: Amplificação de DNA via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em microchip de PT

4.1. INTRODUÇÃO

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma reação enzimática *in vitro* que permite a amplificação de uma região específica da molécula de DNA^{1,2}. A PCR envolve o uso de oligonucleotídeos curtos, normalmente de 15 a 20 pares de base (pb), chamados *primers*. Os *primers* possuem uma sequência complementar de uma região específica que se pretende amplificar da molécula de DNA, são misturados com nucleotídeos, $MgCl_2$, uma pequena quantidade de DNA molde e a enzima termicamente estável DNA polimerase (*Taq*), para formar a mistura reacional da PCR, também chamada de *master mix*. Os processos que ocorrem na PCR são controlados pelo ajuste da temperatura da mistura reacional da PCR através do uso de termocicladores². A Figura 4.1 ilustra os três processos que ocorrem durante a PCR.

Figura 4.1 - Esquema ilustrando os processos que ocorrem na PCR. A) Mostra o perfil de um ciclo de aquecimento típico de uma PCR, contendo B) desnaturalização, C) anelamento, e D) extensão da molécula de DNA.

A mistura é inicialmente aquecida para desnaturar as moléculas de DNA, transformando-as em moléculas de DNA fita simples. A temperatura é então diminuída para uma temperatura determinada empiricamente, na qual os *primers* se anelam às fitas simples de DNA, que servem como molde. A temperatura é então elevada novamente para a extensão dos *primers* através da adição de nucleotídeos. Esta etapa é mediada pela ação da enzima da polimerase, resultando na duplicação do número de fragmentos em cada ciclo (após o segundo ciclo). Estes ciclos de temperaturas são repetidos até que se tenha uma quantidade detectável do produto específico da reação de PCR (normalmente são necessários de 30 a 35 ciclos). O primeiro passo da PCR envolve o aquecimento inicial, geralmente entre 93 – 96 °C, para desnaturar as moléculas de DNA. A mistura permanece nesta temperatura por um tempo estendido (cerca de 3 minutos) para garantir que todo DNA está desnaturado. Após esta etapa, a reação é submetida a ciclos de aquecimento através de três temperaturas necessárias para permitir a desnaturação, anelamento dos *primers* e extensão via polimerase. A primeira temperatura do ciclo envolve a desnaturação do DNA, usando a mesma temperatura usada na etapa inicial de desnaturação, porém por um período curto. A temperatura de anelamento (temperatura em que os *primers* se ligam a molécula molde de DNA) é determinada empiricamente; entretanto, a temperatura de *melting* do *primer* proporciona uma boa sugestão do ponto inicial. Esta temperatura pode variar entre 55 – 68 °C e dependerá da porcentagem da composição de nucleotídeos (guanina e citosina), do comprimento e sequência do *primer*.³ Uma vez que os primers se hibridizaram, a temperatura é elevada para 72 -75 °C, na qual a enzima polimerase promove a extensão do primer através da incorporação de nucleotídeos. Após esta etapa, o ciclo é novamente repetido a partir da etapa de desnaturação. A enzima *Taq*

polimerase, derivada da bactéria *Thermus aquaticus*, é uma enzima termoestável e ainda terá 50% da sua atividade enzimática após 9 minutos a 97,5 °C.⁴

Desde que a técnica da PCR foi descrita pela primeira vez há duas décadas atrás⁵, ela se tornou uma ferramenta essencial para análises genéticas. Entretanto, embora os métodos convencionais tenham buscado aumentar a velocidade da reação da PCR, eles ainda consomem muito tempo (1 a 3 horas por amplificação). Segundo Wittwer e Garling⁶, um controle térmico preciso em cada temperatura do ciclo de aquecimento e transições rápidas entre as temperaturas proporcionam uma máxima eficiência da PCR. Enquanto nas técnicas convencionais de PCR os tempos de transição são muito lentos para proporcionar esta máxima eficiência da PCR, a miniaturização da PCR é capaz de atingir este propósito. Além de reduzir significativamente o tempo da reação de amplificação, a miniaturização da PCR também reduz o consumo dos reagentes⁷. A diminuição do volume e o aumento da razão área/volume da superfície, característica das câmaras de reação da PCR em microchips, permitem que a homogeneização da temperatura da solução possa ser obtida muito mais rápido do que nos métodos convencionais da PCR. Sistemas microfluídicos para PCR são capazes de possibilitar ciclos rápidos, bem como integrar a PCR com outras etapas em um microsistema de análise total (μ TAS) para análises genéticas^{8,9,10}.

Os dispositivos microfluídicos para PCR permitem uma variedade de métodos de aquecimento. Alguns grupos¹¹⁻¹⁴ têm escolhido utilizar métodos de aquecimento direto para fornecer ciclos de aquecimento em microchips, similar àqueles usados em termocicladores de bancada. A massa do bloco de metal que precisa ser aquecido é grande quando comparado a mistura reacional da PCR, e desta forma a taxa de aquecimento e resfriamento é limitada pelas propriedades e massa do metal.

Alguns trabalhos na literatura¹⁵⁻¹⁸ descrevem como aumentar a taxa das transições entre as temperaturas, resultando em ciclos mais rápidos sem perda de eficiência da PCR. Neste sentido, transferências rápidas de calor e ciclos de aquecimento mais rápidos foram obtidos através do aumento da razão área/volume da superfície da câmara reacional e com a redução do volume da solução da PCR.

Normalmente, a fonte de aquecimento, o próprio microchip e a mistura reacional da PCR contribuem para o aumento da massa que necessita ser aquecida no sistema da PCR, e o aquecimento deve ser através do microchip para a solução, limitando as taxas de aquecimento e resfriamento. O problema da grande massa que necessita ser aquecida foi eliminado por um novo método de aquecimento, desenvolvido pelo grupo do Prof. James P. Landers, que usa uma lâmpada de tungstênio para aquecer especificamente a solução da PCR^{19,20}. O aquecimento direto da solução ocorre devido a excitação vibracional das moléculas de água pela irradiação de infravermelho produzida pela lâmpada. A massa que necessita ser aquecida é reduzida pela eliminação do aquecimento da câmara reacional do microchip, e pode ser reduzida ainda mais pela redução do volume da solução a ser aquecida. A taxa de resfriamento também é aumentada porque a fonte de resfriamento da solução é independente do resfriamento da fonte de aquecimento. Este método demonstrou ser efetivo para um controle preciso de temperatura e ciclos rápidos de aquecimento de volumes reduzidos^{21,22}.

4.2. OBJETIVO

Este Capítulo tem como objetivo principal verificar a compatibilidade entre o microchip de PT (toner e poliéster) com os reagentes da PCR e realizar a reação de

amplificação nesta plataforma. Para obtenção de um dispositivo integrado de PT para análises genéticas é fundamental a realização da etapa de preparo de amostra correspondente à amplificação da região de interesse da molécula de DNA. Desta forma, procurou-se desenvolver *designs* de microchips de PT para PCR a fim de viabilizar o sucesso desta etapa importante do processo analítico na análise de DNA. Após a confirmação da possibilidade de realizar PCR em microchip de PT, o objetivo secundário é a otimização do processo através da redução de volume e diminuição do tempo total da reação através do uso da radiação infravermelho (IV) como fonte de aquecimento.

4.3. EXPERIMENTAL

4.3.1. Materiais e reagentes

Os reagentes para PCR foram adquiridos junto à Fisher Scientific (Fairlawn, NJ). Os primers para a amplificação do fragmento de 520 pb do λ DNA foram sintetizados pela MWG Biotech (High Point, NC). λ DNA digerido com *HinD* III foi obtido junto à Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). O intercalador de DNA PicoGreen, usado para marcar fluorescentemente as moléculas de DNA, foi adquirido junto à Invitrogen (Carlsbad, CA).

4.3.2. Produção do microchip

Os microchips de PT usados nos experimentos de PCR foram feitos como descrito no item 3.3.2 do Capítulo 3 (Figura 3.1). Em resumo, os microchips foram produzidos através do alinhamento e laminação de quatro filmes de poliéster, sendo que nos dois filmes centrais a região delimitada para o canal era recortada com

auxílio da cortadora a laser, assim como os dispositivos para extração. Os microchips para amplificação de DNA para o uso em termocicladores de bancada foram projetados de modo a conter apenas um canal com as seguintes dimensões: $22\text{ mm} \times 2.4\text{ mm} \times 272\text{ m}$ e volume de $10\text{ }\mu\text{L}$ que serviu como câmara reacional para a PCR. O *layout* do dispositivo é exatamente o mesmo da Figura 3. 2A do Capítulo 3.

O dispositivo para os experimentos de PCR com aquecimento IV foi produzido através do mesmo processo descrito para o microchip para PCR com aquecimento com termociclador, porém o *layout* do dispositivo foi alterado. Para a PCR com aquecimento mediado por radiação IV (IV-PCR) o dispositivo deve conter duas câmaras, uma para o desenvolvimento da PCR e outra para o controle da temperatura através da inserção de um termopar, chamada de câmara de referência. Para os experimentos de IV-PCR o volume das câmaras foi reduzido, para um controle mais preciso de temperatura e para redução do tempo total da reação. A Figura 4.2 mostra o *layout* do dispositivo usado nos experimentos de IV-PCR. A figura mostra as duas câmaras, a câmara na qual se desenvolve a reação da PCR e a câmara de referência, usada para controle da temperatura. Cada câmara tem o volume de $2\text{ }\mu\text{L}$.

Figura 4.2 - Layout do microchip de PT utilizado nos experimentos de IV-PCR.

4.3.3. PCR em termocicladores de bancada

A compatibilidade dos microchips de PT com a PCR foi testada usando λ DNA e *primers* para amplificar um fragmento específico de 520 pb. A princípio, apenas para verificar a possibilidade de amplificação de DNA nos microchips de PT, os experimentos da PCR foram realizados em termocicladores de bancada. Estes experimentos iniciais de amplificação de DNA em microchip de PT foram realizados em um microchip de PT contendo uma câmara reacional com capacidade para 10 μ L.

Um estoque de 60 μ L da mistura reacional da PCR (*master mix*) foi preparada com a seguinte composição:

- 10 mM de Tris-HCl, pH 8,3/ 50 mM KCl
- 2,4 mM de $MgCl_2$
- 0,2 mM de dNTPs
- 0,4 mM de cada primer
- 0,1 unidades/ μ L de Ampli Taq DNA polimerase
- 1 ng/mL de λ DNA
- 0,24 mg/mL de BSA

A solução estoque (*master mix*) foi dividida em duas partes e uma parte sempre era usada para realizar a PCR em tubos levados em termocicladores, que funcionava como controle positivo. Para a PCR em microchip, a câmara reacional era preenchida com 10 μ L da solução estoque, óleo mineral era colocado sobre os reservatórios para impedir a evaporação da solução e em seguida o chip era levado ao termociclador. A amplificação do fragmento de 520 pb do λ DNA realizada em tubo e em microchip foi realizada no termociclador da Perkin Elmer 2400 usando o

seguinte protocolo de aquecimento: 95 °C por 2 minutos (desnaturação inicial), 30 ciclos de 95 °C por 30 segundos (desnaturação), 68 °C por 30 segundos (hibridização e extensão), seguido por 72 °C por 2 minutos (extensão final). Após o término da reação as soluções eram coletadas do microchip e do tubo e os produtos de PCR eram analisados pelo Bioanalyzer 2100 para verificar o sucesso da amplificação. Controle negativo também era realizado simultaneamente ao controle positivo.

4.3.4. IV-PCR em microchip de PT

O termociclador com aquecimento por infravermelho (IV) sem contato usado neste trabalho é um sistema *home-made* desenvolvido no laboratório do Prof. James P. Landers²¹. A Figura 4.3 mostra um desenho esquemático do sistema e a Figura 4.4 mostra uma foto do sistema completo utilizado neste trabalho. O sistema utiliza um computador equipado com um conversor analógico-digital (A/D), uma lâmpada de tungstênio (CXR/CXL, 8V, 50 W, General Electric) como fonte de aquecimento IV e um mini circulador de ar para promover o resfriamento. A radiação é focada na câmara de PCR usando lentes plano-convexas. A temperatura é controlada pelo programa LabVIEW, que monitora a temperatura na câmara de PCR através de um termopar com 5 µm de diâmetro do tipo T (modelo T-240C) obtida na Physitemp Instruments, Clifton, NY. O conversor analógico do termopar (TAC-386-T) foi adquirido junto à Omega Engineering (Stamford, CT) e alimentado por uma bateria alcalina de 9 volts. O sinal referente a temperatura é então amplificado 25 vezes e coletado por uma interface de controle e aquisição de dados (modelo 6024, Nacional Instruments, Austin, Texas) conectado ao *laptop* onde o programa LabVIEW está

instalado e alterna o funcionamento da lâmpada e do circulador de ar para proporcionar o aquecimento e o resfriamento da solução.

Figura 4.3 - Desenho esquemático do sistema de IV-PCR usado neste trabalho.

Figura 4.4 - Foto do sistema completo de IV-PCR utilizado neste trabalho.

A possibilidade de usar o aquecimento por IV para gerar os ciclos de aquecimentos da PCR em microchip de PT foi verificada através da amplificação do fragmento de 520 pb do λ -DNA. Os microchips utilizados nos experimentos de IV-PCR foram fabricados com quatro camadas de filme de poliéster como descrito no 3.3.2 do Capítulo 3. O microchip contém duas câmaras, uma para a reação da PCR e outra câmara de referência para controlar a temperatura, onde o termopar é inserido. Cada câmara possui capacidade de 2 μ L. A mistura reacional da PCR foi preparada com a seguinte composição: 10 mM Tris/50 mM KCl / 2,4 mM de $MgCl_2$ / 0,4 mM de cada primer / 0,2 mM de dNTP / 1 ng/ μ L de λ DNA / 0,24 mg/mL de BSA / 1,5% (v/v) de polietilenoglicol (PEG, MM = 200) / 0,2 unidades/ μ L de Taq polimerase. A câmara da PCR foi preenchida totalmente com 2 μ L da mistura reacional preparada anteriormente e a câmara de referência foi preenchida com 2 μ L de tampão 10 mM Tris/50 mM KCl e em seguida, na câmara de referência, inseriu-se o termopar. Em microchip feito com quatro filmes de poliéster (câmara com 272 μ m de profundidade) o termopar pode ser facilmente inserido na câmara de referência. A Figura 4.5A mostra um dispositivo no qual o termopar está inserido na câmara de referência e a Figura 4.5B mostra uma foto ampliada, tirada em um microscópio eletrônico (Olympus MIC-D) para melhor visualização do termopar dentro da câmara. Após o preenchimento das câmaras adicionou-se óleo mineral em todos os reservatórios para evitar a evaporação da solução.

Figura 4.5 (A) - Foto do dispositivo usado em IV-PCR com o termopar inserido na câmara de referência e (B) - Foto tirada com microscópio eletrônico (Olympus MIC-D) mostrando o termopar dentro da câmara de referência.

O programa de LabVIEW foi então utilizado para controlar a potência da lâmpada de IV para os ciclos de aquecimento da PCR nas seguintes condições: 95 °C por 2 minutos, 30 ciclos de (95 °C por 30 segundos, 68 °C por 30 segundos) e extensão final a 72 °C por 2 minutos.

Após o término da reação o produto da PCR foi coletado e analisado no Bioanalyzer 2100 de acordo com o protocolo do fabricante. Controles positivos e negativos também foram realizados simultaneamente.

4.4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Tradicionalmente as reações da PCR são feitas em tubos plásticos usando termocicladores convencionais. Dispositivos microfluídicos representam a oportunidade de reduzir significativamente o volume dos reagentes da PCR, como mostrado por Easley *et al.*²³ através da amplificação de um fragmento do genoma da bactéria *Bacillus anthracis* a partir de 500 nL de sangue. A redução do volume da PCR proporciona uma redução drástica no tempo necessário para a reação se completar e facilita a integração tanto com a extração quanto com a separação. Por estas razões, atualmente muitos esforços são feitos em direção a realização da PCR

em microdispositivos^{19,24,25}. Os materiais utilizados na fabricação de microchips para PCR são normalmente o vidro²¹, silício²⁶ e polímeros²². Embora o vidro seja o substrato mais popular usado na microfabricação, ele não é o material ideal, pois além do alto custo e elevado tempo do processo de fabricação, a superfície do vidro precisa passar por uma etapa de passivação, para minimizar a adsorção da enzima *Taq* polimerase em sua superfície^{27,28}. A necessidade de uma etapa adicional de passivação de sua superfície torna-se uma desvantagem do uso do vidro como substrato para fabricação de microchips para PCR. Esta desvantagem do uso do vidro têm levado à procura de novos materiais para serem usados como substratos. Por outro lado, os microchips de PT representam uma excelente alternativa de plataformas simples e de baixo custo^{29,30} para o desenvolvimento de dispositivos integrados entre extração e amplificação de DNA, uma vez que o sucesso desta plataforma para realizar extrações já foi demonstrada anteriormente³¹.

Esta parte do trabalho mostra que os reagentes da PCR são compatíveis tanto com o toner quanto com o poliéster, sem a necessidade de passivação da superfície, demonstrando mais uma vez o grande potencial desta plataforma na produção de um dispositivo totalmente integrado para análises genéticas.

4.4.1. PCR em termocicladores de bancada

A integração entre a extração e amplificação de DNA em um único dispositivo é uma área de intenso estudo^{9,23}. Nesta parte do trabalho procurou-se verificar a compatibilidade dos microchips de PT com os reagentes da PCR, fazendo deste dispositivo uma plataforma promissora para produção de μ TAS.

A comprovação da compatibilidade entre o microchip de PT com a bioquímica da PCR foi obtida através do sucesso da amplificação do fragmento de 520 pb do

λ DNA realizada em microchip de PT levado a um termociclador de bancada. Após o término da reação da PCR a solução contendo o produto da amplificação foi coletada da câmara reacional e levada ao Bioanalyzer. A Figura 4.6 mostra o eletroferograma obtido através da detecção do fragmento de 520 pb.

Figura 4.6- Eletroferograma mostrando a amplificação do fragmento de 520 pb do λ DNA em microchip de PT em termociclador de bancada.

4.4.2. IV-PCR em microchip de PT

O aquecimento através de uma lâmpada de tungstênio apresenta diversas vantagens sobre o aquecimento convencional utilizado nos termocicladores. Uma das maiores vantagens do aquecimento por IV é a habilidade em aquecer seletivamente a solução aquosa antes do aquecimento do recipiente em que ela se encontra (neste caso o microchip). Um aquecimento efetivo por IV ocorre se o microchip no qual está a solução não absorve significativamente a luz transmitida. Como o toner é preto, e absorve a luz IV, foi necessário o recobrimento do fundo do microchip da parte que contém toner com folha de papel alumínio, deixando exposta a luz IV somente as câmaras da reação da PCR e a câmara de referência.

Taxa de aquecimento na ordem de 10 °C/s com a lâmpada na intensidade máxima e resfriamento de 10 °C/s com resfriamento induzido foram observados nos microchips de PT com aquecimento por IV. Em contraste, para o aquecimento em termocicladores convencionais as taxas de aquecimento são de 0,9 °C/s e resfriamento de 3,9 °C/s, resultando em um tempo muito maior para completar os ciclos da PCR²⁸.

A Figura 4.7 mostra o perfil de ciclos de aquecimento em um microchip de PT. O perfil de ciclos de aquecimento mostra um ciclo de 50 segundos e um tempo total de amplificação de 26 minutos para 30 ciclos.

Figura 4.7 - Perfil de ciclos de aquecimento mediado por IV em microchip de PT.

A Figura 4.8 mostra o sucesso da amplificação do fragmento de 520 pb do fragmento do λ DNA através da IV-PCR após 30 ciclos de aquecimento.

O sucesso da amplificação de DNA por IV-PCR foi obtido, porém um problema encontrado repetidas vezes durante os experimentos foi a presença de bolhas nas câmaras, tanto da PCR quanto na célula de referência. Estas bolhas crescem com aquecimento, principalmente a 95 °C e em alguns casos podem

ocupar totalmente a câmara da PCR, afastando assim a mistura reacional da fonte de aquecimento e não permitindo que a PCR se desenvolva. Produto de PCR foi observado mesmo na presença de bolha na câmara de PCR desde que a bolha não ocupe totalmente a câmara.

Figura 4.8 - Eletroferograma mostrando a amplificação do fragmento de 520 pb do λ DNA através da IV-PCR.

Produto de amplificação foi obtido também após 20 ciclos de aquecimento mais curtos (10 s à 95 °C e 10 s à 68 °C) resultando em um tempo total de PCR de 10 minutos, indicando o grande potencial de redução do tempo total de análise desta plataforma.

Os primeiros experimentos de amplificação de DNA através da IV-PCR em microchip de toner não obtiveram sucesso, e a primeira amplificação só foi obtida após a adição de polietilenoglicol (PEG) na mistura reacional da PCR como fez Giordano *et al*²² na amplificação de DNA em microchip de poliimida. A adição de PEG na mistura reacional da PCR diminui a adsorção da enzima na superfície da

câmara reacional, fazendo com que ela esteja totalmente disponível para a reação de amplificação.

Figura 4.9 (A) - Eletroferograma mostrando a ausência de DNA amplificado em uma mistura reacional que não contém PEG. (B) - Eletroferograma mostrando a amplificação do fragmento de 520 pb do λ DNA contendo PEG na mistura reacional da PCR.

A Figura 4.9 mostra dois eletroferogramas, o primeiro é de uma PCR sem PEG na mistura reacional da PCR (A) e no segundo foi adicionado PEG (B). As duas reações de PCR foram realizadas em sequência. Após a confirmação de que a presença de PEG era fundamental para o sucesso da PCR realizada em microchips de PT com aquecimento com IV, em todos os experimentos envolvendo IV-PCR foram adicionados PEG na mistura reacional da PCR.

4.5. CONCLUSÃO

Os microchips de PT demonstraram novamente seu grande potencial para produção de dispositivos integrados para análises genéticas, através do sucesso da realização da reação da PCR. A PCR constitui uma etapa fundamental do preparo de amostra em análises genéticas e a produção de um dispositivo integrado para este fim deve obrigatoriamente contemplar esta etapa. O microchip de PT mostrou ser compatível com os reagentes da PCR através da amplificação do fragmento de 520 pb do λ DNA. Enquanto o termociclador de bancada foi usado para a verificação inicial do sucesso da reação de amplificação nos microchips de PT, o aquecimento mediado por radiação infravermelho proporcionou a redução do volume da reação, tornando o sistema mais adequado para integração, tanto com a extração quanto com a eletroforese. A redução de volume e o controle preciso da temperatura, proporcionado pelo aquecimento com IV, demonstraram grande potencial de redução no tempo total da reação da PCR.

Os microchips de PT demonstraram ser uma excelente alternativa para produção de microchips para PCR, que associa um processo de fabricação extremamente simples e de baixo custo dos dispositivos, com uma superfície apropriada para o desenvolvimento da reação da PCR sem a necessidade de

passivação da superfície. Além disso, os microchips de PT são descartáveis, o que elimina o problema de contaminação e possibilidade de amplificação de regiões indesejadas da molécula de DNA. Todas estas vantagens tornam os microchips de PT uma plataforma extremamente promissora para reações de PCR, além do grande potencial de produção de μ TAS para análises genéticas.

REFERÊNCIAS

1. BROWN, T. A. **Genomes**, 2 ed., New York: Wile-Liss, 2002. 572 p.
2. INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J. M; WHITI, J. J. **PCR Protocols: a guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press, 1990. 482 p.
3. WITTEWER, C. T.; HERMAN, M. G. **Rapid thermal cycling and PCR kinetics**, em **PCR Methods Manual**. San Diego: Academic Press, 1999. p. 211-229.
4. PERLER, F. B. K.; KONG, H. **Advances in protein chemistry**. San Diego: Academic Press, 1996. v. 48, p. 377-430.
5. MULLIS, K.; FALOONA, F.; SCHARF, S.; SAIKI, R.; HORNA, G.; ERLICH, H. Genetic diagnosis - development of new methodologies: specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 51, p. 263-273, 1986.
6. WITTEWER, C. T.; GARLING, D. J. Rapid cycle DNA amplification: time and temperature optimization. **Biotechniques**, v.10, n. 1, p. 76-83, 1991.
7. ROPER, M. G.; EASLEY, C. J.; LANDERS, J. P. Advances in polymerase chain reaction on microfluidic chips. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 12, p. 3887-3894, 2005.
8. EASLEY, C. J.; HUMPHREY, J. A. C.; LANDERS, J. P. Thermal isolation of microchip reaction chambers for rapid non-contact DNA amplification. **Journal of Micromechanics and Microengineering**, v. 17, n. 9, 1758-1766, 2007.
9. LEGENDRE, L. A.; BIENVENUE, J. M.; ROPER, M. G.; FERRANCE, J. P, LANDERS, J. P. A simple, valveless microfluidic sample preparation device for extraction and amplification of DNA from nanoliter-volume samples, **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 5, p. 1444-1451, 2006.
10. EASLEY, C. J.; KARLINSEY, J. M.; LANDERS, J. P. On-chip pressure injection for integration of infrared-mediated DNA amplification with electrophoretic separation. **Lab on a Chip**, v. 6, n. 5, p. 601-610, 2006.

11. KOPP, M. U.; MELLO, A. J.; MANZ, A. Chemical amplification: continuous-flow PCR on a chip. **Science**, v. 280, n. 5366, p. 1046-1048, 1998.
12. HASHIMOTO, M.; CHEN, P. C.; MITCHELL, M. W.; NIKITOPOULOS, D. E.; SOPER, S. A.; MURPHY, M. C. Rapid PCR in a continuous flow device. **Lab on a Chip**, v. 4, n. 6, p. 638-645, 2004.
13. LAGALLY, E. T.; SCHERER, J. R.; BLAZEJ, R. G.; TORIELLO, N. M.; DIEP, B. A.; RAMCHANDANI, M.; SENSABAUGH, G. F.; RILEY, L. W.; MATHIES, R. A. Integrated portable genetic analysis microsystem for pathogen/infectious disease detection. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 11, p. 3162-3170, 2004.
14. KRISHNAN, M.; AGRAWAL, N.; BURNS, M. A.; UGAZ, V. M. Reactions and fluidics in miniaturized natural convection systems. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 21, p. 6254-6265, 2004.
15. WITTEWER, C.; FILLMORE, G.; GARLING, D. Minimizing the time required for DNA amplification by efficient heat-transfer to small samples. Minimizing the time required for DNA amplification by efficient heat transfer to small samples. **Analytical Biochemistry**, v. 186, n. 2, p. 328-331, 1990.
16. WITTEWER, C.; FILLMORE, G.; HILLYARD, D. Automated polymerase chain-reaction in capillary tubes with hot air. **Nucleic Acids Research**, v. 17, n. 11, p. 848-4357, 1989.
17. SWERDLOW, H.; JONES, B.; WITTEWER, C. Fully automated DNA reaction and analysis in a fluidic capillary instrument. **Analytical Chemistry**, v. 69, n. 5, p. 848-855, 1997.
18. IBRAHIM, M.; LOFTS, R.; JAHRLING, P.; HENCHAL, E.; WEEDN, V.; NORTHROP, M.; BELGRADER, P. Real-time microchip PCR for detecting single-base differences in viral and human DNA. **Analytical Chemistry**, v. 70, n. 9, p. 2013-2017, 1998.
19. ODA, R.; STRAUSBAUCH, M.; BORSON, N.; HÜHMER, A.; JURRENS, S.; CRAIGHEAD, J.; WETTSTEIN, P.; ECKLOFF, B.; KLINE, B.; LANDERS, J. P. Infrared-mediated thermocycling for ultrafast polymerase chain reaction amplification of DNA. **Analytical Chemistry**, v. 70, n. 20, p. 4361-4368, 1998.
20. HÜHMER, A.; LANDERS, J. P. Noncontact infrared-mediated thermocycling for effective polymerase chain reaction amplification of DNA in nanoliter volumes. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 21, p. 5507-5512, 2000.
21. ROPER, M. G.; EASLEY, C. J.; LEGENDRE, L. A.; HUMPHREY, J. A. C.; LANDERS, J. P. Infrared temperature control system for a completely noncontact polymerase chain reaction in microfluidic chips. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 4, p. 1294-1300, 2007.
22. GIORDANO, B. C.; FERRANCE, J. P.; SWEDBERG, S.; HÜHMER, A.; LANDERS, J. P. Polymerase chain reaction in polymeric microchips: DNA

amplification in less than 240 seconds. **Analytical Biochemistry**, v. 291, n. 1, p. 124-132, 2001.

23. EASLEY, C. J.; KARLINSEY, J. M.; BIENVENUE, J. M.; LEGENDERE, L. A.; ROPER, M. G.; FELDMAN, S. H.; HUGHES M. A.; HEWLETT, E. L.; MERKEL, T. J.; FERRANCE, J. P.; LANDERS, J. P. A fully integrated microfluidic genetic analysis system with sample-in-answer-out capability. **Proceedings of the National Academy Sciences**, v. 103, n. 51, p. 19272-10277, 2006

24. NIU, Z. Q.; CHEN, W. Y.; SHAO, S. Y.; JIA, X. Y.; ZHANG, W. P. DNA amplification on a PDMS-glass hybrid microchip. **Journal of Micromechanics and Microengineering**, v. 16, n. 2, p. 425-433, 2006.

25. EASLEY, C. J.; HUMPHREY, J. A. C.; LANDERS, J. P. Thermal isolation of microchip reaction chambers for rapid non-contact DNA amplification **Journal of Micromechanics and Microengineering**, v. 17, n. 9, p. 1758-1766, 2007.

26. WILDING, P.; SHOFFNER, M. A.; KRICKA, L. J. PCR in a silicon microstructure. **Clinical Chemistry**, v. 40, n. 9, p. 1815-1818, 1994.

27. KRISHNAN, M.; BURKE, D. T.; BURNS, M. A. Polymerase chain reaction in high surface-to-volume ratio SiO₂ microstructures. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 22, p. 6588-6593, 2004.

28. LEGENDRE, LINDSAY ANN. **Advancements in totally integrated microdevices for clinical diagnostics**. 2007. 177 f. Tese (Doctor of Philosophy) - University of Virginia, Charlottesville, 2007.

29. COLTRO, W. K. T.; CARRILHO, E. Low-cost technologies for microfluidic applications. In: Landers, J. P., (Ed), **Handbook of Capillary and Microchip Electrophoresis and Associated Microtechniques**, 3 ed. New York: CRC, 2007. p. 1169-1184.

30. COLTRO, W. K. T.; LUNTE, S. M.; CARRILHO, E. Comparison of the analytical performance of electrophoresis microchannels fabricated in PDMS, glass, and polyester-toner. **Electrophoresis**, v. 29, p. 4928-4937, 2008.

31. DUARTE, G. R. M.; PRICE, C. W.; LITTLEWOOD, J. L.; HAVERSTICK, D. M. FERRANCE, J. P.; CARRILHO, E.; LANDERS, J. P. Characterization of dynamic solid phase DNA extraction from blood with magnetically controlled silica beads. **Analyst**, v. 135, n. 3, p. 531-537, 2010.

Capítulo 5: Separação eletroforética de DNA em microchip de Poliéster- Toner (PT)

5.1. INTRODUÇÃO

Em 1992, Manz e seus colaboradores^{1,2} realizaram pela primeira vez uma separação eletroforética em microchip. Dois compostos fluorescentes, fluoresceína e calceína, foram separados em um microchip construído de vidro e silício, utilizando fluorescência induzida a laser (LIF) como método de detecção. Embora o tempo de análise não tenha sido significativamente reduzido quando comparado a separação eletroforética em capilar (CE), houve uma redução drástica em relação ao volume consumido de amostra e reagentes. Logo depois, separações mais rápidas foram sendo publicadas na literatura. Seiler e colaboradores³ separaram três aminoácidos – arginina, fenilalanina e glutamina em menos de 120 segundos utilizando um canal de separação com comprimento de 9,6 cm. Ramsey e colaboradores⁴ reduziram o comprimento do canal de separação para 0,9 mm e separaram fluoresceína de rodamina B em fração de segundos (150 milisegundos). Desde então, a eletroforese em microchip se tornou uma ferramenta poderosa de separação devido às vantagens associadas à miniaturização, como i) curto tempo de análise, ii) alta resolução na separação, iii) baixo consumo de amostra e de reagentes, iv) fácil automação e v) grande versatilidade tanto para aplicações de rotina quanto para pesquisa, além da sua característica mais interessante: a capacidade de integração com outras etapas do processo analítico⁵⁻⁸.

A primeira separação rápida de oligonucleotídeos marcados fluorescentemente foi demonstrada em 1994 em um microchip de polidimetilsiloxano (PDMS) usando hidroxipropilcelulose (HPC) como meio de separação⁹. Com a aplicação de um campo elétrico elevado (2300 V cm^{-1}), oligonucleotídeos de fita simples foram separados em menos de 45 segundos, sendo o comprimento efetivo do canal de separação de 3,8 cm. No mesmo ano, fragmentos de DNA com mais de

1000 pares de base foram analisados em microchip de vidro. Usando um canal de separação de 3,5 cm de comprimento e hidroxietilcelulose (HEC) como meio separação, fragmentos de restrição ϕ X174 *Hae*III foram separados em 120 segundos¹⁰. Desde então, vários estudos foram realizados utilizando dispositivos microfluídicos para separação de DNA¹¹⁻¹⁴.

Uma grande variedade de substratos pode ser utilizada para a fabricação dos microdispositivos para separação eletroforética, sendo o vidro o substrato mais popular devido as características bem conhecidas da superfície e métodos de microfabricação bem desenvolvidos, adaptados da indústria microeletrônica. Os canais nos microchips de vidro são fabricados usando métodos fotolitográficos associados com técnicas de corrosão química (em via seca ou úmida), com o dispositivo vedado termicamente (em temperaturas da ordem de 500-700°C) usando uma tampa de vidro contendo orifícios para acesso aos microcanais. Além do vidro, o quartzo foi também utilizado como substrato para a fabricação de microdispositivos para eletroforese, embora o custo seja relativamente maior quando comparado com o vidro¹⁵.

Embora o vidro e o quartzo apresentem vantagens como baixa condutividade elétrica e alta condutividade térmica, o que permite a aplicação de altos potenciais, além da transparência ideal para métodos óticos de detecção, os processos de fabricação dos microdispositivos são laboriosos, demorados e apresentam alto custo por dispositivo¹⁶. Além disso, os processos litográficos requerem instrumentação sofisticada, de alto custo, e ambientes limpos. Por estas razões, métodos alternativos mais simples e de baixo custo são extremamente importantes para a microfluídica.

Como resultado da busca por métodos alternativos, a introdução de novos materiais ofereceu novos caminhos para prototipagem rápida e de baixo custo de microdispositivos. Neste sentido, devido ao baixo custo de certos materiais poliméricos, estes têm se tornado uma alternativa excelente ao vidro e ao quartzo para a produção mais simples e barata de dispositivos microfluídicos. Assim, o PDMS se tornou o polímero mais popular para a produção alternativa dos microdispositivos¹⁷. Além do PDMS, outros polímeros como poli(metil metacrilato) (PMMA)¹⁸, poli(carbonato) (PC)¹⁹, poli(etileno tereftalato) (PET)²⁰ e poli(uretana) (PU)²¹ foram utilizados com sucesso como substratos para a produção de microchips para eletroforese. Uma das principais vantagens do uso de polímeros para fabricação de microdispositivos é que eles não exigem que o processo de microfabricação seja realizado em sala limpa. Os microdispositivos poliméricos podem ser fabricados por diferentes técnicas como: ablação a laser²², moldagem por injeção²³, litografia suave²⁴ e litografia por impressão²⁵. Embora algumas vezes estas técnicas sejam mais simples que aquelas utilizadas para fabricação de microdispositivos de vidro, ela ainda requer instrumentação sofisticada para a produção do molde ou réplica.

De todos os métodos alternativos, o método de impressão direta é o método mais simples, rápido e barato de produção de microdispositivos para eletroforese. O método de impressão direta descrito por Lago e colaboradores²⁶ em 2003 baseia-se na impressão direta da imagem dos canais em um filme de poliéster usando uma impressora a laser. O padrão pode ser desenhado em *Corel Draw* ou outro programa de desenho de imagens. A impressora produz a imagem enviada pelo computador através de uma série de pontos. Sendo assim, a resolução da impressora normalmente é dada em *dpi (dots per inch)*. O *layout* dos canais é impresso no filme

de poliéster pela deposição de uma camada de toner ($\sim 6 \mu\text{m}$) e os canais microfluídicos são definidos pelas linhas brancas (região sem toner). A base do dispositivo que contém o *layout* dos canais é laminada junto a outro filme de poliéster, vedando assim o dispositivo. Quando a tampa do dispositivo é um filme branco de poliéster sem toner, o dispositivo final possui uma camada de toner simples (CTS) e os canais possuem uma altura de $6 \mu\text{m}$. Quando o dispositivo é vedado contra outra lâmina contendo a sua imagem especular impressa, o dispositivo final possui uma camada de toner dupla (CTD) e os canais possuem uma altura de $12 \mu\text{m}$.

5.2. OBJETIVO

Esta parte do trabalho tem como objetivo principal realizar a separação eletroforética por tamanho (sizing) de DNA em microchip de PT usando detecção por LIF e definição de parâmetros como: preenchimento do canal microfluídico com a matriz de separação, aplicação do campo elétrico para injeção e separação, eficiência de separação e linearidade do método.

O sucesso da extração e amplificação de DNA em microchip de PT, mostrado nos Capítulos 3 e 4 respectivamente, representa um grande avanço em direção a produção de um microchip de PT totalmente integrado para análises genéticas. Desta forma, a realização da última etapa da análise de DNA, que requer a separação e detecção de DNA, constitui uma etapa essencial para obtenção do objetivo maior desta Tese.

5.3. EXPERIMENTAL

5.3.1. Produção do dispositivo de PT

Os microdispositivos de PT para separação eletroforética de DNA foram fabricados através do processo de impressão direta. As etapas de produção do dispositivo estão ilustradas na Figura 5.1. Primeiramente, o padrão dos canais desenhados em *Corel Draw* foram impressos em um filme de poliéster (modelo GC 3300, 3M, Sumaré-SP) usando-se uma impressora a Laser (LaserJet 2200, Hewlett Packard). A impressão foi realizada com uma resolução de 600 *dpi*. A estrutura dos canais foi definida por uma camada de toner dupla, sendo o desenho do padrão do dispositivo e sua imagem especular laminados juntos, resultando assim em um canal com 12 μm de altura após a vedação. A vedação dos canais (etapa IV) foi realizada pelo processo de laminação térmica utilizando uma laminadora modelo AC91-230 (Gazela, Divinópolis-MG, Brasil) operando a 120 °C. Nesta temperatura ocorre a fusão do toner provocando a vedação do dispositivo. Antes da etapa de laminação, foram feitos furos diretamente nos reservatórios da tampa com o auxílio de um perfurador de papel. Após a laminação, bases de ponteiros de pipetadores de 100 μL foram coladas com o auxílio de uma resina epóxi para criar os reservatórios para as soluções.

Figura 5.1 - Representação das etapas dos processos de microfabricação dos dispositivos. (I). Filme de poliéster, (II). Filme de poliéster impresso com o desenho dos canais, (III). Alinhamento das duas partes, base e topo, (IV). Laminação, (V). Dispositivo pronto com os reservatórios (a).

A Figura 5.2 mostra o desenho esquemático do microchip utilizado nos experimentos de separação de DNA. Os canais foram projetados com largura de 200 μm e altura de 12 μm . O comprimento dos canais de injeção e separação foi igual a 10 e 40 mm respectivamente.

Figura 5.2 - Layout do microdispositivo de PT. (1). Reservatório da amostra, (2). Reservatório do tampão de corrida, (3) reservatório de descarte da amostra e (4) reservatório de descarte do tampão.

5.3.2. Separação eletroforética de um padrão de DNA de 100 a 1000 pb

5.3.2.1. Preparo do microchip

Primeiramente os canais foram preenchidos com uma solução 0,5% de hidroxietilcelulose (HEC 90-105 kDa) por capilaridade, adicionando 25 μL da solução de 0,5% de HEC no reservatório do tampão. O tempo para preenchimento dos microcanais foi de aproximadamente 2 minutos. Após esta etapa, adicionou-se 25 μL de 0,1 $\times$ TE (1 mM Tris/0,1 mM EDTA, pH 8,0) no reservatório do tampão de corrida contendo os 25 μL da solução de 0,5% de HEC e o reservatório de descarte do tampão foi preenchido do mesmo modo que o reservatório do tampão. Em seguida, nos reservatórios da amostra e descarte da amostra foram preenchidos com 50 μL de tampão (0,1 $\times$ TE). Para verificar se os canais de injeção e separação foram totalmente preenchidos e que não havia bolhas no interior do canal, aplicou-se um campo elétrico de 200 V cm^{-1} tanto no canal de injeção quanto no canal de separação. Quando a corrente eletroforética apresentava-se estável, indicava que o preenchimento do canal estava uniforme, não existindo bolhas na matriz polimérica. Nos casos em que a corrente eletroforética apresentava-se instável, indicando a presença de bolhas, a matriz polimérica presente no canal microfluídico era substituída no mesmo microchip ou utilizava-se um novo microchip. Após a etapa de estabilização da corrente e condicionamento da matriz polimérica, o tampão contido no reservatório da amostra foi substituído por 50 μL da amostra marcada fluorescentemente com Picogreen. A amostra de DNA marcador de tamanho de 100 pb teve a concentração final, após a marcação com Picogreen, de 25 ng μL^{-1} .

5.3.2.2. Introdução da amostra

A amostra foi introduzida no canal de separação através do modo de injeção eletrocinético. Para uma melhor compreensão do modo de introdução da amostra a Figura 5.3 ilustra o esquema do modo de injeção utilizado. Para realizar a introdução da amostra um potencial de 300 V foi aplicado entre os reservatórios 1 (amostra) e 3 (descarte da amostra) durante 30 s com os eletrodos de platina inseridos nos reservatórios. Após os 30 s o potencial aplicado entre os eletrodos contidos nos reservatórios 1 e 3 foram desligados e foi então aplicado o potencial no canal de separação através dos eletrodos inseridos no reservatórios 2 (tampão de corrida) e 4 (descarte do tampão). As separações eletroforéticas foram realizadas sob a aplicação de campo elétrico entre 100 e 300 V cm⁻¹.

Figura 5.3 - Representação do modo de introdução eletrocinética da amostra. 1, 2, 3 e 4 são respectivamente os reservatórios da amostra, tampão, descarte da amostra e descarte do tampão. AT representa o reservatório onde a alta tensão foi aplicada.

5.3.2.3. Detecção por Fluorescência Induzida a Laser (LIF)

A detecção por LIF foi realizada utilizando um equipamento feito sob encomenda (produzido por IS BIOTECH, Porto Alegre-RS) equipado com um laser de argônio (LaserPhysics, Salt Lake City-UT, EUA) com excitação em 488 nm e emissão em 520 nm e potência de 1 a 50 mW. O sinal de fluorescência captado e amplificado por uma fotomultiplicadora foi enviado a uma interface analógica/digital e monitorado em tempo real usando um *software* escrito em LabVIEW® Student Edition 8.0. A detecção foi realizada a 34 mm do ponto de introdução da amostra.

5.3.3. Detecção de um fragmento de 520 pb amplificado por PCR

Além da separação de DNA a partir de um padrão marcador de tamanho entre 100 e 1000 pb, realizou-se também a separação e detecção do fragmento de 520 pb amplificado pela reação de PCR a partir do λ DNA.

A amplificação do fragmento de 520 pb do λ DNA foi realizada no termociclador da Perkin Elmer 2400 usando o seguinte protocolo de aquecimento: 95 °C por 2 minutos (desnaturação inicial), 30 ciclos de 95 °C por 30 segundos (desnaturação), 68 °C por 30 segundos (hibridização e extensão), seguido por 72 °C por 2 minutos (extensão final). Um estoque de 50 μ L da mistura reacional da PCR foi preparado com a seguinte composição: 10 mM Tris/50 mM KCl / 2,4 mM de $MgCl_2$ / 0,4 mM de cada primer / 0,2 mM de dNTP / 1 ng/ μ L de λ DNA / 0,24 mg/mL de BSA / 1.5% (v/v) de polietilenoglicol (PEG, MM = 200) / 0,2 unidades/ μ L de Taq polimerase.

Após o término da reação da PCR, a solução contendo o produto amplificado foi retirada do microchip e uma alíquota de 1 μ L foi utilizada para detecção do

fragmento de 520 pb no Bioanalyzer 2100 de acordo com o protocolo do fabricante. Para a separação do fragmento de 520 pb em microchip de PT, 2 μL da solução contendo o produto da reação de PCR foram adicionados a 18 μL de tampão 1 $\times$ TE pH 8,0 e 20 μL de PicoGreen 1% e a amostra foi então incubada no escuro por 10 min. Os 40 μL da amostra preparada foram adicionados no reservatório da amostra do microchip com os canais já preenchidos com a matriz de separação. Todos os outros reservatórios foram preenchidos também com 40 μL de solução tampão (1 $\times$ TE pH 8,0). A matriz utilizada para este experimento foi HPC 1% em 1 $\times$ TE pH 8,0. As dimensões do canal foram as mesmas descritas no item 2.1. A detecção por LIF foi realizada com mesmo equipamento descrito no item 5.3.2.3, entretanto a detecção foi realizada a 32 mm do ponto de introdução da amostra. O modo de injeção foi realizado da mesma forma como descrito no item 5.3.2.2 e a separação foi realizada sob a aplicação de um campo elétrico de 250 V cm^{-1} .

5.4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.4.1. Separação do padrão de DNA de 100 a 1000 pb

Inicialmente as separações eletroforéticas do padrão de DNA marcador de tamanho de 100 a 1000 pb foram realizadas sob a aplicação de diferentes valores de campo elétrico. Sob a aplicação de 100 V cm^{-1} no canal de separação o tempo total de análise foi elevado (12 min) e os picos apresentaram-se bastante alargados. Sob a aplicação de 200 V cm^{-1} a resolução foi maior que 1 para todos os picos e o tempo de análise foi reduzido para 4 min. Sob a aplicação de um campo elétrico de 300 V cm^{-1} a resolução entre os picos maiores que 700 bp foi menor que 1. Desta forma a separação foi otimizada sob a aplicação de 200 V cm^{-1} . A Tabela 5.1 mostra

a resolução entre todos os picos, calculada através da fórmula $R_s = 2\Delta t_m / (W_{1b} + W_{2b})$ sob a aplicação de um campo elétrico de 200 V cm^{-1} . Os valores apresentados na Tabela 5.1 mostram que a separação realizada sob aplicação de 200 V cm^{-1} apresenta resolução (R_s) maior que 1 entre todos os picos. A separação realizada sob a aplicação de 200 V cm^{-1} apresentou a melhor relação entre tempo de análise e resolução maior que 1 para todos os picos. Desta forma, o campo elétrico mais indicado para a separação de fragmentos entre 100 e 1000 pb em microchip de PT usando HPC 0,5% como matriz de separação foi 200 V cm^{-1} .

Tabela 5.1 - Resolução calculada entre os picos, usando a fórmula $R_s = 2\Delta t_m / (W_{1b} + W_{2b})$ sob a aplicação de 200 V cm^{-1} .

Pares de base (pb)	R_s
100/200	1,20
200/300	2,06
300/400	2,58
400/500	2,73
500/600	2,10
600/700	1,68
700/800	1,65
800/900	1,59
900/1000	1,04

A Figura 5.4 mostra um eletroferograma típico da separação dos fragmentos do marcador de tamanho molecular de 100 pb sob a aplicação de um campo elétrico de 200 V cm^{-1} .

Figura 5.4 - Eletroferograma mostrando a separação de marcador de fragmentos de DNA de 100 pb sob a aplicação de 200 V cm^{-1} . O fragmento de 500 pb é cerca de 3× mais concentrado do que os demais fragmentos.

5.4.2. Eficiência de separação

A eficiência de separação, avaliada pelo número de pratos, é um parâmetro importante para avaliar a capacidade do sistema em distinguir moléculas de DNA de tamanho próximo, ou seja, a menor diferença possível de ser visualizada entre duas moléculas de DNA. A Tabela 5.2 mostra a eficiência de separação calculada para todos os picos, considerando a largura à meia altura do pico.

Tabela 5.2 - Eficiência de separação calculada usando a fórmula $N = 5,55 (t_m/W_{h/2})^2$ sob a aplicação de 200 V cm^{-1} no canal de separação.

Fragmentos (pb)	*N_{h/2} (pratos por metro)
100	138.000
200	73.000
300	78.000
400	176.000
500	215.000
600	95.000
700	154.300
800	178.000
900	143.600
1000	231.000

Tian²⁷ realizou uma separação de DNA em microchip de vidro usando a mesma matriz de separação (HEC) e encontrou um valor de eficiência de separação de 683.000 pratos/m para uma fragmento de 504 pb em um microchip de vidro com 8,5 cm de comprimento. Para a separação de DNA em microchip de PT um fragmento de 500 pb apresentou uma eficiência de 215.000 pratos/m. O valor de eficiência de separação encontrada para o fragmento de 500 pb nas condições descritas acima foi cerca de três vezes menor do que a encontrada por Tian em microchip de vidro para num fragmento de tamanho similar. As diferenças podem estar relacionadas a qualidade dos canais, inerente ao processo de fabricação dos microchips de PT.

5.4.3. Influência do campo elétrico na mobilidade

O aumento da intensidade do campo elétrico afetou a mobilidade eletroforética dos fragmentos maiores (maior que 500 pb) assim como era esperado, uma vez que o aumento do campo elétrico promove o estiramento das moléculas maiores de DNA induzindo a uma reptação com estiramento. A Figura 5.5 mostra a relação entre $\log 1/\text{pb}$ *versus* $\log$ da mobilidade dos fragmentos sob a aplicação de campo elétrico variáveis. Pode-se observar que quanto mais alto é o campo elétrico maior é o efeito na mobilidade dos fragmentos maiores. Embora o uso de campo elétrico mais baixo seja mais adequado para minimizar o efeito da variação na mobilidade dos fragmentos maiores, valores de campo elétrico muito baixo proporcionam análises muito demoradas. O ideal é balancear os dois parâmetros: o campo elétrico aplicado e o tempo de análise.

Figura 5.5 - Mobilidade do DNA versus tamanho dos fragmentos (pb) sob a aplicação de diferentes campos elétricos.

5.4.4. Linearidade

Para uma determinação precisa do tamanho de um fragmento de DNA dentro de uma determinada faixa, o ideal é que exista uma relação de linearidade entre o log do número de pares de base dos fragmentos e o log da mobilidade. Em uma situação ideal, quando r^2 é maximizado para toda a extensão ($r^2 = 1$), todos os fragmentos irão migrar de acordo com um mecanismo de separação, ou seja, eles apresentarão o mesmo comportamento em relação ao mecanismo de separação. Na prática, quando r^2 aumenta, um mecanismo de separação é favorecido sobre os outros. A Figura 5.6 mostra o gráfico de log pb *versus* log μ para a separação dos fragmentos de 100 a 1000 pb sob a aplicação de um campo elétrico de 200 V cm^{-1} .

Figura 5.6 - Linearidade entre o log pb versus log da mobilidade dos fragmentos entre 200 e 1000 pb com $r^2 = 0,9974$.

Como pode ser observado na Figura 5.6 a faixa linear entre o log pb *versus* log mobilidade compreende os fragmentos entre 200 e 1000 pares de base. Dentro da faixa dos fragmentos estudados, a reptação é o mecanismo de separação que predomina, sendo que apenas o fragmento de 100 pb apresenta um desvio da linearidade. O mecanismo de separação que predomina para fragmentos menores é o de Ogston. Neste caso, o ponto correspondente ao fragmento de 100 pb foi eliminado para o cálculo do ajuste da reta, obtendo assim para a região entre 200 e 1000 pb um $r^2 = 0,9974$. Os dados são concordantes com Catai e colaboradores²⁸ que encontraram um $r^2 = 0,9948$ para os fragmentos entre 201 e 2036 pb em uma separação realizada em capilar e HEC 140 – 160 kDa como matriz de separação.

5.4.5. Injeções sequenciais da amostra em mesmo chip e mesma matriz

Com o objetivo de verificar o número de vezes que se pode utilizar a mesma matriz de separação inserida no canal do microchip de PT, fez-se várias injeções sequenciais de uma amostra padrão de DNA. A Figura 5.7 mostra cinco injeções sequenciais do padrão de DNA marcador de tamanho de 100 a 1000 pb. Observou-se que para quatro injeções consecutivas as separações apresentaram-se reproduzíveis o suficiente para demonstrar que é possível realizar replicatas para uma mesma amostra. Nestas separações não houve alteração evidente no tempo de migração e eficiência de separação, mostrando assim que é possível utilizar mais de uma vez o microchip de PT sem a necessidade de troca da matriz, o que pode aumentar a confiabilidade da análise, partindo de replicações de um mesmo resultado. A partir da quinta injeção consecutiva na mesma matriz observou-se uma deterioração na relação sinal ruído, comprometendo desta forma a utilização de um

mesmo microchip de PT com a mesma matriz de separação apenas a partir da quinta separação.

Embora o microchip de PT seja considerado descartável (pelo baixo custo), mais de uma separação foram realizadas consecutivamente no mesmo microchip utilizando a mesma matriz de separação. Com isso, verificou-se que é possível reutilizar a mesma matriz polimérica em um único dispositivo várias vezes. Equipamentos comerciais para a separação de DNA, como o Bioanalyzer, utilizam microchips vendidos em *kits*, que podem ser utilizados uma única vez. A grande desvantagem é o alto custo por chip (US\$ 40,00), que é descartado após uma única corrida. Mesmo que sejam feitas 12 corridas por chip, o custo por corrida é cerca de US\$ 3,50 em relação a plataforma, o que significa um custo muito maior quando comparado ao microchip de PT, que custa menos de US\$ 0,15 por chip. Outra vantagem dos microchips de PT é o baixo valor de EOF ($0,35 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$) que permite que o microchip de PT seja utilizado para separação de DNA utilizando uma matriz polimérica sem a necessidade de nenhum tratamento do canal²⁹.

Figura 5.7 - Cinco injeções sequencias da amostra de DNA marcador de tamanho de 100 a 1000 pb em um mesmo microchip e mesma matriz de separação. Em vermelho (primeira injeção), azul (segunda), preto (terceira) e verde (quarta) e roxo (quinta).

5.4.6. Separação de um fragmento de DNA produto de uma reação de PCR

A Figura 5.8 mostra o eletroferograma obtido a partir da separação e detecção do fragmento de pb no microchip de PT. O sistema mostrou ser capaz de separar e detectar um produto de uma reação de PCR, o que mostra a aplicabilidade do sistema na detecção de uma amostra real e a possibilidade de integração entre a separação e a etapa de amplificação.

Figura 5.8 - Eletroferograma mostrando a separação do fragmento de 520 pb no microchip de PT.

Para esta separação, de um fragmento de DNA produto de uma amplificação por PCR, a matriz polimérica utilizada foi a HPC e o campo elétrico aplicado foi de 250 V cm^{-1} . Nestas condições a eficiência de separação para este fragmento foi de 50.000 pratos/m. A eficiência de separação encontrada para um fragmento de 500 pb em uma amostra purificada de DNA foi de 215.000 usando HPC como matriz polimérica e a aplicação de um campo elétrico de 200 V cm^{-1} . As diferenças encontradas devem-se ao aumento do campo elétrico aplicado (redução do tempo de análise) e o fato da amostra não ser uma amostra de DNA purificada e sim uma amostra real que contém alta concentração de sais.

5.5. CONCLUSÃO

A separação e detecção de dsDNA realizada pela primeira vez em um microchip descartável de toner representa um avanço importantíssimo em direção à produção de um microchip totalmente integrado para análises genéticas, em uma plataforma de fácil fabricação e baixo custo.

O sistema permitiu a separação de fragmentos de dsDNA de tamanho entre 100 e 1000 pares de base, sem a necessidade de recobrimento do canal, com boa correlação de tamanho do fragmento e mobilidade. A variação do campo elétrico na separação afetou apenas os fragmentos maiores de DNA, como é esperado para separação eletroforética de DNA em gel devido ao estiramento de DNA maiores induzindo a uma reptação com orientação dos fragmentos. O sistema apresentou uma eficiência comparável com a eficiência apresentada por microchips de vidro e um tempo total de análise de 4 minutos para a detecção de um pico de 1000 pb. Embora os microchips de PT sejam descartáveis, eles puderam ser utilizados mais que uma vez sem a troca da matriz de separação.

Desta forma, os microchips de PT demonstraram ser uma plataforma promissora para separação barata, simples e rápida de DNA, além da possibilidade de integração de outras etapas de análises de DNA como extração e amplificação.

REFERÊNCIAS

1. HARRISON, D. J.; MANZ, A.; FAN, Z. H.; LUDI, H.; WIDMER, H. M. Capillary electrophoresis and sample injection systems integrated on a planar glass chip. **Analytical Chemistry**, v. 64, p.1926–1932, 1992.
2. MANZ, A.; HARRISON, D. J.; VERPOORTE, E. M. J.; FETTINGER, J. C.; PAULUS, A.; LUDI, H.; WIDMER, H. M. Planar chips technology for miniaturization and integration of separation techniques into monitoring systems—capillary electrophoresis on a chip. **Journal of Chromatography**, v. 593, p. 253–258, 1992.

3. SEILER, K.; HARRISON, D. J.; MANZ, A. Planar glass chips for capillary electrophoresis: repetitive sample injection, quantitation, and separation efficiency. **Analytical Chemistry**, v. 65, p. 1481-1488, 1993.
4. JACOBSON, S. C.; HERGENRODE, R.; KOUTNY, L. B.; RAMSEY, J. M. High-speed separations on a microchip. **Analytical Chemistry**, v. 66, p. 1114-1118, 1994.
5. VILKNER, T.; JANASEK, D.; MANZ, A. Micro total analysis systems. recent developments. **Analytical Chemistry**, v. 76, p. 3373-3386, 2004.
6. SANDERS, G. H. W.; MANZ, A. Chip-based microsystems for genomic and proteomic analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v.19, p. 364-378, 2000.
7. DITTRICH, P. S.; TACHIKAWA, K.; MANZ, A. Micro Total Analysis Systems. Latest advancements and trends. **Analytical Chemistry**, v. 78, p. 3887-3907, 2006.
8. EASLEY, C. J.; KARLINSEY, J. M.; BIENVENUE, J. M.; LEGENDERE, L. A.; ROPER, M. G.; FELDMAN, S. H.; HUGHES M. A.; HEWLETT, E. L.; MERKEL, T. J.; FERRANCE, J. P.; LANDERS, J. P. A fully integrated microfluidic genetic analysis system with sample-in-answer-out capability, **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 19, p. 19272-10277, 2006.
9. EFFENHAUSER, C. S.; PAULUS A.; MANZ, A.; WIDMER, H. M. High-speed separation of antisense oligonucleotides on a micromachined capillary electrophoresis device. **Analytical Chemistry**, v. 66, p. 2949–2953, 1994.
10. WOOLLEY, A. T.; MATHIES, R. A. Ultra-high-speed DNA fragment separations using microfabricated capillary array electrophoresis chips. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, p.11348-11352, 1994.
11. LIU, S.; GUTTMAN, A. Electrophoresis microchips for DNA analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, p. 422-431, 2004.
12. ZHANG, L.; DANG, F.; BABA, Y. Microchip electrophoresis-based separation of DNA. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 30, p. 1645-1654, 2003.
13. WU, D.; QIN, J.; LIN, B. Electrophoretic separations on microfluidic chips. **Journal of Chromatography A**, v. 1184, p. 542-559, 2008.
14. SINVILLE, R.; SOPER, S. A. High resolution DNA separations using microchip electrophoresis. **Journal of Separation Science**, v. 30, p. 1714-1728, 2007.
15. NAKANISHI, H.; NISHIMOTO, T.; ARAI, A.; ABE, H.; KANAI, M.; FUJIYAMA, Y.; YOSHIDA, T. Fabrication of quartz microchips with optical slit and development of a linear imaging UV detector for microchip electrophoresis systems. **Electrophoresis**, v. 22, p. 230-234, 2001.

16. MCCREEDY, T. Fabrication techniques and materials commonly used for the production of microreactors and micro total analytical systems. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 19, p. 396-400, 2000.
17. DUFFY, D. C.; MCDONALD, J. C.; SHUELLER, O. J. A.; WHITESIDES, G. M. Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). **Analytical Chemistry**, v. 70, p. 4974–4984, 1998.
18. MARTYNOVA, L.; LOCASCIO, L. E.; GAITAN, M.; KRAMER, G. W. Fabrication of plastic microfluidic channels by imprinting methods. **Analytical Chemistry**, v. 69, p. 4783-4789, 1997.
19. Liu, Y.; GANSER, D.; SCHNEIDER, A.; LIU, R.; GRODZINSKIN, P.; KROUTCHININA, N. Microfabricated polycarbonate CE devices for DNA analysis. **Analytical Chemistry**, v. 73, p. 4196-4201, 2001.
20. ROSSIER, J. S.; SCHWARZ, A.; REYMOND, F.; FERRIGNO, R.; GIRAULT, H. H. Microchannel networks for electrophoretic separations. **Electrophoresis**, v. 20, p. 727-731, 1999.
21. PICCIN, E.; COLTRO, W. K. T.; DA SILVA, T. A. F.; CLARO-NETO, S.; CARRILHO, E. Polyurethane from biosource as a new material for fabrication of microfluidic devices by rapid prototyping. **Journal of Chromatography A**, v. 1173, p. 151-158, 2007.
22. PUGMIRE, D. L.; WADDELL, E. A.; HAASCH, R.; TARLOV, M. J.; LOCASCIO, L. E. Surface characterization of laser-ablated polymers used for microfluidics. **Analytical Chemistry**, v. 74, p. 871-878, 2002.
23. McCORMICK, R. M.; NELSON, R. J.; ALONSO-AMIGO, M. G.; BENVEGNI, D. J.; HOOPER, H. H. Microchannel electrophoretic separations of DNA in injection-molded plastic substrates. **Analytical Chemistry**, v. 69, p. 2626-2630, 1997.
24. PALOCZI, H. Y.; POO, G. T.; YARIV, J. K. S. Bottom-up soft-lithographic fabrication of three-dimensional multilayer polymer integrated optical microdevices. **Applied Physics Letters**, v. 85, p. 3005 – 3007, 2004.
25. PÉPIN, A.; YOUINOU, P.; STUDER, V.; LEBIB, A.; CHEN, Y. Nanoimprint lithography for the fabrication of DNA electrophoresis chips. **Microelectronic Engineering**, v. 61-62, p. 927-932, 2002.
26. DO LAGO, C. L.; SILVA, H. D. T.; NEVES, C. A.; BRITO-NETO, J. G. A.; SILVA, J. A. F. A dry process for production devices base on the lamination of laser-printed polyester films. **Analytical Chemistry**, v. 75, p. 3853-3858, 2003.
27. TIAN, H.; LANDERS, J. P. Hydroxyethylcellulose as an effective polymer network for DNA analysis in uncoated glass microchips: optimization and application to mutation detection via heteroduplex analysis. **Analytical Biochemistry**, v. 309, p. 212-223, 2002.

28. CATAI, J. R.; FORMENTON-CATAI, A. P.; CARRILHO, E. Simplex maximization of the correlation coefficient for DNA sizing analysis by capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 26, p. 1680-1686, 2005.
29. COLTRO, W. K. T.; LUNTE, S. M.; CARRILHO, E. Comparison of the analytical performance of electrophoresis microchannels fabricated in PDMS, glass, and polyester-toner. **Electrophoresis**, v. 29, p. 4928-4937, 2008.

Capítulo 6: Dispositivos integrados de PT para análises genéticas

6.1. INTRODUÇÃO

Plataformas microfluídicas integradas representam a nova geração de dispositivos para análises genéticas, já que tradicionalmente as análises genéticas requerem etapas múltiplas de análises, levando a um grande consumo de tempo, envolve muitos instrumentos diferentes e requer a manipulação manual da amostra em todas as etapas, aumentando a possibilidade de contaminação da amostra durante as transferências. Os sistemas microfluídicos integrados apresentam a possibilidade de automação e integração de todas as etapas em um mesmo dispositivo. Em 1996, Mathies e colaboradores¹ foram os primeiros a criarem um sistema integrado para análise de DNA através do acoplamento de um capilar de vidro com um microchip. Pouco tempo depois surgiu o primeiro artigo mostrando a integração entre a PCR e a separação eletroforética em um único dispositivo microfluídico². Mathies e colaboradores³ obtiveram sucesso na amplificação do fragmento de 136 pb a partir de uma única molécula do vetor de clonagem M13/pUC19 em menos de 15 minutos em um volume de 280 nL em um dispositivo integrado entre PCR e separação.

Recentemente, Legendre e colaboradores⁴ avançaram na integração entre SPE e PCR em uma única câmara. O dispositivo, usando bomba seringa e um termociclador convencional de bancada, foi capaz de extrair e amplificar DNA a partir de 600 nL de sangue. Em seguida eles melhoraram o processo através do acoplamento com o sistema de aquecimento mediado por radiação IV para realizar a PCR e desta forma, foram capazes de realizar a SPE e PCR em aproximadamente de 25 minutos⁵.

Para que um verdadeiro “lab on a chip” seja útil para diagnóstico clínico ou para proporcionar um perfil genético em análise forense, ele deve ser capaz de aceitar uma amostra de sangue total e gerar o perfil genético da amostra.

O primeiro dispositivo totalmente integrado para análises genéticas, com capacidade para receber uma amostra lisada de sangue total e realizar extração, amplificação e separação/detecção de DNA em uma plataforma totalmente integrada foi mostrado pelo grupo do Prof. Landers em 2006⁶. Para a produção do dispositivo de vidro, que contém 5 válvulas para o controle do fluxo, são feitas 3 etapas de corrosão. Uma bomba seringa foi usada para dirigir o fluxo entre os diferentes domínios. Eles mostraram a detecção de *B. anthracis*, a partir de 750 nL de sangue de rato, em um tempo total de análise de 23 minutos.

Apesar do sucesso e de representar um marco na literatura com a produção do primeiro e verdadeiro “lab on a chip” ou μ TAS, o dispositivo apresentado apresenta grande complexidade tanto no processo de fabricação quanto na manipulação do sistema. O custo por dispositivo ainda é alto, uma vez que requer instrumentação sofisticada e um ambiente de sala limpa. Além disso, etapas de passivação da superfície para PCR, longas etapas de condicionamento do dispositivo e a necessidade de limpeza cuidadosa entre análises fazem com que seja necessário um longo tempo de preparo do dispositivo. Vale ressaltar que os 23 minutos de análise mostrado no artigo de Easley não considera o tempo de preparo do dispositivo, sendo apenas referente ao tempo analítico da análise.

Neste sentido, métodos que produzam dispositivos também totalmente integrados, como aquele mostrado pelo grupo do Prof. Landers, porém com custo reduzido e idealmente de fácil manipulação representam uma evolução do dispositivo e um grande avanço dos μ TAS.

Alguns métodos para reduzir o custo do dispositivo incluem o uso de polímeros^{7,8}, porém em alguns casos a incompatibilidade com os reagentes, especialmente os reagentes da PCR, ou a incompatibilidade com o aquecimento por IV é um problema.

Os dispositivos de PT já demonstraram serem capazes de 1) extrair DNA de alta qualidade (amplificável) com frações altamente concentradas a partir de um pequeno volume de sangue⁹, 2) amplificar DNA com aquecimento mediado por radiação IV e 3) separar e detectar moléculas de DNA. Neste sentido, os microchips de PT apresentam grande potencial para a produção de dispositivos microfluídicos integrados para análises genéticas. Os microchips de PT representam uma oportunidade de produção de um dispositivo semelhante àquele apresentado pelo grupo do Prof. Landers, com a grande vantagem de ser um dispositivo de fácil fabricação¹⁰, baixo custo e descartável, tendo grande potencial para revolucionar as análises genéticas.

6.2. OBJETIVO

Este Capítulo tem como objetivo realizar integrações entre as etapas constituintes das análises genéticas em um mesmo dispositivo de PT. Para a obtenção do objetivo de produzir um microssistema integrado de análise total (μ TAS), o pré-tratamento da amostra (purificação e amplificação) e a etapa de análise (separação eletroforética e detecção) devem ser fluidicamente interfaceados no dispositivo microfluídico. Estas integrações devem ser uniformes, proporcionar robustez e reprodutibilidade ao método e, idealmente, deve ser simples, de fácil construção e manipulação. O objetivo é produzir formas simples de integrações entre as etapas, uma vez que o maior atrativo da proposta de produção de um

dispositivo descartável de PT para análises genéticas é a simplicidade do dispositivo. Desta forma, não faria sentido incorporar válvulas complicadas e de difícil fabricação em um dispositivo simples e descartável de PT. Assim, procurou-se neste trabalho desenvolver primeiramente integrações parciais entre as etapas de extração e amplificação e em seguida entre as etapas de amplificação e separação/detecção.

6.3. EXPERIMENTAL

6.3.1. Materiais e reagentes

Os reagentes Tris(hidroximetil)aminometano (Tris), o sal dissódico etilenodiaminotetracético (EDTA) e o isopropanol foram adquiridos junto à Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA). O hidrocloreto de guanidina (GuHCl) e os reagentes para PCR foram adquiridos junto à Fisher Scientific (Fairlawn, NJ). Os primers para a amplificação do fragmento de 520 pb do λ DNA foram sintetizados pela MWG Biotech (High Point, NC). λ DNA digerido com *HinD* III foi obtido junto à Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). O intercalador de DNA PicoGreen, usado para marcar fluorescentemente as moléculas de DNA, foi adquirido junto à Invitrogen (Carlsbad, CA). As partículas de MagneSil[®] adquiridas junto à Promega (Madison, WI) foram diluídas 3,3 vezes em GuHCl 8 mol/L (pH 7,6). Hidroxietilcelulose (HEC 90-105 kDa) foi obtida junto a Fluka (Buchs, Switzerland).

6.3.2. Integração das etapas de dSPE e IV-PCR em um única câmara reacional (single chamber)

6.3.2.1. Produção do dispositivo

Os microchips de PT usados nos experimentos de dSPE-PCR em uma única câmara reacional foram feitos como descrito no item 3.3.2 do Capítulo 3 (Figura 3.1). Em resumo, os microchips foram produzidos através do alinhamento e laminação de quatro filmes de poliéster, sendo que nos dois filmes centrais a região delimitada para o canal era recortada com o auxílio da cortadora a laser. O *layout* do dispositivo usado em dSPE-PCR em uma única câmara é exatamente o mesmo do dispositivo usado nos experimentos de IV-PCR. A Figura 6.1 mostra o *layout* do dispositivo utilizado para dSPE-PCR em uma única câmara reacional.

O dispositivo contém duas câmaras, a primeira na qual se desenvolve a dSPE e seguida a IV-PCR e outra para o controle da temperatura através da inserção de um termopar, chamada de câmara de referência. Cada câmara tem o volume de 2 μL .

Figura 6.1 - Layout do microchip de PT utilizado nos experimentos de IV-PCR.

6.3.2.2. Compatibilidade entre os reagentes da PCR com as partículas de MagneSil®

Como o objetivo é integrar dSPE com PCR em uma mesma câmara reacional é importante avaliar se as partículas de MagneSil® podem inibir o sucesso da PCR,

uma vez que elas permanecerão dentro da câmara durante a PCR nos experimentos de dSPE-PCR em uma única câmara.

Para verificar a compatibilidade das partículas de MagneSil[®] com os reagentes da PCR, realizou-se experimentos de amplificação do fragmento de 520 pb do λ DNA na presença de 1 μ L de MagneSil[®] na câmara da PCR. Um microchip com o mesmo layout da Figura 6.1 foi utilizado para este experimento. Para realizar a PCR na presença de partículas de MagneSil[®], preencheu-se a câmara com a mistura reacional da PCR (10 mM Tris / 50 mM KCl / 2,4 mM de $MgCl_2$ / 0,4 mM de cada primer / 0,2 mM de dNTP / 0,24 mg/mL de BSA / 1,5% (v/v) de PEG / 0,2 unidades/ μ L de *Taq* polimerase) e em seguida adicionou-se de 1 μ L de MagneSil[®] (aproximadamente 300.000 partículas/ μ L - diluição de 3:1) na câmara reacional antes do início da PCR. A PCR desenvolveu-se sob as seguintes condições de aquecimento: 95 °C por 2 minutos, 30 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 68 °C por 30 segundos e extensão final a 72 °C por 2 minutos. Após o término da PCR a solução foi retirada do microchip e o produtos da PCR foram analisados pelo Bioanalyzer 2100 de acordo com o protocolo do fabricante.

6.3.2.3. Procedimento experimental para dSPE e IV-PCR em uma única câmara reacional

O método apresentado aqui representa a integração, sem válvula, entre a extração e amplificação de DNA realizadas em uma mesma câmara reacional do dispositivo de PT. O procedimento é simples e envolve a extração dinâmica de DNA como descrito no Capítulo 3 e em seguida a realização da IV-PCR, como descrito na Capítulo 4, na mesma câmara reacional.

A Figura 6.2 mostra as quatro etapas principais na integração entre a extração e PCR em uma mesma câmara reacional, que são: 1) introdução da amostra e agitação das partículas magnéticas – adsorção das moléculas de DNA na fase sólida, 2) lavagem com isopropanol – retirar as proteínas e demais contaminantes, 3) lavagem com tampão para PCR – para retirada de todo isopropanol, que é contaminante para PCR e 4) eluição das moléculas de DNA com a mistura reacional da PCR – após esta sequência a câmara reacional já está pronta para realizar a PCR.

Figura 6.2 - Desenho esquemático das etapas realizadas na integração entre dSPE e IV-PCR em uma mesma câmara em um microchip de PT.

A etapa de extração foi basicamente a mesma descrita anteriormente (Capítulo 2 e 3). Primeiramente a câmara foi preenchida com GuHCl 8 mol/L pH 7,6 seguida da adição de 1 μ L de MagneSil[®] e 2 μ L de amostra (40 ng de λ DNA). Após a adição da amostra, o microchip foi levado ao agitador magnético para a movimentação das partículas. Para a etapa de adsorção do DNA nas partículas magnéticas, o movimento foi mantido por 5 minutos. Após a adsorção do DNA nas partículas, as partículas foram lavadas com 12 μ L de isopropanol 80%, adicionando 6 μ L de isopropanol e 1 minuto de movimentação das partículas e mais 6 μ L de isopropanol e mais 1 minuto de movimentação. Para a retirada total do isopropanol, que é um inibidor da PCR, as partículas de MagneSil[®] foram lavadas com 10 μ L de tampão para PCR (10 mM Tris/50 mM KCl). Na etapa de lavagem com tampão as partículas permanecem imobilizadas por um magneto para que nenhum DNA seja eluído, uma vez que a eluição do DNA das partículas é dependente do movimento destas. Após as etapas de lavagem, o DNA foi eluído já com a mistura reacional da PCR (10 mM Tris /50 mM KCl / 2,4 mM de MgCl₂ / 0,4 mM de cada primer / 0,2 mM de dNTP / 0,24 mg/mL de BSA / 1,5% (v/v) de PEG / 0,2 unidades/ μ L de Taq polymerase) e após 5 minutos de movimentação das partículas a solução presente na câmara da PCR está pronta para IV-PCR. As partículas são então imobilizadas na câmara da PCR com o auxílio do um íma e estas permanecem na câmara durante a PCR.

Para o experimento de IV-PCR a câmara de referência foi preenchida com 2 μ L de tampão 10 mM Tris/50 mM KCl, e em seguida inseriu-se o termopar. Para evitar a evaporação da solução, adicionou-se óleo mineral em todos os reservatórios. O programa de LabVIEW foi então utilizado para controlar a temperatura da lâmpada de tungstênio para os ciclos da PCR nas seguintes

condições: 95 °C por 2 minutos, 30 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 68 °C por 30 segundos e extensão final a 72 °C por 2 minutos. Após o término da PCR o produto foi retirado do microchip e analisado pelo Bioanalyzer 2100 de acordo com o protocolo do fabricante.

O controle negativo de partículas de MagneSil® para a integração entre dSPE/IV-PCR foi realizado para comprovar que o produto obtido na PCR é proveniente da amplificação de DNA extraído das partículas de MagneSil® e não de DNA que possivelmente poderia estar aderido nas paredes do canal provenientes da etapa de inserção da amostra de λDNA.

O experimento de controle negativo das partículas foi realizado exatamente da mesma forma como descrito acima com a única diferença da não adição de 1 µL de MagneSil®. Primeiramente a câmara foi preenchida com GuHCl 8 mol/L pH 7,6, em seguida adicionou-se 2 µL da amostra de λDNA (40 ng de DNA). Mesmo com a ausência das partículas, o microchip foi levado ao agitador magnético por 5 minutos, como no experimento original. Em seguida, foram feitas as lavagens com 12 µL de isopropanol 80% e 10 µL de tampão para PCR (10 mM Tris/50 mM KCl) e então adicionou-se 4 µL da mistura para PCR (10 mM Tris /50 mM KCl / 2,4 mM de MgCl₂ / 0,4 mM de cada primer / 0,2 mM de dNTP / 0,24 mg/mL de BSA / 1,5% (v/v) de PEG / 0,2 unidades/µL de *Taq* polimerase) e após 5 minutos sob o agitador magnético a solução presente na câmara da PCR está pronta para IV-PCR. Para o experimento de IV-PCR a câmara de referência foi preenchida com 2 µL de tampão 10 mM Tris/50 mM KCl, e em seguida inseriu-se o termopar. Para evitar a evaporação da solução, adicionou-se óleo mineral em todos os reservatórios. O programa de LabVIEW foi utilizado para controlar a temperatura da lâmpada de IV

para os ciclos da PCR nas seguintes condições: 95 °C por 2 minutos, 30 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 68 °C por 30 segundos e extensão final a 72 °C por 2 minutos. Após o término dos ciclos de aquecimento, a solução foi retirada do microchip e analisada pelo Bioanalyzer 2100 de acordo com o protocolo do fabricante.

6.3.3. Integração sem válvula entre as etapas de IV-PCR e eletroforese em microchip (ME)

6.3.3.1. Produção do dispositivo

O dispositivo de PT integrado sem válvula entre as etapas de IV-PCR e separação eletroforética de DNA foi construído com quatro camadas de poliéster na região delimitada para PCR e com duas camadas para o domínio da separação. A câmara da PCR possui as mesmas dimensões das câmaras utilizadas nos experimentos de IV-PCR (ítem 4.3.2 do Capítulo 4) e os canais para separação tem 200 µm de largura e o comprimento dos canais de injeção e separação de 10 e 40 mm respectivamente.

A Figura 6.3 mostra um desenho esquemático da construção do microchip integrado e a Figura 6.4 mostra uma foto do dispositivo pronto. Para a produção do microchip integrado entre PCR-ME, a seguinte configuração foi adotada: na base e na tampa do dispositivo foram impressos os desenhos dos canais para separação enquanto que na parte que servirá como base e tampa para o domínio da PCR nada foi impresso. Para a região do microchip em que será realizada a PCR inseriu-se mais dois filmes de poliéster entre a base e a tampa. Nestes dois filmes de poliéster centrais foram impressos toner dos dois lados do filme e o desenho das câmaras foram recortados com o auxílio da cortadora a laser. Estas duas partes do meio compõe apenas o domínio da PCR. Desta forma, o microchip contendo a

integração da PCR e ME é um chip que possui 2 filmes (base e tampa) para a região da separação e quatro filmes para o domínio da PCR. Furos foram feitos diretamente nos reservatórios da tampa. Os filmes de poliéster foram alinhados e laminados juntos para vedar o dispositivo. Ponteiros de pipetas de 100 μ L foram coladas nos reservatórios 1, 2, 3 e 4 para armazenar as soluções. Os reservatórios 3 e 6 são colocados próximos (lado a lado) no dispositivo final e a ponteira da pipeta, para criar o reservatório da solução, é colada na superfície do microchip de forma que envolva os dois reservatórios (3 e 6).

Figura 6.3 - Partes utilizadas para produzir o microchip integrado para PCR-ME. (A) Tampa, (B e C) Partes intermediárias e (D) tampa. 1- reservatório para descarte da amostra, 2 - reservatório para tampão, 3 – reservatório para amostra, 4 – reservatório para descarte do tampão, 5 e 6 reservatórios para PCR.

Ponteira da pipeta que integra
os dois domínios

Figura 6.4 - Foto do dispositivo integrado entre PCR e ME mostrando os domínios da PCR, da separação e a região onde é feita a integração entre os dois domínios.

6.3.4. Procedimento experimental da integração entre as etapas de IV-PCR e eletroforese em microchip (ME)

Primeiramente, realizou-se a PCR com aquecimento mediado por radiação IV através da amplificação do fragmento de 520 pb do λ DNA. A PCR foi realizada adicionando 2 μ L da mistura reacional na câmara da PCR que foi preparada com a seguinte composição: 10 mM Tris/50 mM KCl / 2.4 mM de $MgCl_2$ / 0,4 mM de cada primer / 0,2 mM de dNTP / 1 ng/ μ L de λ DNA / 0,24 mg/mL de BSA / 1,5% (v/v) de PEG / 0,2 unidades/ μ L de *Taq* polimerase. Em seguida a câmara de referência foi preenchida com tampão 10 mM Tris/50 mM KCl, e inseriu-se o termopar. Para evitar a evaporação da solução, adicionou-se óleo mineral em todos os reservatórios. O microchip foi então levado ao sistema de IV-PCR e o programa de LabVIEW foi utilizado para controlar a temperatura da lâmpada de tungstênio para os ciclos da PCR nas seguintes condições: 95 °C por 2 minutos, 30 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 68 °C por 30 segundos e extensão final a 72 °C por 2 minutos. Como não há contato fluídico entre os dois domínios enquanto a solução não é forçada a

passar de um domínio a outro, os canais de injeção e separação permanecem vazios durante a PCR.

Após o término da PCR, os canais do domínio da separação (canal de injeção e separação) foram preenchidos com hidroxipropilcelulose (HPC) 0,5% por capilaridade. Após o preenchimento total dos canais com a matriz de separação (cerca de 2 min), os reservatórios do tampão, descarte do tampão e descarte da amostra foram preenchidos com 25 μ L de 0,1 $\times$ TE. A próxima etapa então é a transferência da solução contida na câmara da PCR contendo o DNA amplificado para o reservatório da amostra do domínio da separação. O controle fluídico da solução integrando a PCR com a separação foi realizada em um procedimento simples e sem válvula. A transferência da solução contendo o produto amplificado, após a reação da PCR, para o domínio da separação eletroforética foi realizada da seguinte forma: com uma massa de moldar aplicou-se manualmente uma pressão positiva, com o auxílio de um pedaço de PDMS de 1 cm com um furo central, no reservatório inferior da câmara da PCR (reservatório 5). A massa de moldar ficou aderida na superfície do microchip vedando assim o reservatório e impedindo que a solução retornasse ao reservatório 5. Desta forma, a solução contendo o DNA amplificado foi forçada a ir para o reservatório 6 e imediatamente ela espalhou-se entre os reservatórios 3 e 6, já que o reservatório para solução (ponteira da pipeta) era comum para os dois reservatórios. Sendo assim, a solução contendo o DNA amplificado já estava presente no reservatório 3, faltando apenas a marcação fluorescente das moléculas de DNA para serem inseridas no canal de separação. Para isso, inseriu-se no reservatório da amostra 21 μ L de 0,1 $\times$ TE e 2 μ L de PicoGreen (diluído 200 vezes), totalizando 25 μ L de solução no reservatório, já que o volume da câmara da PCR era de 2 μ L. O microchip permaneceu em sala escura

por 10 minutos para a marcação fluorescente do DNA. Após os 10 minutos, o microchip foi levado ao sistema de eletroforese acoplado com um detector de LIF. Para a introdução da amostra no canal de injeção, aplicou-se um potencial de -100 V no reservatório da amostra e +100 V no reservatório do descarte da amostra por 60 segundos, e para a separação, aplicou-se um potencial de -50 V no reservatório do tampão e +250 V no reservatório do descarte do tampão.

6.4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A integração entre a extração e amplificação de DNA é um componente necessário para o avanço na produção de sistemas totalmente integrados para análises genéticas, tanto para aplicações clínicas quanto para análises forenses, uma vez que o pré-tratamento da amostra é uma etapa crucial nas análises de DNA.

Os benefícios associados com a realização da PCR em microchips somente são efetivos se a câmara da PCR tem volume reduzido. Como resultado disso, o uso de métodos de extração que proporcione o isolamento de DNA em frações altamente concentradas não é simplesmente vantajoso, mas necessário, especialmente para os casos de amostras contendo um pequeno número de cópias de moléculas de DNA. Neste sentido, o método de extração desenvolvido neste trabalho, chamado de extração dinâmica de DNA em fase sólida (dSPE)⁹, demonstrou ser um método que extrai DNA de alta qualidade (amplificável) em frações altamente concentradas, em microchip de PT. Sendo portanto um método de extração com grande potencial para integração com a PCR em microchips.

6.4.1. Compatibilidade das partículas de MagneSil® com os reagentes da PCR

Para verificar a viabilidade de integrar a extração dinâmica de DNA (dSPE), que utiliza partículas de MagneSil® como fase sólida, com a PCR em uma mesma câmara reacional no microchip de PT, verificou-se primeiramente a possibilidade de realizar a PCR na presença de partículas de MagneSil® que permaneceram dentro da câmara e puderam ser agrupadas e deslocadas para o canto superior da câmara com o auxílio de um ímã. Para isto, realizou-se a amplificação do λ DNA na presença de partículas de MagneSil®. A Figura 6.5 apresenta o eletroferograma mostrando a amplificação do fragmento de 520 pb do λ DNA na presença de 1 μ L de partículas de MagneSil®. Desta forma concluiu-se que é possível a integração entre dSPE com PCR em uma mesma câmara no microchip de PT, uma vez que a PCR pode ser realizada na presença das partículas de MagneSil®.

Figura 6.5 - Eletroferograma mostrando a amplificação do fragmento de 520 pb do λ DNA na presença de partículas de MagneSil®.

6.4.2. dSPE e IV-PCR em uma única câmara reacional

A grande vantagem da integração entre SPE e IV-PCR em uma mesma câmara proposta neste trabalho é a simplicidade. Além da facilidade e baixo custo para produzir um microchip descartável de PT, a possibilidade de realizar extração e amplificação de DNA em uma mesma câmara agrega ainda mais vantagens a técnica. Os experimentos com uma única câmara para SPE-PCR envolve a etapa de pré-tratamento da amostra (SPE) e amplificação da amostra (PCR) sem a necessidade de transferência da mesma. O sucesso da integração entre dSPE-PCR em uma única câmara se deve em grande parte ao uso de partículas magnéticas “móveis” como fase sólida. A possibilidade de se manipular as partículas de MagneSil[®] na câmara de acordo com a necessidade da técnica é extremamente interessante. Isto permite que as partículas sejam movimentadas durante as etapas de adsorção e eluição das partículas de DNA, aumentando a eficiência de ambos processos, e sejam imobilizadas em uma pequena região na câmara durante a PCR. Além disso, as partículas podem ser movimentadas para lavagem com isopropanol e podem ser imobilizadas para lavagem com tampão. Esta etapa de lavagem das partículas com tampão é fundamental para o sucesso da reação de amplificação, uma vez que o isopropanol inibe a reação da PCR. Mais uma vez o uso das partículas magnéticas é crucial, já que o tampão é capaz de eluir as moléculas de DNA, mas não para o caso do uso das partículas de MagneSil[®], em que a desorção das moléculas de DNA é dependente do movimento das partículas. Sendo assim, com as partículas imobilizadas foi possível retirar todo o isopropanol da câmara sem eluir as moléculas de DNA, e conseqüentemente, sem perder amostra.

Outro grande benefício da integração entre extração e amplificação em uma única câmara é o fato de ser usado na reação de amplificação todo DNA recuperado na extração. Isto pode ser útil principalmente nos casos em que se tem pouca quantidade de amostra, como é o caso em análises forenses.

Desta forma, a extração e PCR foram feitas em um formato extremamente simples, sem a necessidade de válvulas, que normalmente agregam complexidade aos dispositivos, reduzindo as possibilidades de contaminação em um tempo de 50 minutos para as duas etapas.

A Figura 6.6 apresenta o eletroferograma mostrando a amplificação do fragmento de 520 pb do λ DNA extraído das partículas de MagneSil[®] e amplificado em uma única câmara em um microchip de PT.

Figura 6.6 - Eletroferograma mostrando a amplificação do fragmento de 520 pb do λ DNA no microchip integrado de SPE-PCR em uma mesma câmara. A análise foi realizada no Bioanalyzer.

Para garantir que o DNA amplificado mostrado na Figura 6.6 é proveniente do DNA extraído das partículas de MagneSil[®] e não de DNA que poderia ter ficado

aderido nas paredes do câmara, fez-se o controle negativo do experimento. O controle negativo foi realizado exatamente da mesma forma que foi feito o experimento de integração SPE-PCR em uma única câmara, apenas sem a adição da partículas de magnéticas. A Figura 6.7 mostra a ausência de DNA amplificado na ausência de partículas de MagneSil[®], provando assim que a presença de DNA no eletroferograma da Figura 6.6 foi proveniente da extração de DNA da fase sólida.

Figura 6.7 - Eletroferograma do controle negativo de partículas de MagneSil[®] no experimento de integração de SPE-PCR em uma única câmara.

6.4.3. Integração entre as etapas de IV-PCR e ME

A integração entre a etapa de pré-tratamento da amostra (PCR) e análise (separação e detecção) de moléculas de DNA é mais um avanço em direção a produção de dispositivos de PT integrados para análises genéticas.

Alguns trabalhos na literatura mostraram a integração entre PCR e a eletroforese em microchip (ME). Porém todos eles utilizam microchips com válvulas

para integração entre os dois domínios, o que agrega complexidade à manipulação e especialmente ao processo de fabricação da plataforma. Wooley e colaboradores¹ publicaram o primeiro exemplo de dispositivo fluidicamente integrado entre PCR e ME que integrou estas duas etapas em menos de 15 minutos em microchip de vidro, porém o dispositivo apresentava válvulas complicadas de PDMS, e requerem bombas de vácuos para acionamento destas. Outros grupos¹¹⁻¹⁴ também demonstraram a integração entre PCR e ME, porém vale ressaltar novamente que em todos os casos os microchips eram contemplados com válvulas.

Um microchip de PT foi desenvolvido para a integração entre PCR e separação em um mesmo dispositivo. Mais uma vez a simplicidade do sistema de PT é ainda mais pronunciada pelo fato da integração entre a PCR e a ME ter sido realizada sem a necessidade de válvulas. Canais com profundidades diferentes foram facilmente feitos utilizando quantidades diferentes de filmes de poliéster para cada domínio. Para o domínio da PCR (câmara reacional e referência) onde é necessário maior profundidade para a inserção do termopar utilizou-se 4 filmes de poliéster e para os canais do domínio da separação utilizou-se apenas dois filmes de poliéster com camada dupla de toner entre a base e a tampa. A facilidade em fabricar um dispositivo com profundidade diferentes para domínios diferentes com a mesma facilidade com que se fabrica microchip com profundidade uniforme, é outra característica que demonstra a versatilidade dos microchips de PT, facilidade única nesta tecnologia.

O controle microfluídico extremamente simples foi feito através dos reservatórios da PCR e da eletroforese, que permanecem sem contato durante a etapa da PCR e que são posteriormente conectados após o término da PCR. Esta conexão é feita com o auxílio de uma ponteira de pipeta que serve como um grande

reservatório (que conecta os dois reservatórios - saída da PCR e ME) para a solução que é forçada a passar do reservatório da PCR para o reservatório da eletroforese através da aplicação de uma pressão positiva no reservatório de entrada da PCR. Desta forma foi possível obter o sucesso da integração de forma simples (sem válvulas) entre a PCR e a separação/detecção.

A Figura 6.8 demonstra o sucesso da integração entre PCR-ME através da detecção do fragmento de 520 pb do λ DNA amplificado na PCR e detectado através da detecção por LIF no mesmo microchip integrado.

Figura 6.8 - Eletroferograma mostrando a detecção do fragmento de 520 pb do λ DNA amplificado na PCR e detectado em um mesmo microchip integrado.

6.5. CONCLUSÃO

Os processos de integração em microchips resultam na diminuição do tempo de análise além da redução das possibilidades de contaminação, uma vez que a manipulação da amostra é reduzida. Este Capítulo mostrou avanços importantes em direção a produção de dispositivos de PT totalmente integrados para análises genéticas. As integrações mostradas neste Capítulo foram realizadas sem válvulas, o que representa uma vantagem importante dos sistemas apresentados. A integração entre a extração e a PCR em uma única câmara demonstrou o grande potencial dos microchips de PT em realizar de forma simples e rápida o preparo de amostra para análises genéticas e pode ser facilmente incorporado em um dispositivo totalmente integrado.

O sucesso da integração entre PCR e ME mostrado neste trabalho representa um avanço importante para integração entre a etapa de preparo de amostra e análise do DNA de forma simples (sem válvulas), o que agrega simplicidade às vantagens do dispositivo mostradas anteriormente, como por exemplo, a facilidade do processo de fabricação e a não necessidade de tratamento da superfície tanto para a PCR quanto para a eletroforese.

Os microchips de PT demonstraram o grande potencial para o desenvolvimento de um dispositivo totalmente integrado entre todas as etapas da análise genética: i) extração, ii) amplificação e iii) separação. Este dispositivo de PT descartável totalmente integrado com capacidade de *sample-in-answer-out* terá grande potencial para revolucionar os diagnósticos clínicos e as análises forenses.

REFERÊNCIAS

1. WOOLLEY, A. T.; HADLEY, D.; LANDRE, P.; deMELLO, A. J.; MATHIES, R. A.;NORTHROP. M. A. Functional integration of PCR amplification and capillary electrophoresis in a microfabricated DNA analysis device. **Analytical Chemistry**, v. 68, n. 23, p. 4081-4086, 1996.
2. WOOLLEY, A. T.; LAO, K. Q.; GLAZER, A. N.; MATHIES, R. A. Capillary electrophoresis chips with integrated electrochemical detection. **Analytical Chemistry**, v. 70, n. 4, p. 684-688, 1998.
3. LAGALLY, E. T.; MEDINTZ, I.; MATHIES, R. A. Single-molecule DNA amplification and analysis in an integrated microfluidic device. **Analytical Chemistry**, v. 73, n. 3, p. 565-570, 2001.
4. LEGENDRE, L. A.; BIENVENUE, J. M.; ROPER, M. G.; FERRANCE, J. P.; LANDERS, J. P. A simple, valveless microfluidic sample preparation device for extraction and amplification of DNA from nanoliter-volume samples. **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 5, p. 1444-1451, 2006.
5. LEGENDRE, LINDSAY ANN. **Advancements in totally integrated microdevices for clinical diagnostics**. 2007. 177 f. Tese (Doctor of Philosophy) - University of Virginia, Charlottesville, 2007.
6. EASLEY, C. J.; KARLINSEY, J. M.; BIENVENUE, J. M.; LEGENDRE, L. A.; ROPER, M. G.; FELDMAN, S. H.; HUGHES M. A.; HEWLETT, E. L.; MERKEL, T. J.; FERRANCE, J. P.; LANDERS, J. P. A fully integrated microfluidic genetic analysis system with sample-in-answer-out capability. **Proceedings of the National Academy Sciences**, v. 103, n. 51 p. 19272-10277, 2006.
7. DUFFY, D. C.; MCDONALD, J. C.; SCHUELLER, O. J. A.; WHITESIDES, G. M. Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). **Analytical Chemistry**, v. 70, n. 23, p. 4974-4984, 1998.
8. GIORDANO, B. C.; FERRANCE, J. P.; SWEDBERG, S.; HÜHMER, A.; LANDERS, J. P. Polymerase chain reaction in polymeric microchips: DNA amplification in less than 240 seconds. **Analytical Biochemistry**, v. 291, n. 1, p. 124-132, 2001.
9. DUARTE, G. R. M.; PRICE, C. W.; CARRILHO, E.; LANDERS, J. P. Dynamic Solid Phase DNA Extraction and PCR Amplification in Polyester-Toner Based Microchip. **Lab on a Chip**, 2010. Submetido.
10. DO LAGO, C. L.; SILVA, H. D. T.; NEVES, C. A.; BRITO-NETO, J. G. A.; SILVA, J. A. F. A dry process for production devices base on the lamination of laser-printed polyester films. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 15, p. 3853-3858, 2003.
11. HATAOK, Y.; ZHANG, L.; MORI, Y.; TOMITA, N.; NOTOMI, T.; BABA, Y. Analysis of Specific Gene by Integration of Isothermal Amplification and

Electrophoresis on Poly(methyl methacrylate) Microchips. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 3, p. 3689-3693, 2004.

12. RODRIGUEZ, I.; LESAICHERRE, M.; TIE, Y.; ZOU, Q.; YU, C.; SINGH, J.; MENG, L. T.; UPPILI, S.; LI, S. F.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; SELVANAYAGAM, Z. E. Practical integration of polymerase chain reaction amplification and electrophoretic analysis in microfluidic devices for genetic analysis. **Electrophoresis**, v.24, n. 1-2, p. 172-178, 2003.

13. WATERS, L. C.; JACOBSON, S. C.; KROUTCHININA, N.; KHANDURINA, J.; FOOTE, R. S.; RAMSEY, J. M. Multiple sample PCR amplification and electrophoretic analysis on a microchip. **Analytical Chemistry**, v. 70, n. 24, p. 5172-5176, 1998.

14. WATERS, L. C.; JACOBSON, S. C.; KROUTCHININA, N.; KHANDURINA, J.; FOOTE, R. S.; RAMSEY, J. M. Microchip device for cell lysis, multiplex PCR amplification, and electrophoretic sizing. **Analytical Chemistry**, v. 70, n. 1, p. 158-162, 1998.