



Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

**Holczer Eszter**

**PDMS alapú mikrofluidikai rendszerek  
felületmódosítása tenzidekkel**

**OTDK dolgozat**

**Témavezető: Dr. Fürjes Péter**

**MTA Műszaki Fizikai és Anyagtudományi Kutatóintézet**

**MEMS Lab**

**Budapest, 2012. március**

## Tartalomjegyzék:

|                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Bevezetés .....                                                           | 5  |
| 1.1. Bioanalitikai rendszerek.....                                           | 5  |
| 2. Mikrofluidikai rendszerek általános jellemzése .....                      | 7  |
| 2.1. Áramlási tulajdonságok.....                                             | 7  |
| 2.2. Anyagválaszték, követelmények.....                                      | 9  |
| 2.3. Fehérjebekötődés [2][3][4].....                                         | 10 |
| 3. PDMS módosítása.....                                                      | 11 |
| 3.1. A PDMS általános jellemzői.....                                         | 11 |
| 3.2. Mikrofluidikai rendszerek készítése PDMS-ből .....                      | 13 |
| 3.3. Felületmódosítási eljárások.....                                        | 16 |
| 3.3.1. Oxidáció.....                                                         | 16 |
| 3.3.2. Grafting - oltás .....                                                | 17 |
| 3.3.3. Embedding - beágyazás .....                                           | 18 |
| 3.4. Koncepció a PDMS felületmódosítására.....                               | 18 |
| 4. Alkalmazott anyagok és kísérletek leírása .....                           | 20 |
| 4.1. Felhasznált vegyszerek, fehérjék .....                                  | 20 |
| 4.2. Felületi réteg vizsgálata ellipszometriával .....                       | 21 |
| 4.3. A felületi nedvesedés vizsgálata .....                                  | 22 |
| 4.4. Nem-specifikus fehérje bekötődés vizsgálata .....                       | 22 |
| 4.5. PDMS /üveg mikrofluidikai rendszer elkészítése .....                    | 23 |
| 4.6. Felületi fehérjebekötődés vizsgálata .....                              | 24 |
| 4.7. Felületi fehérjebekötődés vizsgálata BSA-val blokkolt felületeken ..... | 24 |
| 5. A kísérleti eredmények kiértékelése .....                                 | 26 |
| 5.1. Ellipszometria .....                                                    | 26 |
| 5.2. A felületi nedvesítés vizsgálata.....                                   | 28 |
| 5.3. Nem-specifikus fehérjebekötődés .....                                   | 34 |
| 6. Összefoglalás .....                                                       | 38 |
| 7. Köszönetnyilvánítás:.....                                                 | 39 |
| 8. Irodalmi hivatkozások:.....                                               | 40 |

## Kivonat

A PDMS (poly-dimetil-sziloxán) napjainkban elterjedten használt szilícium bázisú polimer, mely könnyen kezelhető, rugalmas, víztiszta, kémiaiilag és biológiaiilag inert, így széleskörűen alkalmazható bioanalitikai rendszerek szerkezeti anyagaként. Kémiai összetétele lehetővé teszi megbízható, szivárgásmentes kötését mind önmagához, mind más Si alapú vegyületekből előállított anyagokhoz, így mikrofluidikai csatornarendszerek kialakítására is használható. Hátránya elsősorban felületének hidrofób jellege, mely jelentősen kihat a csatornarendszerekben elérhető áramlási sebességre. Továbbá, képes adszorbeálni felületén biomolekulákat is, így azok mintaoldatbeli koncentrációja megváltozhat a transzport során a fluidikai rendszerben, mielőtt az elérné az eszköz aktív, érzékelő területét<sup>1</sup>.

Jelen munka célja olyan PDMS anyagösszetétel meghatározása, mely mind a nedvesítési, mind a fehérje kitapadási tulajdonságokat képes kedvezően befolyásolni. A PDMS térhálósodási reakcióját megelőzően, eltérő mennyiségben TX-100 típusú felületaktív anyagot adagoltunk a mintákhoz, majd a vizsgálatok során elemeztük a tenzid hatását a térhálósodási reakcióra, valamint a térhálósodott polimer felületi minőségére. A különböző komponensű PDMS keverékekből ún. gyors prototipizálási technikával mikrocatorna rendszereket alakítottunk ki, melyekben a hidrodinamikai tulajdonságokat, és a nem-specifikus fehérje bekötődést fluoreszcensen jelölt HSA (Human Serum Albumine) alkalmazásával vizsgáltuk.

**Kulcsszavak:** PDMS, felületmódosítás, tenzid, mikrofluidika

---

<sup>1</sup> Jeonggi Seo, Luke P. Lee, Effects on wettability by surfactant accumulation/depletion in bulk polydimethylsiloxane (PDMS), Sensors and Actuators B 119 (2006) 192–198

## **Abstract**

PDMS (polydimethylsiloxane) is a silicon based organic polymer generally used as structural material in bioanalytical applications due to its excellent features like easy handling, flexibility, transparency, chemical and biological resistance. Notable drawback is the hydrophobic surface characteristics, significantly affecting the maximal flow rate in the channel system. Moreover, the non-specific binding of proteins or ligands on the channel surfaces is also a critical issue due to the possible depletion of the target molecules during the transport to the active sensing area of the device<sup>1</sup>.

This work is intended to define a modified material composition, which is appropriate to significantly improve both the wettability and the non-specific binding characteristics of PDMS. TX-100 (Sigma-Aldrich) surfactant was added to the raw PDMS before polymerisation. The influence of the tenside was studied considering the polymerisation reaction and the surface characteristics. For testing the hydrodynamic behaviour and non-specific protein adsorption on the surfaces fluorescent labelled human serum albumin (HSA) was applied in a microfluidic system fabricated by Rapid Prototyping technique.

**Keywords:** PDMS, surface modification, tenside, microfluidics

## 1. Bevezetés

### 1.1. Bioanalitikai rendszerek

Az elmúlt évek kutatási-fejlesztési témái között egyre nagyobb jelentőségűvé váltak az orvosláshoz, biológiai területekhez köthető műszaki megoldások. Az újfajta fizikai, kémiai, biológiai elveken működő kombinált mikroszenzorok már képesek az eddig nehezen mérhető fiziológiai paraméterek monitorozására is. Mindazontúl a fejlett érzékelők és a modern orvostudomány eredményeinek ötvöztetésével lehetőség nyílik az élő szervezet paraméterei – pl.: vércukorszint – alapján vezérelt intelligens implantátumok készítésére.

Napjainkban a mikroelektronikai technológiákkal előállított érzékelők és szenzorok új távlatokat nyitottak a méretcsökkentés irányába, alapanyagaik és technológiájuk jelentős részben megegyeznek az integrált áramkörökével, így extrém kis mérettel rendelkező információs rendszerek viszonylag olcsón és nagy mennyiségben előállíthatóak segítségével. A felhasznált technológia biztosítja, hogy ma már a szenzor és a kiértékelő-jelfeldolgozó áramkörök akár azonos chipre is kerülhetnek. Ezek az érzékelő rendszerek pl.: az orvostechnológia vagy a laboratóriumi analitika területén több információt, hatékonyabb szabályozást, és jobb ellenőrizhetőséget tettek lehetővé. A miniatürizáció révén nemcsak a reagensek mennyisége csökkenthető jelentősen, hanem az egy chipen megvalósítható automatikus analízisre képes „minilaborok” fejlesztése előtt is megnyílt az út.

Komplex klinikai diagnosztikai rendszerek elkészítésére egyre nagyobb igény mutatkozik, így megjelent az igény a precíz, molekuláris szintű folyadékműveleteket (pl. keverés, molekulák méretalapján történő szétválogatása stb.) végezni képes integrált analitikai megoldásokra, mely az interdiszciplináris tudományok új ágát hívta életre – a mikrofluidikai rendszerek révén megnyílt az út a magas szintű kémiai elemzés előtt. Ennek megfelelően a mai bioszenzor alkalmazások igen nagy köre is tartalmaz valamilyen formában integrált mikrofluidikát. A cél az egy chip-en, minél több funkciót megvalósító un. lab-on-a-chip (másik elterjedt nevén  $\mu$ TAS, Micro Total Analysis System) rendszerek kialakítása.



**1. ábra:** *Lab-on-a-chip (másik elterjedt nevén  $\mu$ TAS, Micro Total Analysis System)*

A mérettartomány csökkentése a hagyományos laborberendezésekhez képest legfőképp azzal az előnnyel bír, hogy a felhasznált minták elemzése, manipulálása már nl-es térfogatok rendelkezésre állása esetén is elvégezhető, így az amúgy sokszor igen költséges biológiai minták gazdaságosabban használhatók fel. A mikrofluidikai eszközök kis mérete a hordozhatóság követelményeinek is megfelel, ugyanakkor a csatornarendszerekben a folyadékok transzportjához már kisebb energia befektetés is elegendő, nem beszélve arról, hogy a mikrotartomány több makroméreteiben nem mutatkozó, illetve jellegében eltérő jelenség kihasználását is lehetővé teszi, melyet mind az érzékelés, mind a beavatkozás területein is alkalmazhatunk. A Magyar Tudományos Akadémia Műszaki Fizikai és Anyagtudományi Kutatóintézetében folytatott munkám során egy bioanalitikai rendszerek lehetséges alapanyagaként szolgáló polimer felhasználhatósági lehetőségeivel foglalkoztam. ***Célunk egy olyan, agyérkatasztrófára utaló fehérjemarkerek detektálásra képes érzékelő eszköz kifejlesztése<sup>2</sup>, melyben a mintaoldat – ami teljes vér, plazma vagy szérum – egy passzív transzport fluidikián keresztül jut az érzékelő felületre. Dolgozatom témája a transzport fluidika fejlesztésének első lépése, a megfelelő alapanyag meghatározása, és az anyagi tulajdonságok befolyásoló hatásának vizsgálata rendszer minőségére nézve.***

---

<sup>2</sup> Polymer Photonics Multiparametric biochemical SENSor for Point of care diagnostics – P3SENS (FP7 project no.: 248304)

## 2. Mikrofluidikai rendszerek általános jellemzése

Az integrált mikrorendszerek részeként folyamatosan fejlődnek a folyadék-műveleteket (pl. oldatok igen pontos keverése, szétválasztása, molekuláris szintű analízise, antitestek detektálása) igen kis anyagmennyiségekkel (akár  $10^{-6}$ – $10^{-9}$  liter) végezni képes mikrofluidikai rendszerek. Mikrofluidikai eszközöknek tekintjük az olyan egy vagy több csatornát tartalmazó rendszereket, ahol a csatornáknak legalább két mérete a milliméter alatti tartományban található. A szokásostól eltérő mérettartomány azonban ez esetben is újfajta tervezési-kivitelezési kihívásokat hordoz, melyekkel az ilyen eszközök készítésekor szembe kell nézni.

### 2.1 Áramlási tulajdonságok

Az első áramlási rendszerek elkészítéséhez újra kellett értelmezni a makroszkopikus áramlásfizikai jelenségeket, mivel a mikro- és nanométeres mérettartományban a folyadékok viselkedése a fázishatárokon fellépő és a molekulák közötti belső komplex kölcsönhatásoktól is erősen függ. Ezen jelenségek egy része mindmáig részlegesen ismert. Ha az általános alapelvek mentén tanulmányozzuk a lezajló jelenségeket, akkor két alapvető viselkedést különböztethetünk meg a folyadékok áramlása során, a lamináris és a turbulens áramlást. Az áramlás jellegének meghatározására leggyakrabban a Reynolds-szám használatos, definíció szerint:

$$R = \frac{l \times v_{\text{átl}} \times \rho}{\mu} \quad (1)$$

ahol  $l$  a csatorna térfogat/felület aránya,  $v_{\text{átl}}$  az átlagos áramlási sebesség,  $\rho$  a folyadék sűrűsége,  $\mu$  pedig az abszolút (dinamikai) viszkozitás. A Reynolds-szám értékének ismeretében megállapítható a folyadék áramlási jellege az adott rendszerben. Gyakorlati tapasztalatok alapján  $Re < 2300$  esetén az áramlás lamináris, a folyadékrétegek egymással párhuzamosan áramlanak. Ebben az esetben a rétegek közötti anyagtranszport csak diffúzió útján lehetséges. Mivel a mikroméretű áramlási hálózatokban – a jellemző méretek és a domináns viszkozitás miatt – a  $Re$  értéke igen alacsony, így itt is lamináris áramlásról beszélhetünk, mely lehetőséget ad a folyadék rétegek közötti egyedülállóan szabályozott keveredés létrehozására. A folyamat hátránya, hogy míg makroszkopikus rendszerekben turbulenciák gyorsíthatják a

keveredést, addig ebben a mérettartományban a keveredés sebessége csak külső beavatkozással gyorsítható, így a gyorsabb keveredést elősegítő integrált megoldások fejlesztése is a kutatók érdeklődésének középpontjába került.

A folyadékok viselkedésének ismerete mellett, fontos a csatornában elérhető áramlási sebességek tanulmányozása is. *Az analizált minta lehet vér, valamilyen sejtszuszpenzió, fehérje vagy antitest oldat is, ezek közös jellemzője, hogy általában víz bázisúak. Tehát a csatorna hidrofób jellege ilyen minták esetén nagymértékben lelassíthatja, vagy megakadályozhatja az áramlást,* ezzel meghosszabbítva a mérési időt, így szükségessé téve valamilyen aktív elem (pl. pumpa) beépítését a rendszerbe, vagy külső nyomás alkalmazását. A csatornában elérhető áramlási sebességet a felület nedvesíthetősége, a folyadék viszkozitása, a csatorna áramlással szembeni ellenállása, és a csatornában kialakuló kapilláris nyomás határozza meg[1]. Az áramlási sebesség ( $Q$ ) az alábbi egyenlet alapján számolható:

$$Q = \frac{1 \Delta P}{\eta R_F} \quad (2)$$

ahol  $\eta$  a folyadék viszkozitása,  $\Delta P$  a különbség a csatorna bemeneti nyomása és a folyadék front előtti nyomás között,  $R_F$  pedig az áramlási ellenállás. A csatorna nyomása az alábbi egyenlettel határozható meg:

$$P_c = -\gamma \left( \frac{\cos \alpha_a + \cos \alpha_f}{h} + \frac{\cos \alpha_b + \cos \alpha_j}{w} \right) \quad (3)$$

ahol  $\gamma$  a folyadék felületi feszültsége a folyadék-gáz határfelületen,  $\alpha_{a,f,b,j}$  a folyadék kontaktszöge a csatorna alsó, felső, bal illetve jobb falán,  $h$  és  $w$  a csatorna mélysége és szélessége. A csatorna áramlási ellenállása a hidraulikai sugár ( $R_H$ ) és a csatorna hosszának ( $L$ ) ismeretében számítható ki, ezekhez az alábbi egyenletek szükségesek:

$$R_F = \left[ \frac{1}{12} \left( 1 + \frac{5h}{6w} \right) \frac{hw R_H^2}{L} \right]^{-1} \quad (4)$$

amennyiben  $h \leq w$ .

$$R_H = \frac{hw}{h+w} \quad (5)$$

Mint látható az áramlási sebességet jelentősen befolyásolja a csatorna anyagának nedvesíthetősége. Megfelelő felületi tulajdonságok esetén, adott mintaoldatokhoz létrehozható olyan aktív elemektől mentes, passzív fluidikai rendszer, mely képes a megfelelő sebességű transzport megvalósítására. ***Mivel céljaink között szerepel egy passzív transzport fluidikai rendszer megvalósítása vízbázisú mintaoldatokhoz, ezért alapvető feltétel, hogy hidrofíl csatornafalakat tudjunk létrehozni.***

## 2.2 Anyagválaszték, követelmények

Az első analitikai célú csatornakészítési törekvések a biokompatibilis és jól ki-dolgozott technológiai háttérű felvezetők (szilícium és vegyületei, pl. üvegek) felhasználásán alapultak. A speciális eszközháttér (tisztatér, fotolitográfia<sup>3</sup>, veszélyes anyagok) igénye relatívan magas gyártási költségeket eredményez, így megindult a keresés az olcsóbb, egyszerűbb, ám a korábban megszokott µm-es felbontást biztosító alternatív eljárások irányába. Egy a célnak megfelelő fluidikához is alkalmas mikrotechnikai alapanyagnak a következő feltételeket kell teljesíteni:

- biokompatibilis,
- nagy mélység/szélesség arányú, szivárgásmentesen lezárható csatornák alakíthatók ki,
- a kialakított csatornák felületei jellege nem akadályozza a folyadékok áramlását,
- a lamináris áramlások biztosíthatóságának érdekében a folyadékterek felületi érdessége pontosan kézben tartható,
- a minta alkotóelemeinek a csatornafalkon történő adszorpciója minimalizálható,
- csatlakoztatható külső, makroszkopikus áramlási rendszerekhez,
- egyéb érzékelőelemekkel is integrálhatók.

---

<sup>3</sup> A félvezetőiparban használt technológiai eljárás, amely során a szubsztrát felületére felvitt fotoérzékeny rétegben szelektív – maszkon keresztül történő – megvilágítással hoznak létre akár néhányszor 10nm felbontású ábrát, majd kémiai módszerekkel munkálják meg a kívánt réteget.

A polimerek kézenfekvő megoldásként kerültek a figyelem középpontjába, hiszen alaptermékalként (általában fotorezisztként felhasználva) már régóta jelen voltak a félvezetőiparban. Hamar megjelentek olyan polimerek, melyek kiemelkedő megmíntázhatóságuk mellett fénytörési- és áteresztési tulajdonságaikban is illeszkednek a napjainkban jelentős részben optikai alapokon folyó bioanalitika vizsgálatok módszertanához. Az egyik ilyen polimer **a poli-dimetil-sziloxán (PDMS)**, mely ma már a mikrofluidikai rendszerek gyakori alapanyaga. Anyagi minősége lehetővé teszi, hogy az eddig alkalmazott alapanyagokkal (Si, üveg) kombinálva használjuk fel, így heterogén mikrofluidikai rendszerek is létrehozhatóak belőle. **A PDMS egyik hátránya azonban, hogy felülete hidrofób, így ahhoz, hogy vizes oldatok vizsgálatánál, passzív rendszerekben is alkalmazható legyen, elengedhetetlen felszínének módosítása.**

### 2.3. Fehérjebekötődés [2][3][4]

Számos tudományág, például a biológia, biotechnológia, orvosbiológia, környezet technológia területén játszik szerepet a fehérjék adszorpciós viselkedésének, valamint a fehérjék és a szilárd felület között létrejövő kölcsönhatások ismerete. A fehérjék a legtöbb felületre adszorbeálódnak, ilyen spontán folyamatok esetén a rendszer szabad entalpiája csökken,

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S < 0,$$

ahol G a szabad entalpia, H a folyamat entalpiája, T a hőmérséklet,  $\Delta S$  pedig a folyamat entrópia változása. Az adszorpció komplex jelenség, a legfőbb hajtóerői közé tartoznak a hidrofób és elektrosztatikus kölcsönhatások, Van der Waals erők, illetve az adszorpció során a fehérje szerkezetében bekövetkező változások. Az adszorpciót befolyásoló tényezők közé tartozik a pH, a hőmérséklet, az ion erősség, de a fehérje, a felület, és az oldószer kémiai és fizikai tulajdonságai is meghatározóak. **Hidrofil felületek esetén** a fehérjék megkötődését leginkább az elektrosztatikus kölcsönhatások és a fehérjék szerkezeti változása befolyásolja. Az elektrosztatikus erők határozzák meg az adszorpció kinetikáját, a már megkötött fehérjék struktúrája pedig a felszínnel kialakítható legoptimálisabb kölcsönhatás érdekében átrendeződik. **Hidrofób felületek esetében** az adszorpció során a rendszer energianyeresége nagyobb. Vizes oldatoknál a felület és a fehérje hidrofób csoportjai között lejátszódó kölcsönhatás az addig szolvatálódott vízmolekulák felszabadulásával jár, ami az entrópia növekedését eredményezi. Ilyenkor a fehérjék szerkezetváltozása is nagyobb mértékű, deszorpció

esetén sok esetben az eredeti konformáció nem alakul ki újra, a molekulák elvesztik bioaktivitásukat, míg hidrophil felszínnél a folyamat legtöbbször reverzibilis. Általánosan elmondható, hogy hidrophób felületek esetén az adszorbeálódott fehérjék mennyisége nagyobb, mint hidrophilek esetén. ***A PDMS esetében a csatorna nagy hidrophób felülete tehát kedvez a mintaoldatban található fehérjék nem-specifikus<sup>4</sup> adszorpciójának.*** Az adszorpció meggátlására legalkalmasabb felületek olyan hidrophil csoportokat tartalmaznak melyek a folyadék fázis felé orientálódnak. A kölcsönhatás az ilyen csoportokkal az entrópia csökkenését eredményezné, így a bekötődés gátolt. Erre alkalmas csoportok vihetők a PDMS felszínére felületaktív anyagok vagy hidrophil polimerek segítségével [5]. bekötődés más módon történő meggátlására alkalmas az adszorpció helyek előzetes telítése egy másik, a mérés szempontjából irreleváns fehérjével. ***A kísérletek során megvizsgáltuk egy nem ionos-, hidrophil láncsal rendelkező tenzid felület módosító és oldat stabilizáló hatását és az előzetes telítés effektivitását is a felületi fehérje adszorpcióra nézve.*** A mérések célja mintaoldatbeli fehérjék nem-specifikus bekötődésének minimalizálása.

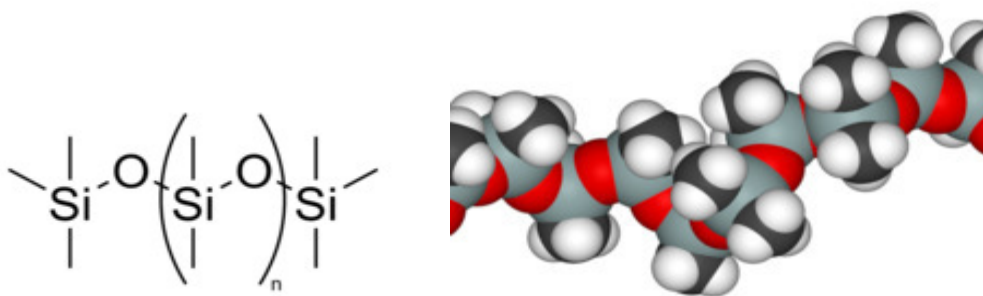
### 3. PDMS módosítása

#### 3.1. A PDMS általános jellemzői

A PDMS (poli-dimetil-sziloxán) eldobható mikrofluidikai rendszerek elterjedten alkalmazott alapanyaga. Alkalmazhatósága egyszerű kezelhetőségének, rugalmasságának, és viszonylag alacsony árának köszönhető. Folyadék transzport rendszerek, mikropumpák és szelepek gyakori alkotója, az ún. rapid prototyping technológiával komplex 3D rendszerek és mikrocsatorna hálózatok is gyorsan elkészíthetők belőle. Megfelelő strukturálásához a szilikon alapú elasztomeren kívül platina tartalmú térhálósító szükséges. A két komponens összekeverésével addíciós reakción keresztül dimetil-sziloxán csoportok keresztbecsatolódnak hálózata jön létre. A polimer lánc kémiai képlete  $(\text{H}_3\text{C})_3[\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{O}]_n\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ , ahol  $n$  az ismétlődő  $[\text{SiO}(\text{CH}_3)_2]$  monomerek száma.

---

<sup>4</sup> Az analitikai rendszer olyan részén történő fehérjebekötődés, amely a detektálási folyamat szempontjából irreleváns, viszont a mérendő mintakoncentrációt a szenzor aktív területén befolyásolhatja.

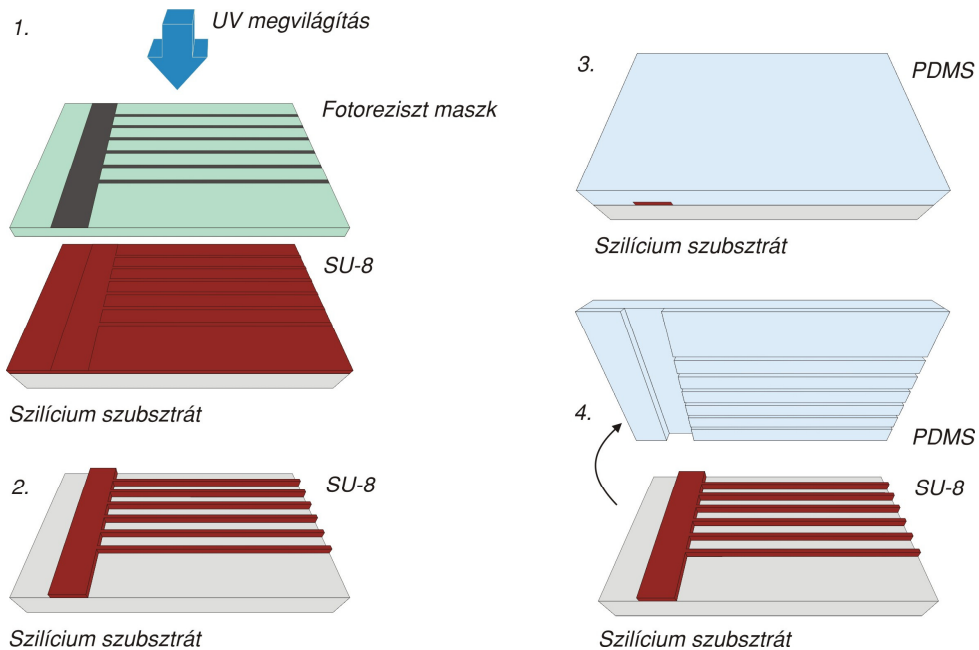


**2. ábra:** A PDMS lánc összetétele és az atomok térbeli elhelyezkedése

A térhálósodási reakció előnye, hogy mellékterméktől mentes, így az anyag zsugorodása minimális (0,1%). A reakció során a PDMS molekuláris szinten kitölti a csatornákat, így a térhálósodott struktúra geometriai méretei pontosan egyeznek a mesterforma méreteivel. A kapott műanyag forma víztiszta, nem fényérzékeny valamint igen kis reakcióképességgel bír. A kis intermolekuláris erők, és az O atom körüli flexibilitás miatt igen rugalmas. További előnye, hogy biológiailag inert, gázáteresztő, illetve kiválóan tapad, nemcsak önmagához, de más Si-bázisú felületekhez is. A fizikai tapadás mellett kémiai kötés is létrehozható a felületek között, így záró-tömítő funkciót is képes megvalósítani, ez a szivárgásmentes csatornák létrehozásának alapja. E tulajdonságok mellett azonban a PDMS komoly hátrányokkal is rendelkezik, melyek megnehezítik felhasználhatóságát a bioanalitikai rendszerekben. Egyik hátránya hidrofób felülete, mely passzív rendszerek létrehozása esetén akadályozza a megfelelő áramlást a csatornában, valamint a mintaoldatbeli hidrofób molekulák kitapadhatnak a felületére, megfelelően kicsi molekulák pedig bediffundálhatnak a tömbfázisba [6]. Képes felületén szerves vegyületeket pl. fehérjéket adszorbeálni, ezzel megváltoztatva a mérendő molekula oldatbeli koncentrációját még azelőtt, hogy a minta a rendszer érzékenyített területét elérné. Természetes degradációja mellett a PDMS szennyezők és víz hatására előbb monomerjeire, majd szén-dioxidra és szerves szilikátokra bomlik [7].

### 3.2. Mikrofluidikai rendszerek készítése PDMS-ből

Mivel a PDMS nem fényérzékeny, megmintázása az úgynevezett *rapid prototyping* technológiával történik (3. ábra).



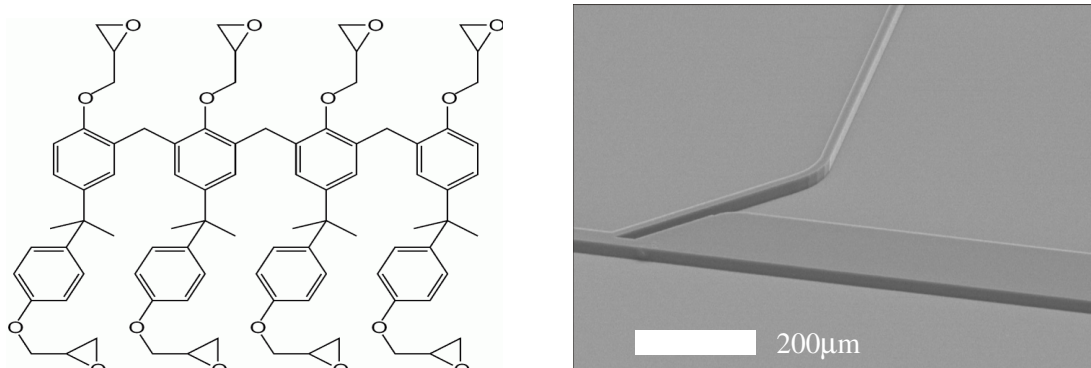
3. ábra: A rapid prototyping technológia lépései

Ennek első lépése a kívánt struktúra negatívját tartalmazó ellendarab elkészítése, majd erre a megfelelő vastagságú, előzetesen homogenizált PDMS felöntése vagy felcentrifugálása. A térhálósodási reakció befejeztével a polimer-réteg lefejthető az ellendarabról, amely hordozó minőségétől függően, alakhűen tartalmazza a mesterminta ellendarabját, ahogy azt a 3. ábra is mutatja.

A mesterminta minősége és az elérhető geometriai tulajdonságok a Si szeletre felvitt fotorezisztól függenek. Nagy mélység-szélesség arányú csatornák készítéséhez használható az SU-8<sup>5</sup>, mely egy epoxi bázisú, negatív fotoreziszt. Nagy viszkozitása miatt a mikrotechnológiában szokásos 2-8 $\mu$ m-rel szemben akár 1mm vastagságú reziszt-réteg is felvihető, mely aztán a szokásos fotolitográfiai eszközökkel mintázható meg. A kívánt sűrűségűre hígított SU-8 hagyományos fotoreziszt centrifugával vihető fel hordozóra. Az előzetes hőkezelés során elpárolog belőle az oldószer, ezután nagy

<sup>5</sup> SU-8: [www.microchem.com](http://www.microchem.com)

energiájú UV-fénnyel megmintázhatóvá válik a lakk. Az anyag nagy fényáteresztő képessége miatt a nagy vastagságú rezisztben is szinte derékszögű oldalfal érhető el (4. ábra).



**4. ábra:** Az SU-8 fotoreziszt molekula-szerkezete (balra), és SU-8 lakk segítségével kialakított lakkábra szilícium szelet felületén (jobbra).

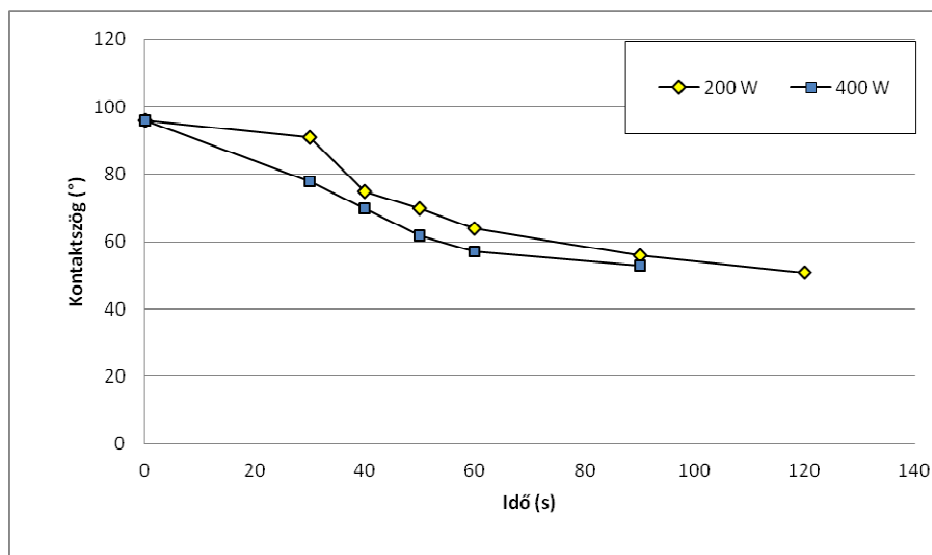
A PDMS szubsztrát készítéséhez az elasztomer és a térhálósító megfelelő arányú összekeverése szükséges, mely a laborban használt Sylgard 184 (Dow Corning)<sup>6</sup> esetében a gyártó által javasolt 10:1 tömegarány. Az elegyet a teljes homogenizálás után a minta negatívját tartalmazó hordozóra öntjük. Fontos, hogy a mintát sík felületre helyezzük, különben a kapott ábra görbült lesz. A kiöntött PDMS viszonylag kis viszkozitása miatt magától kitölti a mintatartót, további formázás nem szükséges. A komponensek összekeverésekor nagy mennyiségű buborék képződik, amit el kell távolítani, mivel torzíthatják a kész ábrát. Szobahőmérsékleten történő szárítás esetén nem szükséges külön buborékmentesítést végezni, a térhálósodás során maguktól eltávoznak a keverékből, ebben az esetben a teljes polimerizációhoz két nap szükséges. A polimerizációs idő után a kész szubsztrát lefejthető a hordozóról. Ezután történik a kész PDMS szubsztrát kötése a fluidikai rendszer másik darabjához.

A megfelelően tömített csatornák készítéséhez a fizikai tapadás mellett O<sub>2</sub> plazmás érzékenyítéssel kémiai kötést kell létrehozni a szubsztrátok között [8][9]. A plazmás kezelés során a Si alapú szubsztrátokon (PDMS, Si, üveg) hidrofíl szilanol (Si-OH) csoportok képződnek, így a felületek között Si-O-Si kötések jöhetnek létre [10]. A képződött hidrofíl csoportok mennyisége határozza meg a felületek között létrejövő kötés erősségét. Ezek a csoportok a PDMS nedvesítését is nagymértékben

<sup>6</sup> Sylgard 184: [www.dowcorning.com](http://www.dowcorning.com)

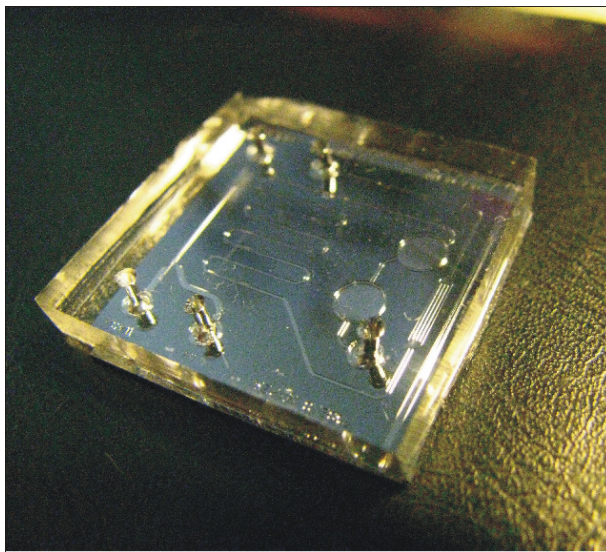
befolyásolják. A nedvesedés vizsgálatával meghatározhatóak a plazmamarás optimális paraméterei. A kötés erőssége az érzékenyítés idejétől és a plazmamaró teljesítményétől függ. Megfelelő paraméterek esetén a plazmamaróból kivett minták között az összerakás után néhány perccel már egyéb nyomás alkalmazása nélkül is megfelelő kötés jön létre. Alacsony teljesítmény illetve rövid marási idő mellett a szubsztrátok között nem alakul ki megfelelő mennyiségű kapcsolódási pont, a darabok könnyen szétválaszthatóak. A plazmás aktiválás során a minta jelentősen felmelegedhet, ami a polimer degradációját is eredményezheti. Ilyen esetben a nedvesítés nem változik, a minta pedig deformálódik.

A megfelelő kötési tulajdonságok elérése érdekében a laborban használt Terra Universal Plasma-Preen készülék optimális paramétereinek meghatározása elengedhetetlen volt. Ennek érdekében a PDMS mintákat különböző RF teljesítmények mellett azonos ideig kezeltem oxigén plazmával. Ezután a minták egy részén kontaktszög mérést végeztem, a többi mintát hasonló körülmények között kezelt PDMS-sel, szilíciummal és üveggel próbáltam bondolni. 5 perc után megpróbáltam szétválasztani a darabokat. Ha a szubsztrátokat csak roncsolódás mellett tudtam szétválasztani akkor a fizikai tapadás mellett már kémiai kötések is létrejöttek. 200W-os RF teljesítmény esetén 150s után, 400W-os teljesítménynél 120s után deformálódott a minta.



5. ábra: A nedvesítés változása az idő függvényében különböző RF teljesítmény mellett.

A próbák alapján megállapítható volt, hogy 60°-os kontaktszög elérése után irreverzibilisen köthetőek egymáshoz a különböző anyagi minőségű szubsztrátok.



**6. ábra:** PDMS / Si mikrofluidikai chip

### 3.3. Felületmódosítási eljárások

#### 3.3.1. Oxidáció

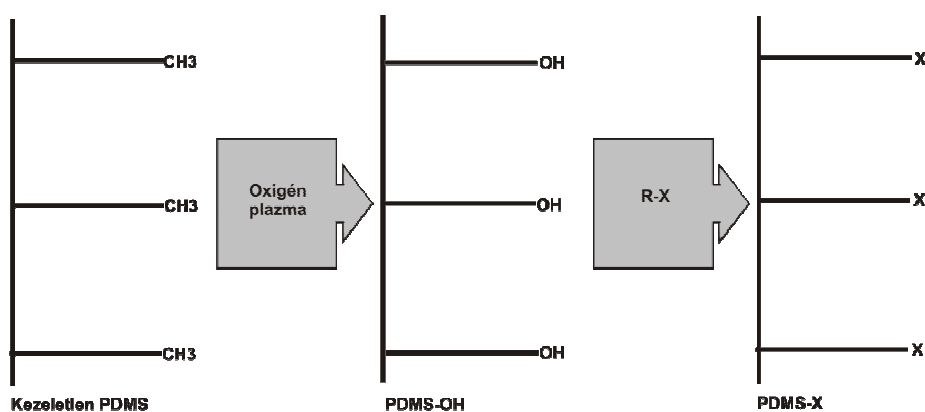
A PDMS felszínének nedvesítési tulajdonsága javítható különböző oxidációs folyamatok által. Az oxidáció során hidrofil szilícium-dioxid ( $\text{SiO}_2$ ) és szilanol ( $\text{SiOH}$ ) csoportok képződnek a felületen. Ez a jelenséget használhatjuk ki a PDMS más felülethez történő kötésekor is. A reakció hosszú idő alatt levegőn is lejátszódik, a reakciósebesség oxigén plazmás kezeléssel [11], valamint peroxid tartalmú oldatokkal sokszorosára növelhető [12]. A módszer hátránya, hogy a felület néhány órán belül újra visszanyeri eredeti hidrofobicitását [13]. Levegővel történő érintkezés során új hidrofób csoportok kerülnek a felszínre, mivel a rövidebb PDMS láncok szabadon mozognak a szilikonban [14]. A visszaalakulás lelassítható az el nem reagált PDMS monomerek szerves oldószerekkel történő kioldásával [15]. Mivel a PDMS apoláris jellegű a kioldáshoz is apoláris oldószer, pl: toluol, kloroform szükséges. Egy másik lehetőség a PDMS hidrofilen tartására a felszín érintkeztetése poláris közeggel [16].

**1. táblázat:** Oxidációs módszerek paraméterei irodalmi adatok alapján.

| Oxidáció típusa           | Körülmények                                                                                                       |
|---------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Oxigén plazmával          | Oxigén nyomás: 1,1mbar, RF teljesítmény 200W, 15s [11]<br>Oxigén nyomás: 70mTorr, RF teljesítmény: 50W, 2min [17] |
| Peroxid tartalmú oldattal | H <sub>2</sub> O/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /HCl (5/1/1), 5min, öblítés vízzel [12]                            |
| Levegővel                 | Nyomás: 100 mTorr, RF teljesítmény: 50 W, 90s [18]                                                                |

### 3.3.2. Grafting - oltás

Egy másik lehetőség a felület módosítására kovalens kötések kialakítása hidrophil molekulákkal. Poli-etilénlikol (PEG) vagy poli-etilénoxid (PEO) láncok kapcsolhatók a PDMS-hez szilán vegyületekkel történő aktiválás után [5] [12]. A leggyakrabban használt aktivátor az APTES<sup>7</sup>, ami az oxidált PDMS-re oldatból, vagy gőzfázisból választható le. A PDMS és a szilán között Si-O-Si kötés jön létre, majd az aminocsoporton keresztül további polimer molekulák köthetők a felülethez [19]. Az oxigén plazmával aktivált felszínhez aminonaftol származékok is kapcsolhatók. A naftolszármazékok aromás gyűrűinek fluorral történő szubsztituálása kémiai és biológiailag is inert felületet biztosítanak. A szubsztituálatlan molekulák oltása elősegíti az áramlást a csatornában, a fluorral kezelt vegyületek viszont kismértékben csökkentik a sebességet az aktiválatlan PDMS-hez képest. Ilyen aminonaftol származékok egyedileg is szintetizálhatóak [17].

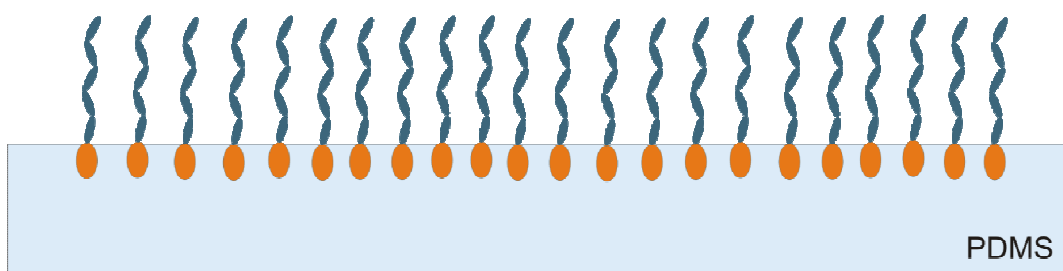


**7. ábra:** Kovalens kötés kialakításának lépései

<sup>7</sup> APTES: 3-Aminopropil-trietoxi-szilán / Sigma Aldrich: [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)

### 3.3.3. Embedding - beágyazás

Hidrofil láncokat tartalmazó polimerek és amfipatikus molekulák beágyazhatók a tömbfázisba, ha a térhálósodási reakció előtt hozzáadjuk őket az elasztomerhez. Beágyazódás esetén a molekula hidrofób csoportja kölcsönhatásba lép a hidrofób PDMS-sel, a hidrofil lánc pedig a folyadék-fázis felé néz, ezzel növelve a felület nedvesítését. Az ilyen módon létrehozott kölcsönhatás erőssége kisebb lesz, mintha kovalens kötéssel kapcsolnánk a felülethez a molekulákat, de stabil hidrofil réteg hozható létre vele [20].



8. ábra: Amfipatikus molekulák elrendeződése a PDMS felületén

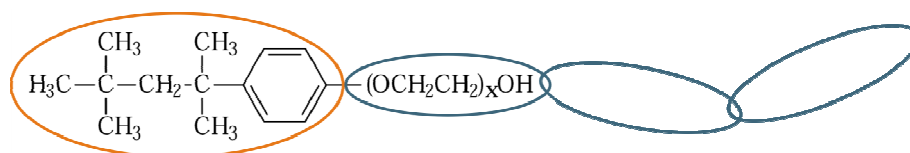
A felsorolt lehetőségek közül a beágyazásos technika alkalmazható leginkább reményteljesen mikrofluidikai rendszerek esetén, ezzel tartósan és stabilan hidrofíllé tudjuk tenni a PDMS szubsztrát felületét. Az oltásos technika alkalmazásánál a már módosított felület nem alkalmas bondolásra, a már kész mikrofluidika belső felületének módosítására sincs lehetőség. Az oxidációs módszerekkel létrehozott hidrofíll rétegek instabilak, így tartós tárolásra alkalmatlanok. A beágyazott molekulák, hasonlóan a rövidebb polimer láncokhoz szabadon mozoghatnak a tömbfázisban, így a nedvesedés érdemben csak hidrofíll közeggel való érintkezés során változik meg. Ez lehetőséget ad arra, hogy a felületmódosítás mellett megfelelő minőségű kötést hozzunk létre.

### 3.4. Konceptió a PDMS felületmódosítására

A kiválasztott módszer segítségével *egyidejűleg szeretnénk növelni a felület nedvesedését és minimalizálni a nem-specifikus fehérje bekötődést*. Az irodalmi hivatkozások alapján a módosításhoz egy felületaktív anyagot, ún. tenzidet használtunk. Ezek a vegyületek mindig tartalmaznak egy hidrofíll és egy hidrofób részt. Ahhoz, hogy a felszín nedvesedését növeljük a molekulának egy hosszú hidrofíll láncsal kell rendelkeznie. Ez a hidrofíll lánc fog a folyadékfázissal érintkezni. Mivel a molekula

mérete körülbelül megegyezik egy rövidebb polimer lánc méretével (10-20 monomer egység), a beágyazás után szabadon mozoghat a tömbfázisban. Vizes oldatok hidrofób felületeken való terítéséhez is gyakran alkalmaznak ilyen vegyületeket. Ha a tenzidet az oldathoz adjuk, akkor az a folyadék-szilárd ill. a folyadék-gőz határfelületen is adszorbeálódik, ezáltal csökkentve az ezeken a határfelületeken kialakuló felületi feszültséget [20]. A kísérletek során különböző tenzid tartalmú PDMS mintákat készítettünk, majd kontaktszög mérő segítségével tanulmányoztuk a felület nedvesedésének változását. Hasonló mintákból készített fluidikai csatornákon fluoreszcensen jelölt fehérjékkel megvizsgáltuk a fehérjebekötődés mértékét. A felületi fehérje adszorpció vizsgálatánál a méréseket elvégeztük egy előzetes fehérje oldattal történt átmosás után, ill. megpróbáltuk stabilizálni a mintaoldatot a PDMS módosításához használt tenziddel. Az irodalmi adatok alapján a Triton X-100<sup>8</sup> felületaktív anyagot választottuk.

A Triton X-100 (TX-100) egy poli-etilénoxid (PEO) láncot tartalmazó nem ionos tenzid, átlagosan 9-10 PEO egységet tartalmaz. Szobahőmérsékleten korlátlanul elegyedik poláris oldószerekkel. Gyakran használják fehérje oldatok készítéséhez stabilizátorként, általában már 0,1% TX-100 alkalmazása is hatásos [21].



**9. ábra:** A Triton X-100 képlete

<sup>8</sup> Triton X-100 / Sigma Aldrich: [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)

## 4. Alkalmazott anyagok és kísérletek leírása

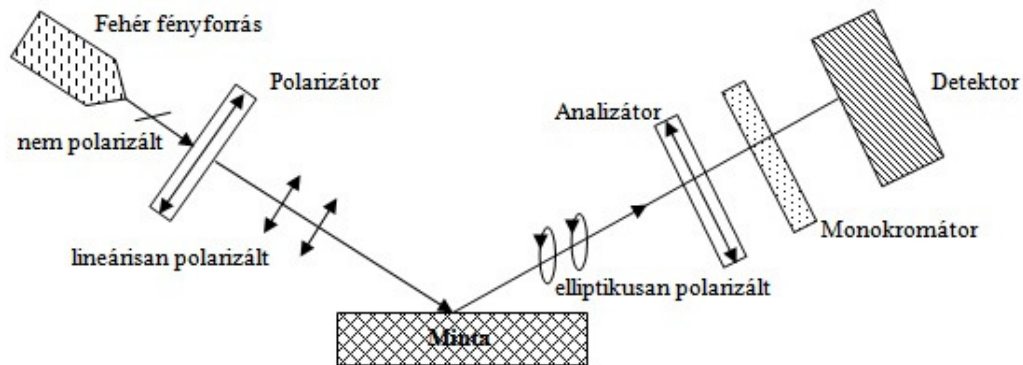
### 4.1. Felhasznált vegyszerek, fehérjék

A mérésekhez készített PDMS mintákhoz Sylgard 184 (Dow Corning) típusú elasztomert és térhálósítószerrel használtunk 10:1 tömegarányban keverve. A minták módosításához általános laboratóriumi használatra készült Triton X-100 (Sigma-Aldrich) elnevezésű felületaktív anyagot használtunk fel, körülbelüli molekula tömege 625g/mol, sűrűsége 1,07 g/mL 25°C-on. HLB értéke 13.5, a kritikus micellaképződési koncentrációja 0,22-0,24mM. Vízen szobahőmérsékleten korlátlanul oldódik,  $\approx 5\%$ -os oldatának pH-ja 6 és 8 között mozog [21]. A csatornák előzetes és utólagos mosásához foszfát pufferoldatot (PBS) alkalmaztunk. Az előállításához 1 db foszfát puffert, kálium-kloridot (KCl) és nátrium-kloridot tartalmazó tablettát oldottunk fel (NaCl) 200 ml vízben. Az oldat 0,01 M foszfát puffer, 0,0027 M kálium-klorid, 0,137 M nátrium-klorid koncentrációjú lett, 25°-on 7,2 pH értékű [22].

A fehérjebekötődés vizsgálatához fluoreszcens izotiocianáttal jelölt humán szérumban albumin (FITC-HSA, Sigma-Aldrich) került felhasználásra. Az albumin molekula súlya 66kDa, a FITC molekula tömege 389,4g/mol. A FITC kioldási tényezője ( $E^{mm}$ ) 495nm hullámhossznál, 7,5 pH érték mellett 84, gerjesztési/emissziós hullámhossza 418nm / 518nm. A FITC-HSA 10mM koncentrációban feloldható 7pH-jú pufferoldatban [23][24]. A mérésekhez 1mg FITC-HSA kristályt oldottunk fel 1ml 7,2 pH-jú foszfát puffer oldatban, majd az oldatot 0,01mg/ml koncentrációjúra hígítottuk szintén pufferoldattal. Az adszorpciós helyek előzetes telítésére foszfát pufferált bovin szérumban albumin (BSA, Sigma-Aldrich) oldatot áramoltattunk át a rendszeren. 1 liter ioncserélt vízben feloldottunk 8g nátrium-kloridot (NaCl), 0,2g és kálium-dihidrogén-foszfátot ( $KH_2PO_3$ ), 1,5g dinátrium-foszfátot ( $Na_2HPO_4$ ), 0,2g kálium-kloridot (KCl) és 10g BSA-t tartalmazó port. Így egy szobahőmérsékleten 7,4 pH értékű, 10mM-os pufferoldatot kaptunk, mely BSA-ra nézve 1w/v%-os [25]. A FITC-HSA vizes oldatának stabilizálásához biológiai alkalmazásoknak megfelelő tisztaságú TX-100-at alkalmaztunk, az 0,01mg/mL FITC-HSA tartalmú oldat 1mL-éhez 0,1V/V% ill. 0,5V/V% tenzidet adtunk.

#### 4.2. Felületi réteg vizsgálata ellipszometriával

Az ellipszometria egy igen sokoldalú, nagy pontosságú optikai módszer vékonyrétegek dielektromos tulajdonságainak meghatározására. Manapság elterjedten alkalmazott biológiai és orvosi kutatásokban, mivel a vizsgálat érintésmentes, és kis energiájú lézersugár használata mellett a minta roncsolódása is elkerülhető, emellett vékonyrétegek jellemzésére használják. A módszer segítségével a minta felszínére beeső monokromatikus fény visszaverődés utáni polarizációs állapotát mérhetjük ki, a vizsgáló fény hullámhosszánál kisebb vastagságú réteg esetén. A méréseket általában reflexiós elrendezésben végzik, a polarizált fény tulajdonságait a minta jellemzői befolyásolják, pl.: vastagság, törésmutató. A kiértékelés során a réteg további minőségére, morfológiájára, kémiai összetételére és elektromos vezetési jellemzőire vonatkozó információ is nyerhető.

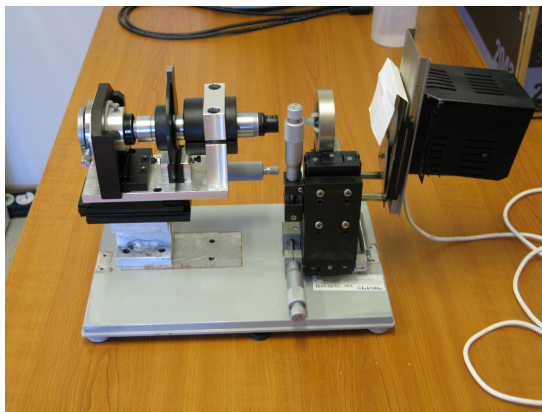


10. ábra: Ellipszométer elvi vázlata

A méréshez négy különböző összetételű PDMS mintát készítettünk, az első mintához nem adtunk tenzidet, a többihez 0,05V/V%, - 0,1V/V%, - 0,2V/V% mennyiségűt adtunk. Egy-egy 3"-es szilícium szeletre 20ml keveréket öntöttünk. A térhálósodott anyagból 1x1cm-es mintákat vágunk ki, amelyeket sík felületükkel felfelé egy tárgylemezhez ragasztottunk. A mérést Woollam M-2000DI ellipszométerrel végeztük. Mivel a minta felülete nem volt párhuzamos az óraüveggel, a mintasík beállítása nehéz volt, ezért a mérés során mikronyalábot alkalmaztunk.

#### 4.3. A felületi nedvesedés vizsgálata

A felületi jelleg megváltozását kontaktszög mérés segítségével vizsgáltuk. A méréshez az ellipszometriához készített PDMS mintákból vágunk ki szintén 1x1cm-es darabokat. A minták felszínére pipettával 5 $\mu$ l-es ioncserélt víz cseppet helyeztünk. A kontaktszög mérőre szerelt kamera segítségével a 12percen keresztül (Canon G9 típusú kamerával, 6x nagyításban) percenként képeket készítettünk. A felvételek alapján határoztuk meg az egyes összetételekhez tartozó kontaktszög változást az idő függvényében.



*11. ábra: A kontaktszögmérő berendezé*

#### 4.4. Nem-specifikus fehérje bekötődés vizsgálata

A felületi fehérje adszorpció vizsgálatát fluoreszcens mikroszkóp segítségével vizsgáltuk. A mérések során a fehérje bekötődés csökkentésére alkalmas módszerek hatását tanulmányoztuk a jelenség minimalizálásának szempontjából. Folyamatosan mértük az intenzitást, így meghatározhattuk az egyes tényezők befolyásoló hatását. Ehhez egy Zeiss Axio Observer Z1<sup>9</sup> típusú mikroszkópot használtunk, 20x nagyítású objektívvel, 100W-os HBO halogén fényforrás és 38 HE GFP szűrő segítségével. A felvételeket az ImageJ<sup>10</sup> program segítségével értékeltük ki, az egymás mellé illesztett képekre egy egyenes mentén megkaptuk az egyes pixelek átlagos intenzitás értékét. Az oldatokat MicroFluid számítógép vezérelt fecskendőpumpa-rendszerrel jutattuk a csatornába, ezzel ellenőrizhető áramlást biztosítva. A mérések során az első és az

---

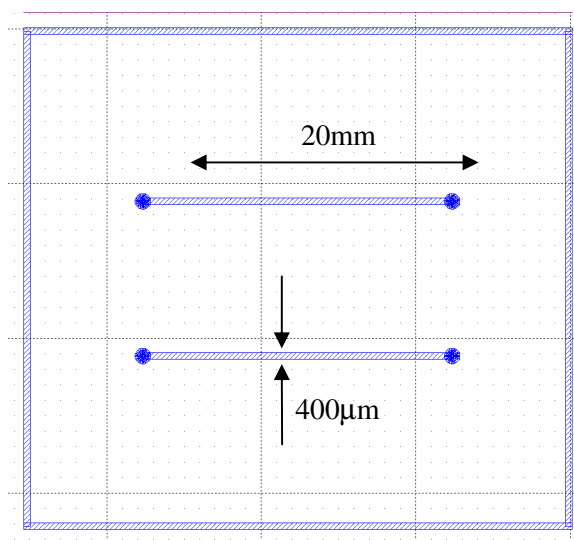
<sup>9</sup> Karl Zeiss Corp.: [www.zeiss.com](http://www.zeiss.com)

<sup>10</sup> National Institutes of Health: [rsbweb.nih.gov/ij/](http://rsbweb.nih.gov/ij/)

utolsó lépés mindig a PBS oldattal történő mosás volt, a nedvesítés növelésének érdekében, illetve hogy lemoszuk a reverzibilisen kötött fehérjéket.

#### 4.5. PDMS /üveg mikrofluidikai rendszer elkészítése

A fehérje adszorpció vizsgálatához csatornákat készítettünk különböző összetételű PDMS-ben, a minták TX-100 tartalma megegyezett az ellipszometria és a kontaktszög mérés során használt arányokkal. A szilícium hordozóra SU8-lakk segítségével (SU-8 2050) az alábbi maszkábrát vittük fel:



12. ábra: A mikrofluidikai csatornák maszkterve

A lakkábra alapján a térhálósodott PDMS-ben 2cm hosszú 400µm széles és 50 µm magas csatornák keletkeztek. Egy lyukasztó segítségével a csatornák végénél szabaddá tettük a beömlő nyílásokat. Ezután a szubsztrátokat ioncserélt vízzel leöblítettük, majd nitrogén áramban megszáritottuk. A PDMS fluidika ellendarabjaként füstölő salétromsavval tisztított tárgylemezeket használtunk. A lemezeket 10 percre a savba mártottuk, majd ioncserélt vízzel mostuk, végül nitrogén áramban szárítottuk. A folyamat során a felületen lerakódott szerves szennyeződések is eltávolítottuk. A PDMS és az üveg mintákat is a Terra Universal Plasma-Preen típusú plazmamaró berendezésbe helyeztük, 400W teljesítményen 3 SCFH oxigén áram mellett 90 sec-ig tartott a felületek érzékenyítése. Ezután a mintákat páronként összenyomtuk.

#### 4.6. Felületi fehérjebekötődés vizsgálata

Először a csatornában 2 percen keresztül foszfát puffer oldatot (PBS-oldat) áramoltattunk át, a nedvesítés növelésének érdekében. A PBS oldat után azonnal a mintaoldatot injektáltuk, mely tartalmazta a FITC-HSA-t. A mintaoldat 30sec-on keresztül áramlott a csatornában, majd 2 percig újra pufferes atmoszféra alkalmaztunk. A mérés során meghatározott időnként 5sec-os exponálási idővel felvételeket készítettünk. A felvételek alapján meghatároztuk a nem-specifikus fehérje adszorpció mértékét a különböző anyagi minőségű csatornában a felvett fluoreszcens intenzitás alapján.

**2. táblázat:** A felületi fehérjebekötődés vizsgálatára elvégzett mérés paraméterei:

| Áramoltatott oldat: | Áramlási idő (sec): | Áramlási sebesség (μl/sec): |
|---------------------|---------------------|-----------------------------|
| PBS                 | 120                 | 2                           |
| FITC-HSA            | 30                  | 2                           |
| PBS                 | 120                 | 2                           |

#### 4.7. Felületi fehérjebekötődés vizsgálata BSA-val blokkolt felületeken

A mérés elején itt is 2 percig foszfát oldatot áramoltattunk a csatornában. Ezután 1 percig foszfát pufferált BSA oldattal mostuk át a rendszert, majd újabb 1 percig puffer oldat következett. A foszfát puffer után ebben az esetben is 30sec-on át áramoltattunk keresztül FITC-HSA oldatot. A mintaoldat után ismét átmostuk a csatornákat. A mérés során meghatározott időnként 5sec-os exponálási idővel felvételeket készítettünk, és meghatároztuk a fehérje bekötődés mértékét, a felvett fluoreszcens intenzitás alapján.

**3. táblázat:** A BSA-val blokkolt felületen tapasztalható fehérjebekötődés vizsgálatára elvégzett mérés paraméterei

| Áramoltatott oldat: | Áramlási idő (sec): | Áramlási sebesség (μl/sec): |
|---------------------|---------------------|-----------------------------|
| PBS                 | 120                 | 2                           |
| BSA                 | 60                  | 2                           |
| PBS                 | 60                  | 2                           |
| FITC-HSA            | 30                  | 2                           |
| PBS                 | 120                 | 2                           |

#### 4.8. Felületi fehérjebekötődés vizsgálata a mintaoldat stabilizálása után

Ezt a vizsgálatot két csatornarendszeren végeztük el, módosítatlan PDMS-ből és 0,1% tenzidet tartalmazó PDMS-ből készült csatornákat használtunk. A csatornákon párhuzamosan áramoltattunk át különböző mennyiségű tenziddel stabilizált fehérje oldatokat. Az első lépés, csakúgy, mint az előző két esetben a csatorna nedvesítésének növelése volt, 2perces puffer oldatos átmosással. A mosás után a TX-100-zal stabilizált fehérje oldatokat jutattuk be a rendszerbe. 30sec eltelte után ismét puffer oldatra váltottunk. A mérés során itt is 5sec-os exponálási időkkel készítettünk felvételeket.

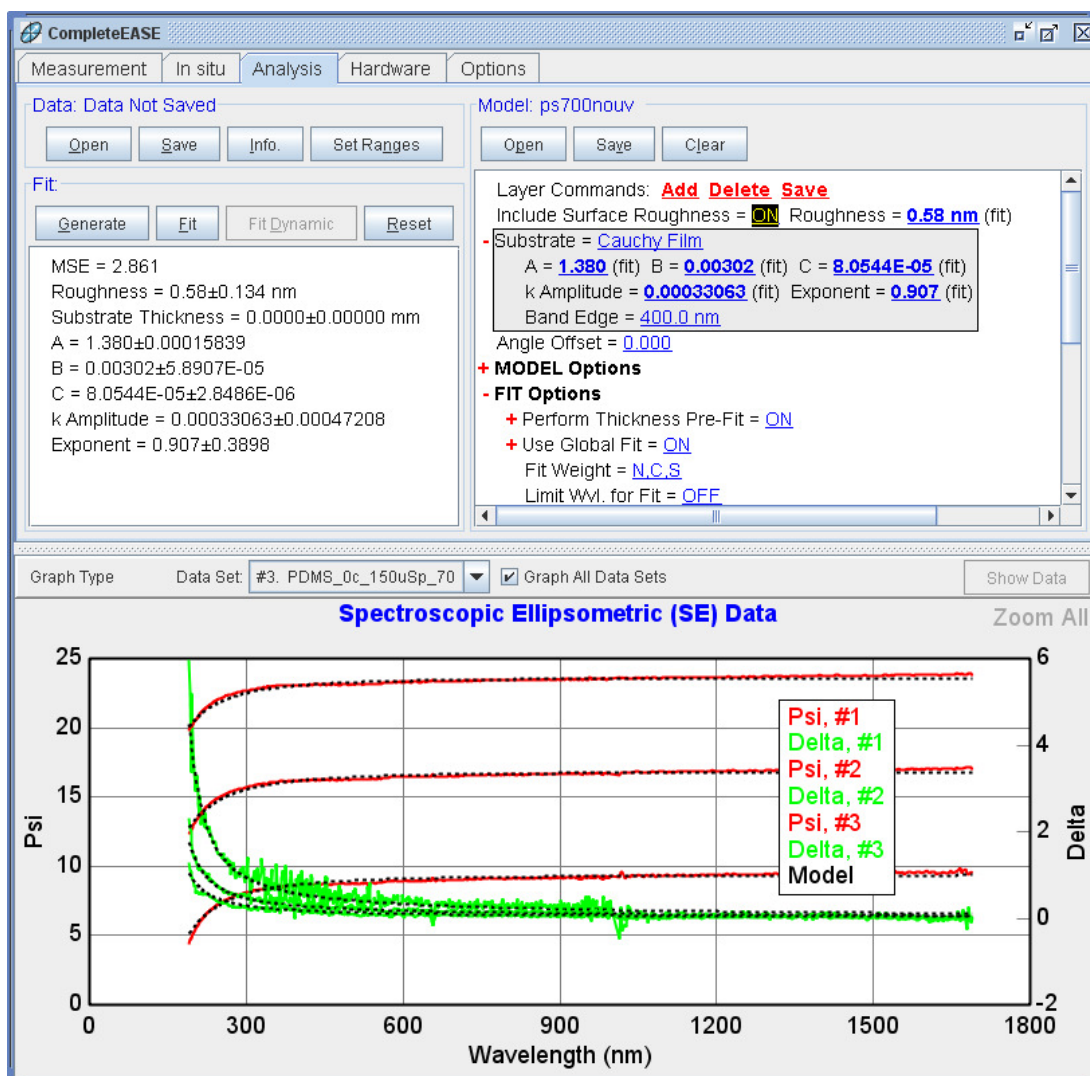
**4. táblázat:** A felületi fehérjebekötődés vizsgálatának paramétereit stabilizált mintaoldat mellett

| Áramoltatott oldat: | Áramlási idő (sec): | Áramlási sebesség (μl/sec): |
|---------------------|---------------------|-----------------------------|
| PBS                 | 120                 | 2                           |
| FITC-HSA+ TX-100    | 30                  | 2                           |
| PBS                 | 120                 | 2                           |

## 5. A kísérleti eredmények kiértékelése

### 5.1. Ellipszometria

Az ellipszometriás mérés eredményeinek kiértékelésekor a PDMS felületén elhelyezkedő TX-100 láncokat egyfajta nanoórdességgként modelleztük, vagyis feltételeztük, hogy a tenzid törésmutatója megegyezik a hordozó törésmutatójával és a levegővel keverve alkot egy módosult törésmutatójú réteget. Ez a feltételezés nem feltétlenül igaz, de a TX-100 törésmutatójára vonatkozó adat nem állt rendelkezésünkre, viszont az érdes réteg vastagságának megváltozása értelmezhető a TX-100 felületi anyagmennyiségének megváltozásaként. A kiértékelés során a Cauchy modellt használtuk, ami több beesési szögű mérések esetén is jól működik.

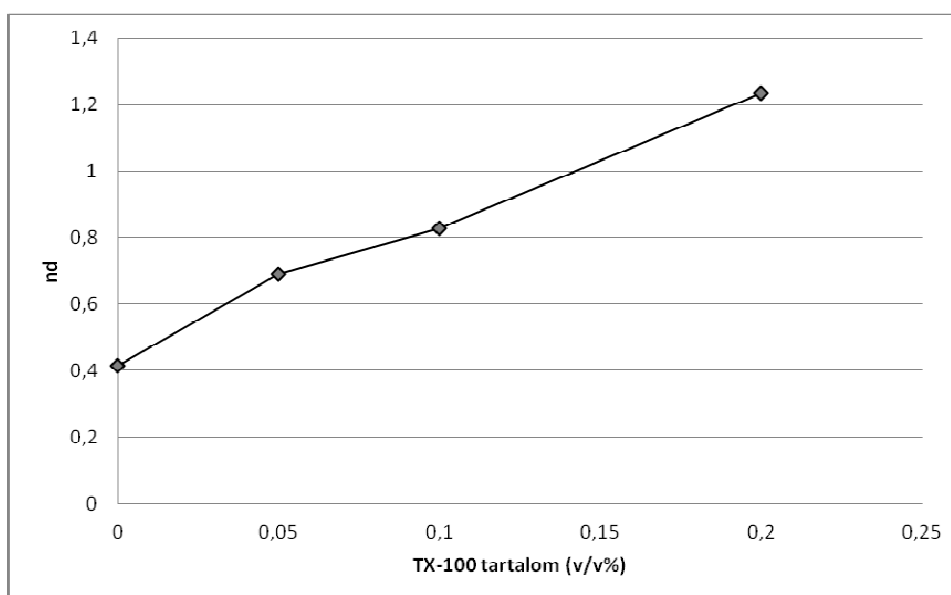


13. ábra: 0,58nm vastag felületi rétegnél számolt spektrumok  
60, 65 és 70 fokban beesési szögekre:

**5. táblázat:** A felületi rétegek modellezett vastagsága és törésmutatója a mérések alapján (a mérés érzékenysége  $\approx 0,1$  nm)

| TX-100 tartalom (V/V%) | Felületi réteg vastagsága (nm) | Törésmutató |
|------------------------|--------------------------------|-------------|
| 0                      | 0,3                            | 1,3846      |
| 0,05                   | 0,5                            | 1,38        |
| 0,1                    | 0,6                            | 1,3818      |
| 0,2                    | 0,9                            | 1,3733      |

A mérés értelmezéséből következőleg molekuláris felületi borítottságra leginkább a törésmutató és a mért vastagságértékek szorzat utal, amelyeket a 14. ábrán ábrázoltam.

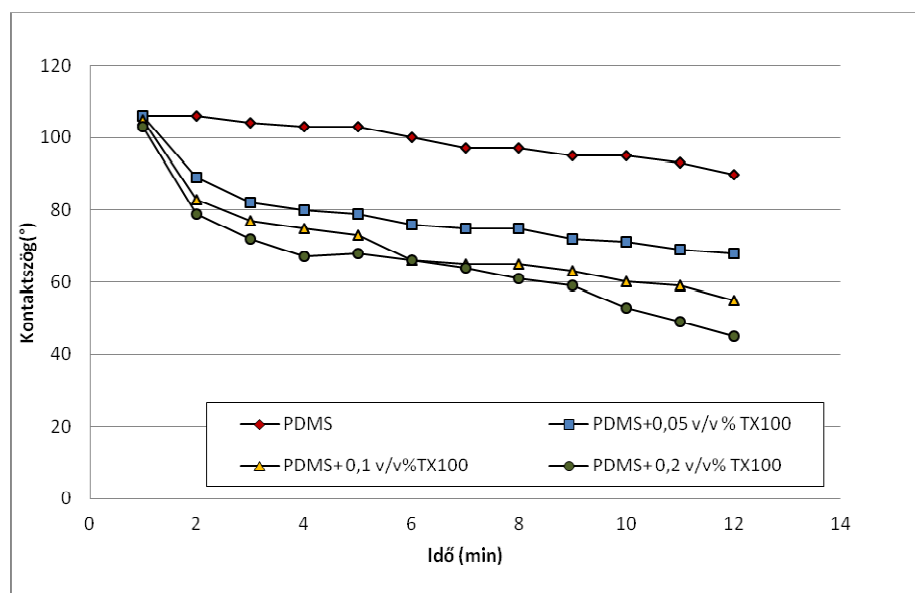


**14. ábra:** A felületi rétegek ellipszometriás mérés során felvett törésmutató és vastagságértékeinek szorzata a PDMS tenzidtartalmának függvényében

Az eredmények alapján megállapítható, hogy a TX-100 tartalom növekedésével megnő a felületi érdesség, nő a molekularéteg vastagsága, vagyis a PDMS felszínén megnő a tenzidmolekulák felüti borítottsága.

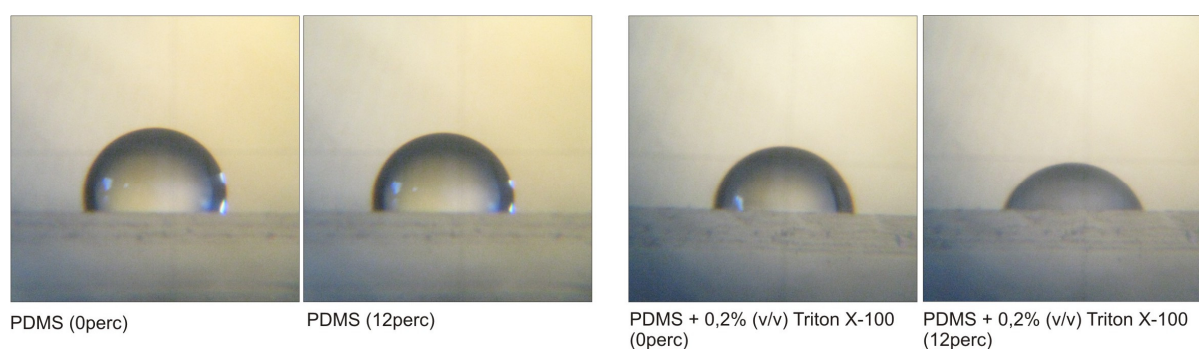
## 5.2. A felületi nedvesítés vizsgálata

Az alábbiakban az elvégzett kontaktszög mérés eredményei kerülnek bemutatásra. A kapott adatok alapján megvizsgáltuk a nedvesedés hatását az áramlási tulajdonságokra a különböző összetételű PDMS-ből készült csatornában. Ezek alapján meghatároztuk egy valós csatornaelrendezésre az áramlási sebességet. A 15. ábrán látható a különböző tenzid tartalmú PDMS minták kontaktszögének változása az idő függvényében. A módosítatlan PDMS minta kontaktszöge közel lineárisan csökken  $106^\circ$ -ról  $90^\circ$ -ra, tehát a nedvesítés alig, mindössze 15,4%-kal változik 12 perc alatt. A TX-100-at tartalmazó minták esetében a változás kezdetben gyorsabb, mint a TX-100-at nem tartalmazó PDMS esetében. 4 perc eltelte után a függvények kezdeti meredeksége csökken, a kontaktszög közel lineárisan változik tovább. Már a 0,05V/V% TX-100 tartalmú mintáknál is megfigyelhető a tenzid nedvesítést növelő hatása. A kezdeti kontaktszög megegyezik az egyszerű PDMS-en mért értékkel, de a mérés végére a nedvesítés 35,9%-kal változik, ami több mint kétszerese a módosítatlan minták esetében. A TX-100 mennyiségének további növelésével a kontaktszög tovább csökkenthető. A 0,1V/V% és a 0,5V/V% TX-100-at tartalmazó PDMS-nél már a 0. mérési pontban is tapasztalható csekély eltérés,  $106^\circ$  helyett  $105^\circ$  illetve  $103^\circ$ . A 0,1 V/V%-os mintánál 12 perc alatt 47,7 %-kal nő a nedvesítés, a 0,2 V/V%-os mintánál a mért szög egészen  $45^\circ$ -ig csökken, ami már 56,4%-os változás.



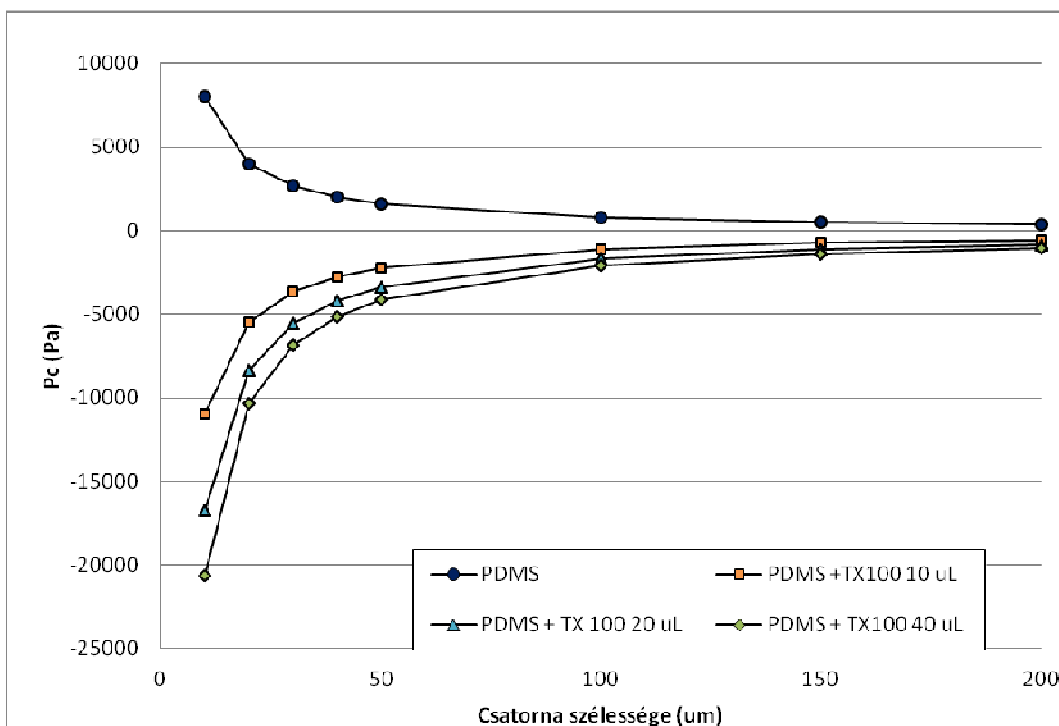
**15. ábra:** A különböző V/V% Triton X-100 típusú tenzidet tartalmazó PDMS minták kontaktszögének változása az idő függvényében.

A diagram adatai alapján egyértelműen megállapítható, hogy a felület aktív anyag beágyazása a PDMS mátrixába jelentősen növeli a felületi nedvesítés mértékét. A 0,2V/V% TX-100-at tartalmazó minták nedvesítésének változása több mint 3,6-szerese a módosítatlan PDMS-nél tapasztalt értéknek. Az ábra alapján az is kiderül, hogy a kontaktszög változásához percekre van szükség. Ennek oka, hogy a beágyazott molekulák szabadon mozoghatnak a polimer láncok között, így kezdetben a tömbfázis belsejében elhelyezkedő molekulák a folyadékfázis irányába diffundálnak. Minél több molekula jut el a minta felszínéig, annál több hidofil PEO lánc fog elhelyezkedni a felületen, így növelve a nedvesítést.



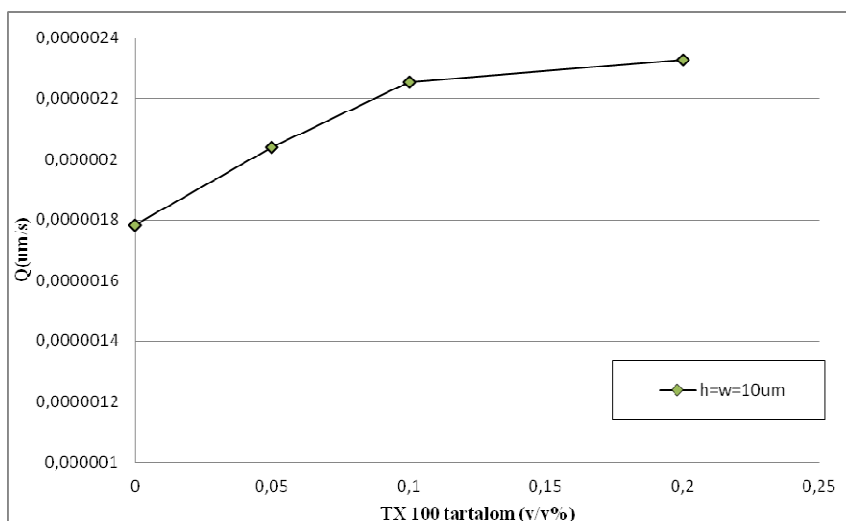
**16. ábra:** A kontaktszögek megváltozása 12 perc elteltével PDMS és tenziddel kevert PDMS esetén.

A mikrofluidikai csatornáknál az áramlást jelentősen befolyásolja a csatornákat alkotó anyagok nedvesíthetősége, így a módosított PDMS kontaktszögének csökkenése megváltoztatja a csatornáknál elérhető áramlási sebességet. A 17. ábra a kapilláris nyomás megváltozását mutatja a különböző méretű és különböző összetételű PDMS-ből készült csatornák esetében. A számításoknál feltételeztük, hogy a csatornák mélysége és szélessége egyenlő, a csatorna felülete csak PDMS-ből áll, illetve azt, hogy a csatornák fala már elérte az általunk mért legjobb nedvesedést.

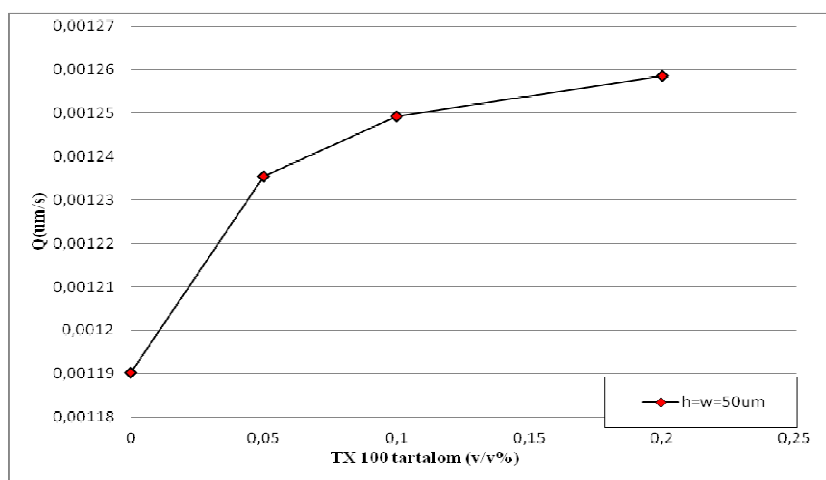


**17. ábra:** A kapilláris nyomás változása a csatornaszélesség függvényében különböző összetételű PDMS szerkezeti anyag esetén

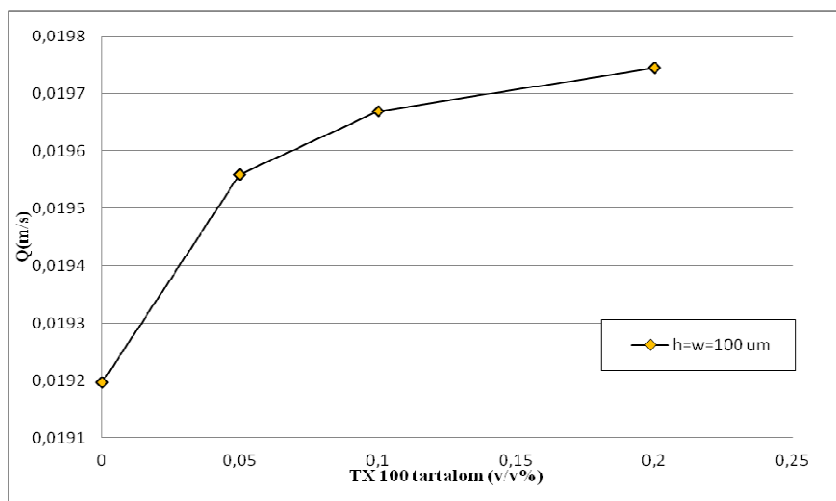
A diagram alapján megállapítható, hogy hidrofób csatornafal esetében a csatorna méretének csökkenése növeli a kapilláris nyomás értékét, fordított arányosság áll fenn a két mennyiség között. Kizárólag a hidrofób felülettel rendelkező PDMS esetében kaptunk pozitív értékeket a nyomásra, ilyenkor a csatorna belső nyomása és a külső nyomás közti különbség jóval kisebb, mint hidrofíli felületek esetén. Módosított összetételű mintáknál a csatorna mérete és a nyomás egyenes arányosságban áll egymással, a csatorna méreteinek növelésével nő a kapilláris nyomás. Minél kisebb a csatorna, annál nagyobb a különbség a külső és a belső nyomás között, a nyomáskülönbség pedig egyenesen arányos az áramlási sebességgel. Azonos méretű, de különböző összetételű PDMS mintákból készített csatornák esetén elérhető áramlási sebességeket szemléltetik az alábbi diagramok.



**18. ábra:** Az áramlási sebesség változása a Triton X-100 tartalom függvényében  
10 μm magas és 10 μm széles, 2 cm hosszúságú csatorna esetén



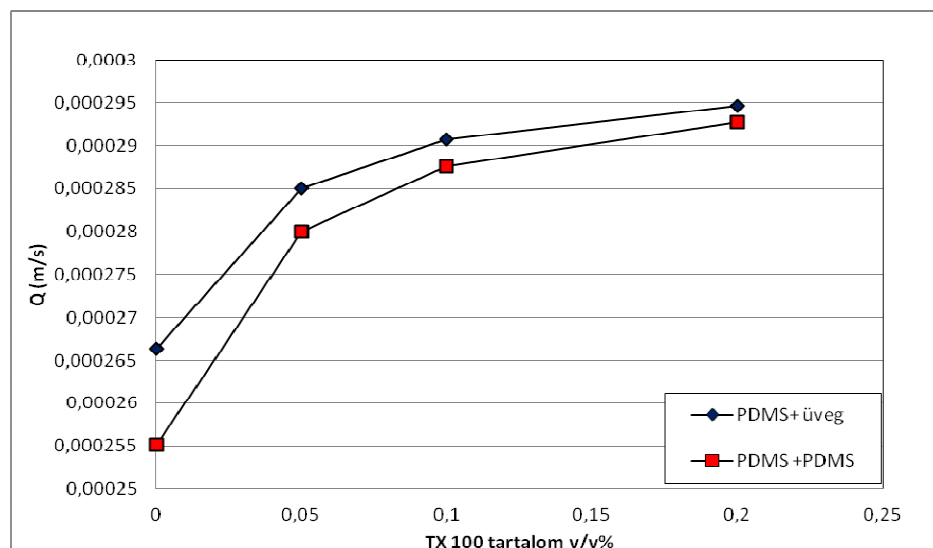
**19. ábra:** Az áramlási sebesség változása a Triton X-100 tartalom függvényében  
50 μm magas és 50 μm széles, 2 cm hosszúságú csatorna esetén



**20. ábra:** Az áramlási sebesség változása a Triton X-100 tartalom függvényében  
100 $\mu\text{m}$  magas és 100 $\mu\text{m}$  széles, 2cm hosszúságú csatorna esetén

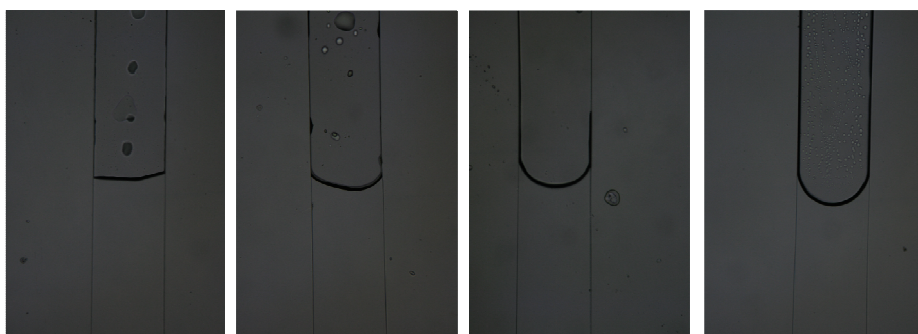
Mindhárom ábránál hasonló tendencia figyelhető meg, a tenzid mennyiségével nő az adott keresztmetszetenél elérhető áramlási sebesség.

Az általunk készített mikrofluidikai csatornák rendszerint heterogének, a PDMS mellett üveg vagy szilícium szubsztrátot alkalmazunk. A víz kontaktszöge üveg felületen  $25^\circ$ , szilíciumon  $\approx 45^\circ$ , ami a módosítatlan PDMS-nél jóval nagyobb nedvesítést eredményez. Tenziddel adagolt mintáknál megközelíthető a szilícium kontaktszöge, így ennek használata nem okoz jelentős növekedést az áramlási sebességben. Üveggel készített rendszernél a felület kis kontaktszöge növeli az áramlási sebességet. A 21. ábra az áramlási sebesség közötti különbséget szemlélteti egy 20 $\mu\text{m}$  széles és 50 $\mu\text{m}$  magas csatornában, melynek az alsó fala üveg.



**21. ábra:** Az áramlási sebesség változása a Triton X-100 tartalom függvényében PDMS/PDMS és PDMS/üveg rendszerek esetében

Az üveg fallal rendelkező rendszerben elérhető áramlási sebesség mindig nagyobb mint a csak PDMS-ből készült csatorna esetén. A hasonló TX-100 tartalomhoz tartozó sebességek között a TX-100 tartalom növekedésével csökken a különbség, mivel a PDMS nedvesíthetősége egyre jobban megközelíti az üveget.



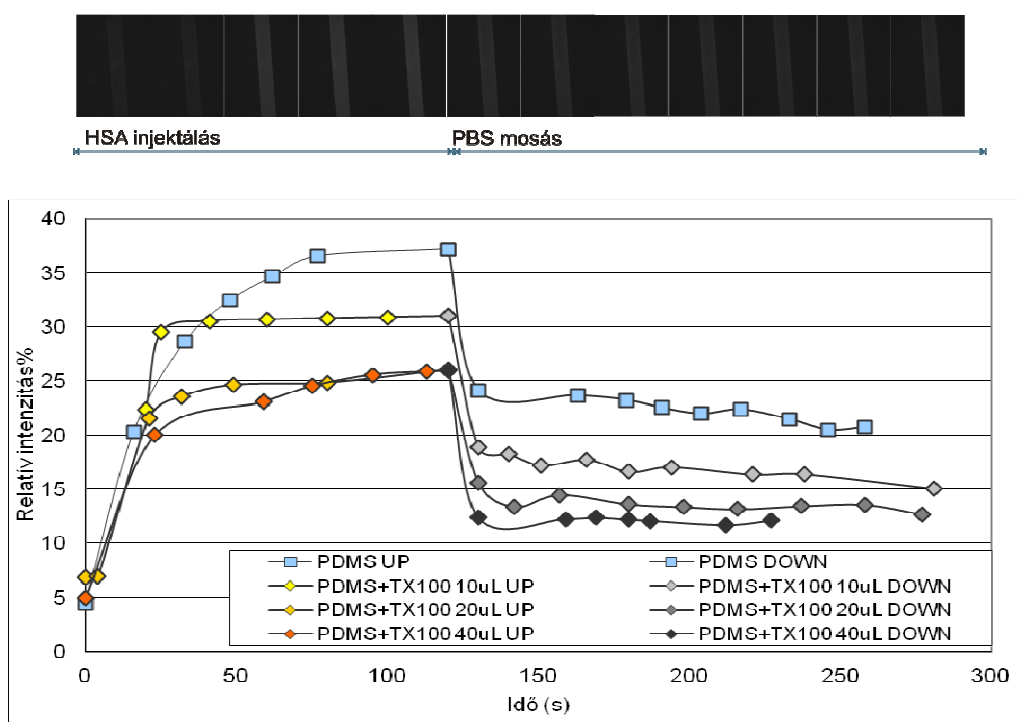
| TX-100 tartalom (V/V%) | 0% | 0,05% | 0,10% | 0,20% |
|------------------------|----|-------|-------|-------|
| Kontaktszög (°)        | 85 | 57    | 33    | 24    |

**22. ábra:** A mikrofluidikai csatornában tapasztalható meniszkusz kontaktszögei különböző tenzid tartalmú PDMS alkalmazása esetén.

### 5.3. Nem-specifikus fehérjebekötődés

A nem-specifikus fehérjebekötődést három különböző módszerrel vizsgáltuk, megfigyelve a csatornák falán bekötődött fluoreszcensen jelölt molekulák által adott relatív intenzitást, FITC-HSA oldattal történő átmosás után.

Az első esetben a pufferes átmosáson kívül nem alkalmaztunk más felületkezelést, és a mintaoldatot sem módosítottuk, így ebből a mérésből a Triton X-100 bekötődés gátló hatására lehetett következtetni. A 23. ábrán a mintaoldat majd a puffer átpumpálása során mért intenzitás értékek láthatóak különböző összetételű PDMS/üveg rendszer esetén.



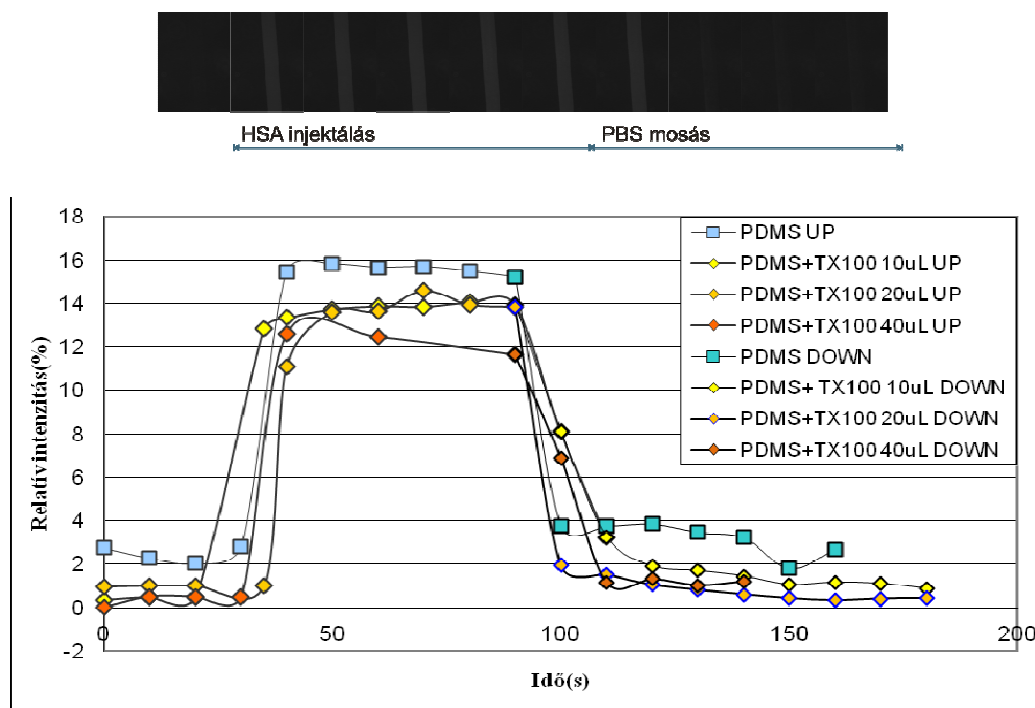
23. ábra: Relatív fluoreszcens intenzitás az idő függvényében

különböző Triton X-100 tartalmú PDMS / üveg rendszer esetén

A folyamat elején az intenzitás folyamatosan nő, egészen 120s-ig, eddig áramoltattuk a HSA oldatot a csatornában. A módosítatlan PDMS éri a legmagasabb intenzitás értéket az áramoltatás végén, 37,2%-ot. A TX-100 tartalom növelésével az intenzitás maximum csökken, 0,05 V/V% TX-100 tartalom mellett a maximum 31%. 0,1V/V% és 0,2V/V% tenzid jelenlétében nincs jelentős különbség az elért maximumok között, 26% illetve 25,9%. Mind a négy mintánál látható, hogy kezdetben az intenzitás meredeken

növekszik, majd  $\approx 20\%$ -os intenzitás elérése után csökken. Ez az érték az áramló oldat intenzitása, ekkor még elhanyagolható a bekötődés a csatorna falán. Ezután az intenzitás növekedése arányos lesz az adszorbeálódott fehérjék mennyiségével. A TX-100 tartalom növelésével tehát csökkenthető a kitapadás a falon. A mintaoldat után pufferrel mostuk át a csatornákat, ennél az időpillanatnál a függvényértékek hirtelen csökkennek. A csökkenés körülbelül megegyezik a mintaoldat alapjelével. Minél kevesebb volt az intenzitás maximum, annál kisebb lett a mosás utáni intenzitás is, de a 0 időpillanathoz tartozó értéket nem érték el. Ez alapján a felületen adszorbeálódott fehérjék a puffer oldatos mosás után nem deszorbeálódnak, a folyamat irreverzibilis volt. Habár a telítési intenzitást nagymértékben befolyásolta a TX-100 tartalom, a bekötődést nem lehet ilyen módon teljesen megakadályozni, a felületen maradt fehérjék intenzitása jelentős.

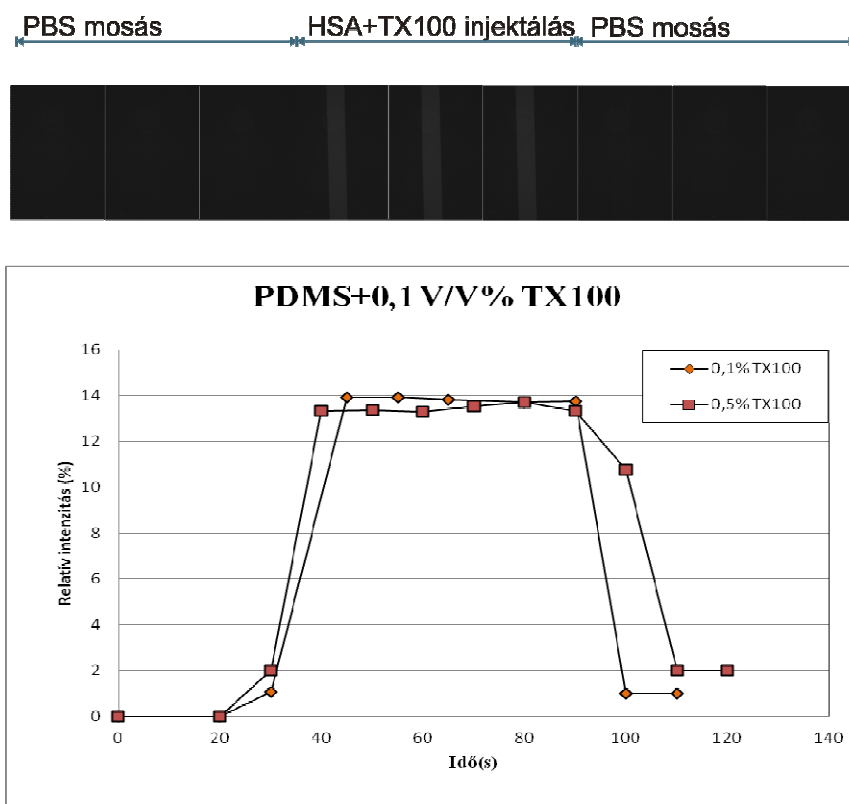
A második esetben a felületi kötőhelyeket előzetesen telítettük egy, a mérés szempontjából irreleváns fehérjével. A telítés után átmostuk a mintaoldattal majd ismét pufferrel. A 24. ábrán láthatóak a különböző mintákon mért intenzitások a BSA oldattal történt átmosás után.



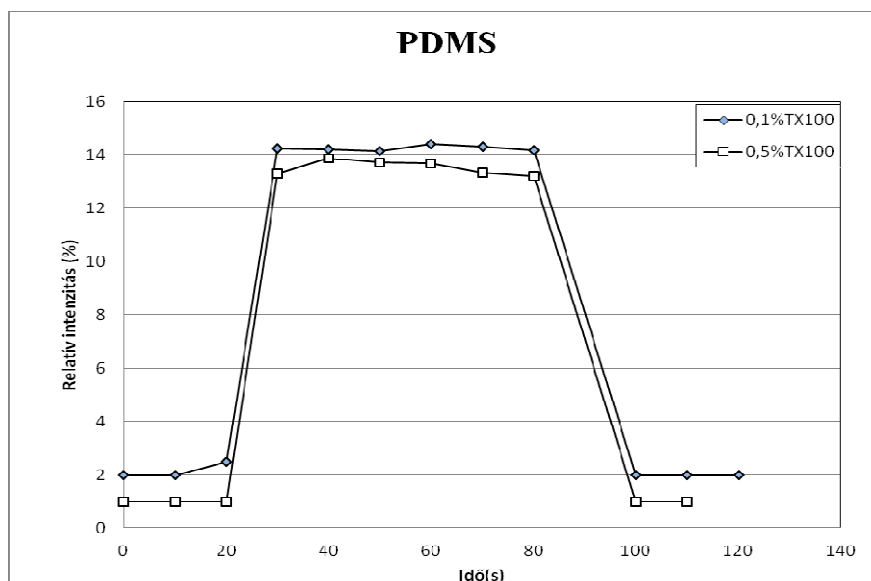
**24. ábra:** Relatív fluoreszcens intenzitás az idő függvényében különböző Triton X-100 tartalmú PDMS/üveg rendszer esetén BSA oldattal történt előmosás után

A mérés elején felvettük a BSA oldattal átmosott csatornák intenzitását, ezek közelítőleg egyforma értékek. A mintaoldat elindításakor az intenzitás hirtelen megnövekszik, a módosítatlan PDMS esetén a legnagyobb mértékben, a TX-100 tartalom növekedésével egyre kevésbé. A puffer oldat átnyomásakor az intenzitás ismét hirtelen változik, mind a 4 minta esetében megközelíti a kiindulási értéket. A maximumok közötti különbség a TX-100 hatása. A tenzid csökkenti az adszorbeálható fehérjék mennyiségét. Mivel a mérés során egyenlő ideig áramoltattuk át a BSA oldatot minden mintán, így az adott idő alatt a módosítatlan PDMS még nem telítődött teljesen, a mintaoldat fehérjei irreverzibilisen adszorbeálódtak a felületre. A TX-100 adagolásával csökkent bekötődési helyek száma, így a meghatározott átmosási idő alatt ezeknek nagyobb hányada töltődött be, csökkentve az irreverzibilis adszorpció lehetőségét.

A harmadik esetben TX-100-at adagoltunk a mintaoldathoz, ezzel stabilizálva az oldatot. Megvizsgáltuk a TX-100 oldatstabilizáló hatását sima és 0,1 V/V% TX-100-at tartalmazó PDMS/üveg csatornáknál. A 25. és 26. ábra a stabilizált oldattal mért intenzitás értékeket mutatja



**24. ábra:** Relatív intenzitás az idő függvényében 0,1 V/V% Triton X-100-at tartalmazó PDMS/üveg rendszerben, különböző mennyiségű Triton X-100-at tartalmazó mintaoldatoknál



**25. ábra:** Relatív intenzitás az idő függvényében PDMS/üveg rendszerben, különböző mennyiségű Triton X-100-at tartalmazó mintaoldatoknál

Mindkét mérés esetében felvettük a puffer oldattal átmosott csatornáról érkező fluoreszcens intenzitás jelét. Ezután átpumpáltuk a stabilizátort tartalmazó oldatokat. Sem különböző összetételű PDMS mintáknál, sem a különböző TX-100-at tartalmazó mintaoldatok esetén nem látható jelentős különbség a maximális intenzitásnál. A puffer oldat elindítása után azonnal az eredeti intenzitás volt mérhető. Ez alapján az oldat stabilizálása teljesen mértékben meggátolja a nem-specifikus bekötődést a csatornafalon.

## 6. Összefoglalás

Az ellipszometriás vizsgálat alapján egyértelműen megállapítható, hogy a TX-100 beágyazása a PDMS mátrixba megváltoztatja a felületi érdességet. Ez arra utal, hogy *a tenzid molekulák egy része nem a tömbfázis belsejében tartózkodik, hanem a felszíni rétegben.*

A nedvesítési vizsgálat alapján azonban ez még nem befolyásolja nagymértékben a felület jellegét, a kezdeti kontaktszög az összetételtől függetlenül közel állandó érték volt. *A felszín vízzel vagy valamilyen vizes oldattal való tartós érintkeztetése viszont jelentősen növeli a PDMS hidrofilitását,* köszönhetően a TX-100 molekulák diffúziójának. *A TX-100 tartalom növelésével jelentős különbségek adódtak az elérhető kontaktszög értékek között, ami kihatással volt az adott összetétel mellett elérhető áramlási sebességekre PDMS csatornáknál.* A számítások alapján a csatorna méretétől és felület hidrofilitásától függően több nagyságrend különbség is lehet a különböző rendszerek között. Ha a PDMS mellett egy másik anyag is felhasználásra kerül a mikrofluidikai chipben, akkor annak felszíni jellege tovább befolyásolhatja az áramlási paramétereket. A rendelkezésre álló anyagválaszték mellett a szilícium használata nem javítana jelentősen a rendszer adottságain, hiszen a módosított PDMS-sel a szilíciumhoz hasonló nedvesítés érhető el. Üveg alkalmazása esetén azonban a rendszer tulajdonságai javulnak, mivel az üvegéhez hasonló nedvesedés elérésére nincs lehetőség ilyen módosítás mellett. Lényeges különbség figyelhető meg a kapilláris nyomás értékeknél is a módosított és módosítatlan PDMS között. *A felület már kis mennyiségű TX 100 tartalom mellett is jelleget vált, ez a változás lehetővé teszi, hogy passzív, vizes bázisú mintákhoz használható transzportfluidikai rendszert valósítsunk meg PDMS-ben.* Tapasztalataink alapján 0,2 V/V% TX-100-at meghaladó tartalom esetén valószínűleg a felületi érdesség nagymértékű növekedése miatt nem lehet szivárgásmentes csatornákat kialakítani, 0,4 V/V% TX-100 tartalom elérése után pedig a térhálósodási reakció nem játszódik le tökéletesen, a kapott PDMS tulajdonságai jelentősen megváltoznak.

*Az amfipatikus molekulák beágyazása a tömbfázisba a nem-specifikus fehérje adszorpciót is kedvezően befolyásolta.* A mérések alapján elmondható, hogy *a TX-100 tartalom növelése csökkenti az irreverzibilisen kötődött fehérjék mennyiségét.* A

csökkenés mértéke azonban nem elégséges a bioanalitikai rendszerek esetében elvárt értékek megközelítéséhez, így mindenképpen valamilyen kiegészítő módszerre van szükség az adszorpció minimalizálására. Mindkét megvizsgált kiegészítő módszer javít a nem-specifikus bekötődés mértékén, a mért maradó intenzitás értékek csökkentek. ***A felszín blokkolása az adszorpciós helyek előzetes betelítésével szinte teljesen minimalizálta az irreverzibilisen kötött fehérjék mennyiségét. A FITC-HSA oldalt stabilizálása hasonlóan jó eredményeket mutatott,*** a mérés után nem volt észlelhető fluoreszcens fénykibocsátás. Bár mindkét módszer alkalmazása viszonylag egyszerű és olcsó, a mintaoldat ilyen jellegű stabilizálásának hatása az analitikai rendszer szelektivitására és érzékenységére még nem ismert. Amennyiben a TX-100 a rendszernek ezen tulajdonságain nem változtat, akkor ez a módszer kerülne előtérbe a BSA oldat alkalmazásával szemben, hiszen így az elvégzendő lépések száma a chip használata során csökken.

A jövőben még vizsgálnunk kell a TX-100-zal módosított PDMS előregedését, és ennek hatását a felületi tulajdonságokra, valamint a tenzid molekulák diffúziójának sebességét is. Ez alapján meghatározható, hogy mekkora a legjobb nedvesedés eléréséhez szükséges egyensúlyi idő, mennyi idő után diffundál át teljes mértékben a folyadékfázisba annyi molekula, hogy a PDMS nedvesedése csökkenjen. A megfelelő nedvesedés mellett a következő feladatok közé tartozik még egy ***mikroméretű passzív kapillaris-pumpa kialakítása***, ami ellátná az analitikai rendszerben a transzport feladatokat. A PDMS helyett, vagy mellett más anyagok felhasználása is fontolóra vehető, pl: egy szilícium / SU-8 / üveg rendszer kialakítása, amennyiben az SU-8 felülete megfelelően módosítható.

## 7. Köszönetnyilvánítás:

Hálás vagyok Dr Fürjes Péternek, a kutatásban való részvételi lehetőségért, a dolgozat lelkes és alapos ellenőrzéséért, valamint az MTA MFA MEMS labor dolgozóinak, a labormunka érdemi segítségével.

## 8. Irodalmi hivatkozások:

- [1] M. Zimmermann, H. Schmid, P. Hunziker, E. Delamarche, Capillary pumps for autonomous capillary systems, *Lab Chip*, 2007, 7, 119–125
- [2] K. Nakanishi, T. Sakiyama, K. Imaura. On the adsorption of proteins on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2001.
- [3] M. Rabe, D. Verdes, S. Seeger Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces, *Advances in Colloid and Interface Science*, 2011
- [4] V. Hlady and J. Buijs, Protein adsorption on solid surfaces, *Current Opinion in Biotechnology* 1996, 7, 72-77
- [5] H. Chen, M. A. Brook, H. Sheardown, Silicone elastomers for reduced protein adsorption, *Biomaterials*, 2004, 12, 2273-2282
- [6] R. Mukhopadhyay, When PDMS isn't the best, *Anal. Chem.*, May 2007, 3248-3253
- [7] Dow Corning Corporation, Degradations of Silicon Polymers in Nature, 1998.
- [8] J.Y. Kim, J.Y. Baek, K.A. Lee, S.H. Lee, Automatic aligning and bonding system of PDMS layer for the fabrication of 3D microfluidic channels, *Sensors and Actuators A*, 2005, 119, 593–598
- [9] Y. Chena, S. Kang, L. Wu, S. Lee, Fabrication and investigation of PDMS microdiffuser/ nozzle, *journal of materials processing technology* 2008, 198, 478–484
- [10] [http://www.harrickplasma.com/applications\\_microfluidic.php](http://www.harrickplasma.com/applications_microfluidic.php)
- [11] E. Delamarche, A. Bernard, H. Schmid, B. Michel, H. Biebuyck, Patterned delivery of immunoglobins to surfaces using microfluidic networks, *Science* 1997, 286, 779-781
- [12] Sui., G., Wang, J., Lee, C.-C., Lu, W., Lee, S.P., Leyton, J.V., Wu, A.M., Tseng, Solution phase surface modification in intact PDMS microfluidic channels, *Anal. Chem.*, 2006, 78, 5543-5551
- [13] S. Bhattacharya, Y. Gao, V. Korampally, A. Grant, K. Gangopadhyay, S. Gangopadhyay, Mechanics of plasma exposed spin-on-glass (SOG) and polydimethyl siloxane (PDMS) surfaces and their impact on bond strength, *Applied Surface Science* 2007, 253 4220–4225
- [14] J. Kim, M.K. Chaudhury, M.J. Owen, The mechanism of hydrophobic recovery of PDMS elastomers exposed to partial electrical discharges, *J. Colloid Interface Sci.* 2001, 244, 200-207
- [15] K. Yu, Y. Han, . A stable PEO-tethered PDMS surface having controllable wetting property by a swelling-deswelling process, *The Royal Society of Chemistry*, 2006, 2, 705-709

- [16] J.N.Lee, C. Park, G.M. Whitesides, Solvent compatibility of PDMS-based microfluidic devices, *Anal Chem.* 2005, 75, 6544-54
- [17] G. Cortese, F. Martina, G. Vasapollo, R. Cingolani, G. Gigli, G. Ciccarella, Modification of micro-channel filling flow by poly(dimethylsiloxane) surface functionalization with fluorine—Substituted aminonaphthols, *Journal of Fluorine Chemistry*, 2010,3, 357-363
- [18] V. Sharmaa, M. Dhayala, Govindb, S.M. Shivaprasadb, S.C. Jai, Surface characterization of plasma-treated and PEG-grafted PDMS for micro fluidic applications, *Vacuum* 2007, 81, 1094–1100
- [19] S. Talaei, O. Frey, P. D. van der Wal, N. F. de Rooij, M. Koudelka-Hep, Hybrid microfluidic cartridge formed by irreversible bonding of SU-8 and PDMS for multilayer flow applications, *Procedia Chemistry* ,2009, 1,381–384
- [20] J. Seo, L. P. Lee, Effects on wettability by surfactant accumulation/depletion in bulk polydimethylsiloxane (PDMS), *Sensors and Actuators B* , 2006, 119, 192–198
- [21][http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Product\\_Information\\_Sheet/1/t8532pis.Par.0001.File.tmp/t8532pis.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/1/t8532pis.Par.0001.File.tmp/t8532pis.pdf)
- [22][http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=hu&N4=P4417|SIGMA&N5=SEARCH\\_CONCAT\\_PNO|BRAND\\_KEY&F=SPEC](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=hu&N4=P4417|SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC)
- [23].[http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Product\\_Information\\_Sheet/a7016pis.Par.0001.File.tmp/a7016pis.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/a7016pis.Par.0001.File.tmp/a7016pis.pdf)
- [24]<http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=B3D952BB-8404-460C-B6F3-410E23D78308>
- [25][http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Product\\_Information\\_Sheet/1/p3688pis.Par.0001.File.tmp/p3688pis.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/1/p3688pis.Par.0001.File.tmp/p3688pis.pdf)