



## MIKRO- I NANO-SYSTEMY W CHEMII I DIAGNOSTYCE BIOMEDYCZNEJ MNS-DIAG



PROJEKT KLUCZOWY WSPÓLFINANSOWANY PRZEZ UNIĘ EUROPEJSKĄ Z EUROPEJSKIEGO FUNDUSZU ROZWOJU REGIONALNEGO; UMOWA Nr. POIG.01.03.01-00-014/08-00

### RAPORT CZĄSTKOWY PROJEKTU MNS DIAG 5 E-LoC „Lab-on-a-chip” z detekcją elektrochemiczną

Raport 5 - 1. Cele projektu i jego realizacja

**SUB-NANO „Matryce czujników mikromechanicznych do detekcji bakterii Gram-ujemnych i ich endotoksyn”**

**T.Gotszalk**

Zatwierdził:

Dr inż. Piotr Grabiec, prof. ITE  
Koordynator Projektu MNS DIAG

Data: ...31.01.2014....

## 1. Cele naukowe projektu

**Celem naukowym** podprojektu 5 SUB-NANO „Matryce czujników mikromechanicznych do detekcji bakterii Gram-ujemnych i ich endotoksyn” było opracowanie metody i techniki pomiarowej obserwacji obecności endotoksyn bakterii gram ujemnych za pomocą matryc dźwigni mikromechanicznych. Obejmowało to opracowanie rodziny matryc czujników mikromechanicznych przeznaczonych do optycznej i piezorezystywnej detekcji ugięć, optycznych, optoelektronicznych i elektronicznych układów sterujących i pomiarowych wraz z oprogramowaniem do akwizycji i przetwarzania sygnałów i analizy uzyskanych wyników.

## 2. Cele techniczne i gospodarcze projektu

Celem technicznym jest przygotowanie stanowisk laboratoryjnych umożliwiających przeprowadzenie detekcji endotoksyn bakterii Gram ujemnych za pomocą matryc czujników mikromechanicznych. Obejmuje to technologię wytworzenia elementów mikromechanicznych, układów detekcji, sposobu funkcjonalizacji i wykonania pomiaru. Dzięki projektowi powstanie platformą technologiczno-badawczą umożliwiającą realizację wielozespołowych i interdyscyplinarnych projektów ściśle związanych z inżynierią biomedyczną i diagnostyką biochemiczną.

## 3. Realizacji projektu.

### 3.1. Członkowie konsorcjum.

Wydział Elektroniki Mikrosystemów i Fotoniki Politechniki Wrocławskiej (WEMiF PWr), Zakład Metrologii Mikro- i Nanostruktur (ZMMiN). Grupa badawcza odpowiedzialna za opracowanie metod i techniki pomiarowych dla matryc czujników mikromechanicznych. Jedyna grupa badawcza w Polsce tak szeroko zajmująca się zastosowaniem techniki mikrosystemów w ilościowych badaniach właściwości mikro- i nanostruktur. Prace prowadzone w projekcie obejmowały opracowanie i zastosowanie precyzyjnych układów elektronicznych, układów optoelektronicznych i optomechanicznych, oprogramowania analizy wyników i sterujących.

Politechnika Wrocławska, Wydział Elektroniki Mikrosystemów i Fotoniki-PWr, Zakład Metrologii Mikro- i Nanostruktur- WEMiF ZMMiN-prace prowadzone w projekcie obejmowały opracowanie i zastosowanie precyzyjnych analogowych i cyfrowych układów elektronicznych, układów optoelektronicznych i optomechanicznych, oprogramowania sterowania, akwizycji i analizy wyników. Badania z zastosowaniem układów mikromechanicznych prowadzone były w powietrzu i cieczach.

Prof. dr hab. inż. Teodor Paweł Gotszalk ukończył studia w Politechnice Wrocławskiej na Wydziale Elektroniki w 1989 roku i na Wydziale Elektrycznym w 1991 roku. Od 1991 roku był słuchaczem studiów doktoranckich w Politechnice Wrocławskiej. Od 1993 roku przebywał na dwuletnim stypendium Deutscher Akademischer Austauschdienst (DAAD) na Uniwersytecie w Kassel w Niemczech. W latach 1996 i 2005 uzyskał odpowiednio stopnie doktora i doktora habilitowanego nauk technicznych. Od 1995 roku jest pracownikiem Politechniki Wrocławskiej. W latach 1995-2005 był kilkakrotnie stypendystą fundacji DAAD, przebywał również na stażach fundowanych przez Uniwersytet w Kassel i Physikalisch Technische Bundesanstalt (PTB) w Braunschweig (Niemcy). W latach 2001-2003 spędził łącznie 6 miesięcy na stażu przemysłowym w koncernie Siemens, pracując w Centrum Badawczo- Rozwojowym Mikrosystemtechnik w Monachium (Niemcy). W 2010 roku przebywał na stypendium Komisji Fulbrighta Senior Research Grant w Uniwersytecie Stanu Nowy Jork w Albany (USA) w College of Nanoscience and Engineering (CNSE), gdzie realizował badania nad właściwościami elektrycznymi struktur grafenowych.

Wyniki jego prac były wyróżniane nagrodami Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej (FNP) w 1997 roku, Nagrodą Promocyjną Koncernu Siemens w 2000 roku, Nagrodą IV Wydziału Polskiej Akademii Nauk za najlepszą habilitację młodych naukowców w 2006 roku.

Ściśle współpracuje z firmą Global Foundries (GF, dawną firmą American Micro Devices (AMD)), z laboratoriami badawczymi IBM w Yorktown Heights w USA, Instytutem Fraunhofera Badań Nieniszczących w Dreźnie (Niemcy), Uniwersytetem Technologicznym w Ilmenau (Niemcy), Instytutem Technologii Elektronowej (ITE) w Warszawie i Instytutem Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk (PAN) we Wrocławiu. Tematyka wspólnych badań obejmuje szeroko rozumianą nanometrologię struktur elektronicznych i zastosowanie układów mikro- i nanosystemowych (MEMS i NEMS) w nowoczesnej diagnostyce biochemicznej.

Prof. Teodor Gotszalk uczestniczył w projektach realizowanych ze środków: i) Komitetu Badań Naukowych (KBN) i Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSzW) (jako kierownik 2 własnych i 3 promotorskich projektów badawczych oraz 1 projektu Współpracy z Niemcami, dodatkowo był głównym

wykonawcą 12 własnych projektów badawczych); ii) Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej (FNP) (jako kierownik 1 projektu), iii) 6 Programu Ramowego Badań i Rozwoju Unii Europejskiej (jako kierownik 2 zadań realizowanych przez Politechnikę Wrocławską) iv) Programu Operacyjnego Innowacyjnej Gospodarki (POIG) (jako kierownik 2 podprojektów). W 2012 roku jest kierownikiem projektu FNP TEAM FoMaMet, grantu NCN OPUS Emagtool i programu realizowanego ze środków 7 programu ramowego badań i rozwoju Unii Europejskiej STREP NANOHEAT.

Jest on autorem 238 prac, które cytowano 405 razy, indeks Hirscha (HI) jego publikacji wynosi 16.

Prof. Teodor Paweł Gotszalk był promotorem 4 obronionych rozpraw doktorskich, obecnie jest promotorem 5 otwartych przewodów doktorskich i opiekunem naukowym 3 doktorantów. Jest również opiekunem Stowarzyszenia Polskich Entuzjastów Nanotechnologii (SPENT), które jest Studenckim Stowarzyszeniem Naukowym działającym na Wydziale Elektroniki Mikrosystemów Politechniki Wrocławskiej.

Mgr inż. Konrad Nieradka urodził się w 1982 roku w Staszowie. W 2002 roku ukończył Technikum Elektroniczne w rodzinnym Połańcu. Rozpoczął studia na kierunku Elektronika i Telekomunikacja, specjalizacja Mikrosystemy, na Wydziale Elektroniki Mikrosystemów i Fotoniki Politechniki Wrocławskiej. W latach 2004-2006 studiował jako drugi kierunek Astronomię na Wydziale Fizyki i Astronomii Uniwersytetu Wrocławskiego. W trakcie studiów działał w studenckich kołach naukowych projektujących podsystemy telekomunikacyjne małych satelitów we współpracy z Europejską Agencją Kosmiczną oraz budujących mikroskopy bliskich oddziaływań i promujących nanotechnologię. W 2007 roku uzyskał tytuł magistra inżyniera na Politechnice Wrocławskiej, gdzie rozpoczął następnie studia doktoranckie. W latach 2006-2009 pracował w dziale zarządzania produktami sieci telekomunikacyjnych w firmie Siemens, a później Nokia Siemens Networks. Od 2009 do 2012 roku pracował na Politechnice Wrocławskiej, gdzie prowadził prace B-R nad czujnikami mikrodwigniowymi do detekcji endotoksyn bakteryjnych, w ramach projektu MNS-DIAG. Wyniki projektu stanowią podstawę jego rozprawy doktorskiej, której obronę zaplanowano na drugą połowę 2013 roku. Na początku 2013 roku podjął pracę na Uniwersytecie Technicznym w Ilmenau, w Niemczech, gdzie współtworzy zaawansowane systemy mikroskopii bliskich oddziaływań do zastosowań w przemyśle półprzewodnikowym.

#### Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN-IITD PAN Wrocław

IITD PAN Wrocław – prace prowadzone w projekcie obejmowały opracowanie i zastosowanie systemu detekcyjnego składającego się z oczyszczonych i scharakteryzowanych preparatów przeciwciał o specyficzności anty-endotoksynowej, opracowanie metodyki funkcjonalizacji powierzchni dźwigniowych, pokrytych SiO<sub>2</sub> i Au, ich aktywacji chemicznej i kowalencyjnego wiązania cząsteczek biologicznych, a także na znalezieniu wydajnych metod dezaktywacji powierzchni zapobiegających niespecyficznemu adsorpcji cząsteczek biologicznych do powierzchni.

Dr Jacek Rybka - ukończył studia na Uniwersytecie Wrocławskim na kierunku biotechnologia w 1994r. Rozprawę doktorską obronił w roku 2001. Aktualnie jest pracownikiem Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej i kierownikiem Pracowni Analizy Instrumentalnej i Preparatyki w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu. Jego zainteresowania naukowe obejmują badania strukturalne i immunochemiczne polisacharydów bakteryjnych oraz aplikacje mikro- i nanosystemów w badaniach biomedycznych. Główne osiągnięcia poznawcze i aplikacyjne: Nowe metody detekcji markerów chemicznych składników osłon bakteryjnych, mianowicie endotoksyn (kwas 2-keto-3-deoksyokulozonowy – Kdo, kwasy 3-hydroksylowe – 3-OH FA), mureiny (kwas muraminowy – MuAc), endotoksyn i otoczek bakteryjnych niektórych szczepów bakteryjnych (kwas sjałowy – NeuAc), glikolipidów (sfingozyna). Nowe techniki izolacji endotoksyn bakteryjnych z wykorzystaniem ekstrakcji ciekłym dwutlenkiem węgla. Zastosowania biologicznych układów detekcyjnych do wykrywania bakterii Gram-ujemnych w systemach czujnikowych.

Dr Katarzyna Kapczyńska – ukończyła studia na Uniwersytecie Wrocławskim na Wydziale Chemii w 2006 r., w roku 2010 na tym samym Wydziale uzyskała tytuł doktora. Od 2012 r. pracuje w IITD PAN, w Zakładzie immunologii Chorób Zakaźnych. Zainteresowania naukowe dr Kapczyńskiej obejmują badania dotyczące nieenzymatycznej glikacji białek, syntezy peptydów, wykorzystanie spektrometrii mas w proteomice a także metody tworzenia powierzchni bioaktywnych do wykorzystania w mikro- i nanosystemach do badań biomedycznych

mgr inż. Anna Pawlik-Jakubowska ukończyła studia na Uniwersytecie Przyrodniczym we Wrocławiu na kierunku biotechnologia w 2006 r. Aktualnie jest pracownikiem Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu. Jej zainteresowania naukowe obejmują wykorzystanie biochemiczne i immunochemiczne mikro- i nanosystemów w badaniach biomedycznych.

#### Wrocławski Uniwersytet Medyczny-WUM

Rola WUM w projekcie polegała na przeprowadzaniu testów aktywności cząsteczek receptorowych, w stanie wolnym i związanym do powierzchni, badaniu aktywności i powinowactwa cząsteczek specyficznych w stworzonym systemie detekcyjnym: specyficzne przeciwciało-endotoksyna, oraz na testach aktywności i specyficzności powierzchni modyfikowanych oraz funkcjonalizowanych dźwigni.

Prof. dr hab. Andrzej Gamian ukończył studia na Uniwersytecie Wrocławskim na Wydziale Nauk Przyrodniczych w 1974r. Rozprawę doktorską obronił w roku 1982, stopień doktora habilitowanego uzyskał w roku 1993, stopień profesora w roku 2003. Aktualnie jest Kierownikiem Katedry i Zakładu Biochemii

Lekarskiej, Wrocławskiego Uniwersytetu Medycznego oraz Kierownikiem Zakładu Immunologii Chorób Zakaźnych od 1994 i Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN. Jego zainteresowania naukowe obejmują analizę markerów endotoksynowych jako wykładników infekcyjnych procesów zapalnych w diagnostyce i jako czynników prognostycznych, badania strukturalne i serologiczne powierzchniowych antygenów bakteryjnych i fagowych oraz roli tych antygenów w rozwoju chorób i odpowiedzi immunologicznej, badania epidemiologiczne nokardioz i chorób promieniczopodobnych z wykorzystaniem glikolipidów diagnostycznych i metod instrumentalnych, procesy zaawansowanej glikacji i ich udział w mechanizmach odpornościowych. Najważniejsze osiągnięcia poznawcze to określenie struktury sześciu enterobakteryjnych polisacharydów O-swoistych posiadających kwas sjałowy, wykazanie obecności glicyny w endotoksynach szeregu szczepów bakterii, ustalenie struktury 40 polisacharydów O-swoistych bakterii z rodzaju *Hafnia* i *Citrobacter* i ich epitopów a także budowę wspólnego typu rdzeniowego endotoksyn dla rodzaju *Hafnia*, ustalenie struktury dwudziestu glikolipidów patogennych szczepów aktynobakterii oraz egzopolisacharydów kilku szczepów bakterii probiotycznych z rodzaju *Lactobacillus*, wykazanie, że przeciwciała ochronne o szerokiej aktywności przeciw bakteryjnej obecne w krwi pępowinowej rozpoznają epitop enterobakteryjnego białka OMP 38 kDa. Najważniejsze osiągnięcia aplikacyjne to opracowanie szczepionki przeciwko meningokokowemu zapaleniu opon mózgowych typu B, opracowanie dwóch metod selektywnego oznaczania glukozy i fruktozy w obecności innych cukrów, opracowanie metod otrzymywania przeciwciał anty-kwas sjałowy, preparacji białka fimbrialnego jako nośnika do szczepionek, chromatografii powinowactwa oligosacharydów rdzeniowych na kolumnie z serotoniną, otrzymywania rozpuszczalnej formy lipopolisacharydu, chromatografii powinowactwa labilnych glikolipidów, opracowanie szczepionki koniugatowej o szerokiej swoistości ochronnej przeciwbakteryjnej, opracowanie metody wysokociśnieniowej i ultradźwiękowej otrzymywania zaawansowanych produktów glikacji (AGE) oraz immunochemicznego testu diagnostycznego do oznaczania w surowicy i tkankach poziomu zaawansowanej glikacji u pacjentów z cukrzycą, opracowanie fluorescencyjnego elementu testowego do wykrywania i/lub określania stężenia endotoksyn w płynnych próbkach.

## 3.2. Prace realizowane w ramach projektu.

Prace prowadzone w podzadaniu skupiały się wokół następujących dziedzin:

- opracowania układów optomechanicznych i optoelektronicznych do detekcji ugięcia mikrobelek SubNano w układzie belek pojedynczych i macierzowych.
- opracowania układów elektronicznych przetwarzania sygnałów z dźwigni piezorezystywnych dla statycznego i dynamicznego trybu pomiarowego.
- opracowania układów elektronicznych do przetwarzania sygnałów z fotodetektorów ugięcia dźwigni SubNano. Obejmuje to również układy do normalizacji sygnałów ugięcia względem mocy lasera, zasilania laserów, zasilaczy systemowych, filtrów selektywnych.
- opracowania oprogramowania akwizycji i przetwarzania danych z matryc czujników SubNano z wykorzystaniem wielokanałowych kart przetworników analogowo-cyfrowych i cyfrowo-analogowych.
- wdrożenia wszechstronnych technik diagnostyki powierzchni funkcjonalizowanych czujników metodami mikroskopii bliskich oddziaływań.
- wykonania pomiarów testowych zachowań mechanicznych belek SubNano, co obejmowało metrologiczne wyznaczenie stałych sprężystości na podstawie obserwacji szumu termicznego, masy dodanej i pomiarów optycznych.
- przeprowadzenie pomiarów ugięcia mikrobelek w roztworach z różnymi analitami.

Projekt zakładał opracowanie przez IITD PAN docelowych układów detekcyjnych, składających się z oczyszczonych endotoksyn bakterii patogennych oraz czystych preparatów przeciwciał o specyficzności anty-endotoksynowej do ich wykrywania. Prace miały koncentrować się także na opracowaniu metodyki funkcjonalizacji powierzchni dźwigniowych, pokrytych SiO<sub>2</sub> i Au, ich aktywacji chemicznej i kowalencyjnego wiązania cząsteczek biologicznych, a także na znalezieniu wydajnych metod dezaktywacji powierzchni zapobiegających niespecyficznemu adsorbowaniu cząsteczek biologicznych do powierzchni.

WUM – prace prowadzone w projekcie obejmowały testowanie aktywności cząsteczek receptorowych, w stanie wolnym i związanym do powierzchni, badaniu aktywności i powinowactwa cząsteczek specyficznych w tworzonym systemie detekcyjnym: specyficzne przeciwciała-endotoksyna, oraz na testach aktywności i specyficzności powierzchni modyfikowanych oraz funkcjonalizowanych dźwigni.

Preparaty endotoksyn - hodowla wybranych szczepów bakterii Gram-ujemnych, izolacja i oczyszczanie endotoksyn i podstawowe analizy otrzymanych preparatów

Modelowe biologiczne systemy detekcyjne- opracowanie warunków oddziaływania biologicznego systemu modelowego do testowania parametrów czujnika oraz optymalizacja warunków oddziaływania układu (białko A oraz królicza immunoglobulina G, ConA i endotoksyna *H. alvei*)

Docelowe biologiczne systemy detekcyjne – Za pomocą technik immunochemicznych otrzymano oczyszczone preparaty przeciwciał poliklonalnych, skierowanych przeciwko epitopom endotoksynowym i ustalono warunki optymalnego oddziaływania z antygenem. Otrzymano preparaty przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko epitopom endotoksynowym i ustalono warunki optymalnego oddziaływania z antygenem. Otrzymano

biologicznie aktywne preparaty fragmentów wiążących przeciwciał, do funkcjonalizacji systemów czujnikowych.

Opracowanie technik analizy funkcjonalizacji powierzchni Au oraz SiO<sub>2</sub> – przetestowano techniki spektroskopii EDAX (energy dispersive X-ray spectrometry – dyspersyjna spektrometria rentgenowska), rozpraszania ramanowskiego, odbiciowej spektroskopii IR powierzchni, spektroskopii XPS (X-ray photoemission spectroscopy), chemicznej analizy zawartości grup aminowych na powierzchni (kolorymetria NH<sub>2</sub>), metody pośredniej analizy poprzez enzymatyczną analizę wydajności funkcjonalizacji powierzchni, metody analizy topografii powierzchni funkcjonalizowanych technikami AFM.

Opracowanie metod funkcjonalizacji powierzchni Au oraz SiO<sub>2</sub>. Powierzchnie złote: wprowadzanie grup aminowych poprzez mPEG-SH, cystaminę lub cysteaminę i dalsza funkcjonalizacja za pomocą glutaraldehydu, etanolaminy, mPEG-NHS, biotylna-NHS, DSC, sulfo-NHS-SA, funkcjonalizacja ME, UDT lub wprowadzanie grup karboksylowych poprzez MUA i dalsza aktywacja poprzez EDC/NHS, DCC/NHS, DIC/NHS i inne. Powierzchnie SiO<sub>2</sub>: wprowadzanie grup aminowych poprzez APTS i dalsza funkcjonalizacja za pomocą glutaraldehydu, etanolaminy, mPEG-NHS, biotylna-NHS, DSC, sulfo-NHS-SA, funkcjonalizacja GOPTS, IPTS lub nOTS i inne.

Funkcjonalizacja docelowych powierzchni macierzy białkowych i testowanie docelowych systemów pomiarowych. Opracowano techniki różnicowej funkcjonalizacji mieszanych powierzchni dźwigni złoto-tlenek krzemu oraz różnicowej funkcjonalizacji macierzy białkowych dla uzyskania belek pomiarowych i kontrolnych. Prowadzono funkcjonalizację macierzy białkowymi układami modelowymi, endotoksynami oraz przeciwciałami monoklonalnymi. Testowano aktywność i selektywność uzyskanych macierzy detekcyjnych pracujących w docelowym systemie demonstratorowym w reakcji ze składnikami układów modelowych oraz ze składnikami układu docelowego - endotoksynami bakterii Gram-ujemnych.

### 3.3. Główne zakupy urządzeń, wyposażenia i materiałów.

WEMiF PWr ZMMiN zakupy wyposażenia: skanery piezoelektryczne do sterowania przesuwem w zakresie 400x400 mikrometrów z rozdzielczością ok. 10 nm oraz skaner piezoelektryczny do sterowania wychyleniem w jednej osi w zakresie 10 mikrometrów z rozdzielczością ok. 2 nm.

Materiały: materiały mikroelektroniczne (układy scalone, elementy RLC, elementy elektrotechniczne (kable, złącza, przełączniki), obudowy mechaniczne, układy optomechaniczne (śruby mikromechaniczne, pojedyncze przesuwki), materiały optoelektroniczne (lasery i diody półprzewodnikowe, detektory, lasery z wyjściem półprzewodnikowym, osprzęt światłowodowy), materiały biurowe i podstawowe odczynniki.

kondensatory

W szczególności zakupy te obejmowały:

-rezystory, kondensatory

-mikroaktuator silnikowy

-pozycjoner piezoelektryczny- zespół piezoelektryczny do pozycjonowania matryc MNSDiAG w układzie optycznym

-piezoaktuator do zastosowania w kalibracji dźwigni MNSDiAG.

IITD PAN Wrocław, dokonał zakupów odczynników chemicznych koniecznych do przeprowadzenia funkcjonalizacji powierzchni czujników mikromechanicznych. W zakresie środków trwałych zakupy te obejmowały:

-laptop Notebook Toshiba Portege

-laptop Notebook Toshiba z oprogramowaniem.

WUM zakupił w czasie realizacji projektu materiały i odczynniki chemiczne konieczne do opracowania procedury funkcjonalizacji czujników, nie dokonano zakupów środków trwałych.