مروری بر روش‌های تخلیص دی‌ان‌ای: سامانه‌های میکروفلوئیدیک

فرشاد راجی[۱]، احمد رهبر کلیشمی[۲*]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی شیمی، دانشگاه علم و صنعت ایران

۲- دانشیار مهندسی شیمی، دانشگاه علم و صنعت ایران

پیام نگار: ahmadrahbar@iust.ac.ir

چکیده

استخراج زیست‌مولکول‌ها و بررسی‌های ژنتیکی آن در زمینهٔ پزشکی و پزشکی قانونی اهمیت بسیار زیادی دارد؛ اما با این حال محدودیت‌های آن از قبیل حساسیت، ماهیت کار، هزینهٔ بالا، نیاز به تکنسین‌های بسیار ماهر و نیاز به خودکارسازی و قابلیت حمل سامانه، ازنظر تشخیص با فناوری‌های موجود، رفع نشده است. نیاز به ادغام روش‌های آماده‌سازی و تشخیص نمونه وجود دارد؛ برای رفع این محدودیت‌ها، بیشتر مطالعات بر بهبود فناوری‌های تشخیص تمرکز کرده‌اند که پیشرفت‌های چشمگیری حاصل شده است؛ یکی از این فناوری‌ها، میکروفلوئیدیک است. ویژگی‌های قانع‌کننده‌ای، مانند خودکارسازی در تهیهٔ نمونه و قابلیت کار در حجم کمی از نمونه، همچنین به حداقل رساندن مصرف، هزینه و زمان پردازش حلال‌ها از برتری‌های این فناوری در استخراج دی‌ان‌ای و پروتئین است. عملکرد میکروکانال‌ها در استخراج به سطح ویژهٔ در دسترس انتقال جرم بستگی دارد که خود نیز به الگوی جریان تولید شده در اتصالات ورودی میکروکانال‌ها وابسته است. رایج‌ترین الگوها، موازی، لخته‌ای و قطره‌ای است که به مؤلفه‌های عملیاتی مانند سرعت جریان، خواص فیزیکی، هندسهٔ میکروکانال و مواد سازندهٔ آن وابسته‌اند. یک الگوی جریان علاوه بر این‌که باید سطح ویژهٔ زیادی را فراهم کند در عین حال باید به‌گونه‌ای باشد که فازها پس از استخراج به‌سرعت از یکدیگر جدا شوند. مهم‌ترین هدف این مقاله بررسی روش‌های مرسوم در سامانه‌های ناپیوسته‌ای است که قابلیت پیاده‌سازی در میکروفلوئیدیک را داشته‌اند.نتیجهٔ بررسی این شد که سه روش استخراج بر پایهٔ سیلیکا، اتصال الکترواستاتیک و کروماتوگرافی تمایل ژل سازگاری بسیار بالایی با این سامانه‌ها دارند.

تاریخ دریافت: ۹۹/۰۵/۱۱

تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۷/۰۳

شماره صفحات: ۵۵ تا ۸۰

کلیدواژه‌ها: میکروفلوئیدیک، زیست‌مولکول، دی‌ان‌ای، پروتئین

۱. مقدمه

میکروفلوئیدیک[1] علم و فناوری سامانه هایی است که در آن‌ها مقادیر ناچیزی از سیالات با استفاده از کانال‌هایی با ابعاد ده تا صد میکرومتر پردازش می‌شوند. تاریخچهٔ میکروفلوئیدیک به دههٔ پنجاه میلادی باز می‌گردد؛ هنگامی‌که از میکروفلوئیدیک در تولید جوهر چاپگر جوهرافشان استفاده شد. ساخت و کار این چاپگرها بر اساس میکروفلوئیدیک بود که در آن تیوب‌های ریزی، جوهر را برای عمل چاپ حمل می‌کردند. پس از آن در دههٔ هفتاد میلادی، نخستین بار

* تهران، دانشگاه علم و صنعت ایران، دانشکدهٔ مهندسی شیمی

1. Microfluidics

از میکروفلوئیدیک در تجزیه و تحلیل استفاده شد. یک کروماتوگرافی گازی کوچک‌شده[1] روی یک ویفر سیلیکونی ساخته شد. در انتهای دهۀ هشتاد میلادی نخستین میکروشیرها و میکروپمپ‌ها براساس میکروماشین کاری کردن سیلیکون ساخته؛ سپس در همین دهه چندین سامانۀ تجزیۀ سیلیکونی ارائه شد. استفاده از مقدار ناچیزی از نمونه‌ها و شناساگرها و جداسازی و شناسایی با وضوح و حساسیت بالا، هزینۀ کم، زمان کوتاه برای تجزیه و تحلیل و اثر اندک بر روی دستگاه‌های تجزیه و تحلیل باعث استفادۀ چشمگیر از میکروفلوئیدیک در تجزیه و تحلیل شد[۱].

در دو دهۀ گذشته محققان مطالعات بسیاری بر روی توسعۀ اجزای میکروفلوئیدیکی جدید برای انتقال سیال، اختلاط سیال، کنترل جریان سیال یا غلظت و جداسازی مولکول‌ها در حجم‌های خیلی کوچک سیالات انجام داده‌اند؛ امروزه انواع مختلفی از میکروپمپ‌ها، میکروهمزن‌ها و میکروشیرها در کاربردهای میکروفلوئیدیکی ارائه شده‌اند[۱].

نوکلئوتیدها واحدهای سازندۀ نوکلئیک اسیدها مثل آران‌ای و دی‌ان‌ای هستند؛ نوکلئوتیدها شامل سه بخش باز نیتروژن‌دار، قند پنج‌کربنه و گروه فسفات هستند که بازهای نیتروژن‌دار متداول در نوکلئوتیدها آدنین، سیتوزین، گوانین، تیمین و یوراسیل هستند.

نوکلئیک اسیدها پلی‌آنیون‌های خطی و جهت‌دار هستند و در حوزه‌های مختلفی مثل زیست-تصویربرداری، تشخیص، حسگری و انتقال دارو کاربرد دارند. تمایل دی‌ان‌ای تک‌رشته‌ای[2] به ویژه‌گزینی و رشتۀ مکمل است و دی‌ان‌ای دو رشته‌ای[3] می‌تواند به‌طوری طراحی شود که درون ساختارهای سه بعدی توپولوژیکی گوناگون قرار گیرد. به‌علاوه در بسیاری از این کاربردها، آران‌ای و دی‌ان‌ای[4] نه تنها اطلاعاتی را رمزگذاری می‌کنند، بلکه به‌عنوان مواد سازندۀ نانومقیاس، برای دستکاری ساختار و عملکردشان در سطح نوکلوئوتیدی قابلیت دارند، که به‌وسیلۀ نوکلئوتیدهای غیرطبیعی گوناگون و آنزیم‌های اصلاح‌کنندۀ نوکلئیک اسیدی امکان‌پذیر شده است. دی‌ان‌ای- در مقایسه با آران‌ای- در برابر شرایط مختلف از نظر ساختاری مستحکم‌تر و از نظر شیمیایی پایدارتر است؛ همچنین دی‌ان‌ای می‌تواند به روش‌های شیمیایی و آنزیمی همنهشت شود و خصوصیات فیزیکی و شیمیایی ویژه‌ای از خود نشان دهد که در کاربردهای مختلف مفید واقع شود[۲].

نخستین مطالعات در مورد استخراج مولکول‌های زیستی، به اواخر دهۀپنجاه و اوایل دهۀ شصت مربوط است. آنگاه که آلبرتسون[5] به قابلیت بالای این شیوه برای ارزیابی اولیۀ ترکیبات زیستی اشاره کرد. در جداسازی نوکلئیک‌اسیدها از منابع زیستی، باید از رهایش نوکلئازها و دیگر آنزیم‌ها جلوگیری شود. عوامل ساختارشکن[6] مانند گوآنیدین ایزوتیوسیانات و شوینده‌هایی مانند سدیم دودسیل سولفات ساختار پروتئین را تخریب و از فعالیت آنزیم‌ها پیش‌گیری می‌کنند. در این مطالعه روش‌های مرسوم را در استخراج DNA و امکان‌یابی استفاده از روش‌های مذکور در سامانه‌های میکروفلوئیدیک بررسی کرده‌ایم[۲].

۲. جداسازی دی‌ان‌ای

دی‌ان‌ای یک عامل حمل کنندۀ محتوای اطلاعات ژنتیکی- تقریباً در همۀ موجودات زنده است. دی‌ان‌ای را جیمز واتسون[7] و فرانسیس کریک[8] در سال ۱۹۵۳ مشخص و کل ساختار آن را آشکار کردند. اکتشاف اساسی آن ها نشانگر یک شروع پرتحرک در مورد این مولکول ارثی است که درگذشته پروتئین تصور می‌شد. تاریخچۀ دی‌ان ای در واقع به سال ۱۸۶۹ میلادی برمی‌گردد که فردریش میشر[9]، دانشمند اهل سوئیس، آن را را به‌عنوان ماده‌ای لزج از هستۀ سلول جدا کرد. امروزه، استخراج دی‌ان‌ای به یک روش اساسی در زیست‌شناسی مولکولی تبدیل‌شده است؛کیت‌های تجاری و روش‌های گوناگونی برای استخراج دی‌ان‌ای وجود دارد که با استفاده از مواد شیمیایی و مشابه روش‌های میشر تولیدشده است. از آنجایی که می‌توان دی‌ان‌ای را از انواع مختلف نمونه‌های زیست‌شناختی مانند خون، حیوان، گیاه، باکتری و قارچ استخراج کرد[۲]، روش استخراج دی‌ان‌ای را می‌توان بر اساس نوع نمونه و غلظت نهایی دی‌ان‌ای مورد نیاز تعیین کرد. این روش‌ها می‌تواند شامل استفادۀ پیشرفته از پشتیبان‌ها و کیت‌ها باشد، که به‌طور اختصاصی برای نمونه‌های مربوط تهیه می‌شوند تا حداکثر عملکرد و دی‌ان‌ای خالص را به دست آورند. از زمان جداسازی نخستین اسیدهای نوکلئیک

1. Miniaturized
2. ssDNA
3. dsDNA

۴. دئوکسی ریبونوکلئیک اسید

5. Albertson
6. Chaotropic Agents
7. Watson
8. Crick
9. Friedrich Miescher

به‌وسیلهٔفردریش میشر در سال ۱۸۶۹، تا کشف دی‌ان‌ای به‌عنوان مادهٔ ارثی در سال ۱۹۴۴ پس از اوج تحقیقات وسیع اُسوالد[۴و۳]، سپس به‌دست‌آوردن ساختار دی‌ان‌ای رمزگشایی‌شده به‌وسیلهٔ واتسون و کریکو تلاش به‌سوی اختراع روش‌های پیشرفتهٔ زیست‌شناختی مولکولی و تجهیزات موجود امروز، روند استخراج دی‌ان‌ای به‌طور قابل‌توجهی جریان یافته است.

خالص‌سازی و پیش‌تغلیظ نوکلئیک اسیدها، به‌ویژه دی‌ان‌ای، نیاز بیشتر برنامه‌های کاربردی تجزیه و تحلیل ژنتیکی و یک مرحلهٔ آماده‌سازی نمونهٔ بسیار مهم در تجزیه‌های بالینی و پزشکی قانونی است. در آزمایشگاه‌های پزشکی قانونی، بازده استخراج بالا برای تجزیه و تحلیل نمونه‌های با تعداد کم‌نسخه و نمونه‌های دی‌ان‌ای بسیار تخریب شده، مهم است؛ زیرا موفقیت تحلیلی ذاتاً وابسته به تودهٔ نوکلئیک اسیدهای بازیابی شده است. علاوه بر این، حجم شست‌وشوی کم (که اساساً نوکلئیک اسید تغلیظ شده هستند) برای تجزیه و تحلیل پایین دست مؤثرتر و نتایج باکیفیت بالاتر مهم هستند؛ با این‌وجود، در بسیاری از زمینه‌های علمی به‌ویژه در زمینه‌های پزشکی و پزشکی قانونی نیاز به یک روش یکپارچهٔ حساس، نیرومند و قابل‌اعتماد برای استخراج دی‌ان‌ای وجود دارد که سریع و مقرون به‌صرفه باشد. برای غلبه بر مسائلی با روش‌های شیمیایی مرسوم، استخراج مایع- مایع و همچنین فناوری استخراج فاز جامد، بر روی سامانهٔ مبتنی بر میکروفلوئیدها برای استخراج دی‌ان‌ای روی تراشه، به‌طور گسترده‌ای بحث شده است و جایگزین مناسبی خواهد بود. این امر شامل استفاده از مواد زیست‌شناختی مناسبی برای ساخت دستگاه های میکرو با کمک میکروفلوئیدیک، ادغام فناوری استخراج فاز جامد (پلی‌دی‌متیل‌سیلوکسان[1]) برای استخراج سریع اما پیچیدهٔ دی‌ان ای و همچنین اجرای سامانه بر روی تراشه است، که فناوری میکروفلوئیدیک را با یک حسگر خودکارکارامد تشخیص دی‌ان‌ای، تلفیق می‌کند[۵].

۳. بررسی جداسازی و تخلیص دی‌ان‌ای

ما به بررسی ارزش‌های اساسی روش‌های شیمیایی معمولی استخراج دی‌ان‌ای، با استفاده از استخراج مایع/ مایع (LLE[2]) و به دنبال آن توسعهٔ استخراج فاز جامد (SPE[3])، همچنین پیشرفت‌های اخیر در مورد کوچک‌سازی استخراج آزمایشگاهی آزمایش‌شده در دستگاه‌های میکروفلوئیدی به سامانهٔ بیوحسگر آزمایشگاهی بر روی تراشه (LOC[4]) می‌پردازیم.

۴. روش‌های مرسوم مبتنی بر استخراج مایع/ مایع

استخراج مایع/ مایع یک روش شیمیایی است که به‌طور سنتی برای استخراج و جداسازی ترکیبات جداگانه بر پایهٔ حلالیت بین دو مایع مخلوط‌کننده که در آن استخراج ترکیب از یک مایع به فاز مایع دیگر با استفاده از انواع دستگاه‌ها و تجهیزات انجام می‌شود، به کار می‌رود. در استخراج دی‌ان‌ای، استخراج مایع/ مایع مبتنی بر دست‌کاری pH محلول برای استخراج دی‌ان‌ای در یک حلال آلی است؛ ازنظر فنی به همین دلیل به عنوان استخراج حلالی هم شناخته می‌شود. این روش در انواع نمونه‌های زیست‌شناختی ازجمله خون، ادرار، خاک و بافت های گیاهی استخراج شده در یک طرح تحلیلی استفاده می‌شود. دانستن خصوصیات شیمیایی نمونهٔ زیست‌شناختی، امکان انتخاب صحیح از حلال‌های آلی را فراهم می‌آورد که عامل اصلی جداسازی موفقیت‌آمیز و تصفیهٔ دی‌ان‌ای است[۶]. معیارهای اساسی هر جداسازی دی‌ان‌ای موفقیت‌آمیز همان‌طور که در شکل (۱) مشاهده می‌شود چنین است:

۱. لیز[5] سلولی یا با روش‌های فیزیکی یا شیمیایی مانند سانتریفیوژ، فراصوت و عملیات گرمایش.

۲. حذف مجتمع نوکلئوپروتئین و سایر آلاینده‌ها مانند لیپیدهای غشایی و اسیدهای نوکلئیک و به‌دنبال آن استخراج دی‌ان‌ای.

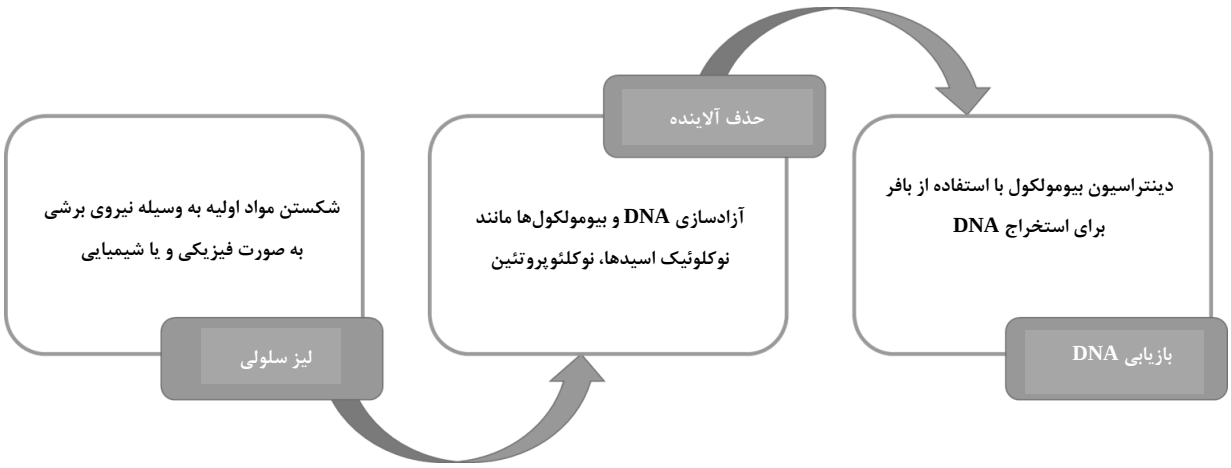
۳. بازیابی دی‌ان‌ای با استفاده از اتانول یا ایزوپروپانول یا ترکیبی از هر دو

دی‌ان‌ای استخراج‌شده با استفاده از جذب ماوراء بنفش می‌تواند برای خلوص ارزیابی شود که در آن نسبت جذب در ۲۶۰ نانومتر و میزان جذب ۲۸۰ نانومتر از یک نمونهٔ خالص دی‌ان‌ای است. لازم به ذکر است که حتی کوچک‌ترین تغییر روش استخراج، روش استخراج سامانهٔ اتیک ارزیابی‌شده برای نمونه‌های خاص، می‌تواند منجر به بازده‌های متفاوت و خلوص دی‌ان‌ای شود؛ همان‌طور که در آثار مختلف نشان داده شده است[۷].

1. PDMS
2. Liquid-Liquid Extraction
3. Solid Phase Extraction

4. Lab On Chip

۵. لیز، تخریب یک یاخته به‌دلیل ازمیان‌رفتن غشای بیرونی آن است؛ لیز ممکن است به‌وسیلهٔ سازوکارهای ویروسی، آنزیمی یا اسمزی باشد. سیالی که دارای سلول‌های لیز شده باشد را لیزات می‌نامند.



شکل ۱. مراحل مربوط به استخراج اولیه. دی‌ان‌ای سه فرایند عمده با جعبه‌های آبی نشان داده شده است[۷].

۴-۱ روش سالتینگ آوت[1]

روش سالتینگ‌آوت یک روش معمول است؛ که شامل عملیاتی با نمک یونی ضعیف است که پس از لیز سلولی استفاده و در آن آلودگی‌هایی مانند پروتئین و سایر مولکول‌های زیستی با استفاده از غلظت‌های زیاد استات‌پتاسیم یا آمونیوم‌استات حذف می‌شود. غلظت بالای این نمک‌ها باعث رسوب آلاینده‌ها می‌شود که می‌توان پس از سانتریفیوژ آن‌ها را از بین برد. با وجود سادگی و روش‌های ارزان‌قیمت استخراج دی‌ان‌ای همچون پاک‌نکردن نمونه‌برداری برای نمونه‌های زیست‌شناختی و همچنین غنی‌سازی آنالیت، این روش حاوی معرف‌های مضر برای خوردگی به تجهیزات است و ناکارآمدی در جداسازی دی‌ان‌ای از آلاینده‌ها و در نتیجه عملکرد و خلوص دی‌ان‌ای کم را در پی دارد. دی‌ان‌ای‌های استخراج‌شده اغلب پیش از اینکه برای آزمایش‌های مولکولی مناسب باشد، نیاز به تصفیهٔ بیشتری دارند. در بیشتر موارد ته‌نشینی مکرر الکل نیز لازم است تا جداسازی بهتری از دی‌ان‌ای حاصل شود؛ در این صورت نتایج متنوعی را ایجاد کند[۸].

۴-۲ استخراج قلیایی

روش استخراج قلیایی برای نخستین‌بار در سال ۱۹۷۹ توسعه یافت و یکی از قدیمی‌ترین و ساده‌ترین روش‌های جداسازی دی‌ان‌ای است. در این روش ابتدا سلول‌ها در محلول قلیایی (هیدروکسید سدیم) با مواد شویندهٔ سدیم دودسیل سولفات (SDS) پس از آویزش مجدد لیزات سلول در محلول بافر لیز می‌شوند. این مرحله سلول‌ها را به هم می‌ریزد و پروتئین‌ها را مختل می‌کند و دی‌ان‌ای به یک‌رشته تبدیل می‌شود. پس از انجام مرحلهٔ خنثی‌سازی با استات پتاسیم در pH=۵، دی‌ان‌ای پلاسمید دو رشته، اصلاح خواهد شد که منجر به تشکیل رسوب با SDS و پروتئین‌های تغییر ماهیت داده، می‌شود. کار اصلی این روش با تغییر ماهیت انتخابی قلیایی دی‌ان ای کروموزومی با وزن مولکولی بالا است تا اجازه دهد دی‌ان ای مدور کووالانسی بسته، به صورت دو رشته باقی بماند. این روش استخراج دی‌ان‌ای نسبت به روش‌های ذکر شدهٔ پیشین، سالم‌تر و ارزان‌تر است. با این‌حال، تغییر ماهیت دی‌ان‌ای که به‌طور انتخابی در محلول قلیایی روی می‌دهد می‌تواند منجر به تجزیهٔ دی‌ان‌ای شود که به نوبهٔ خود منجر به بازده بسیار کم می‌شود. همچنین گزارش‌هایی در مورد سلول‌های مقاوم در برابر لیز قلیایی وجود دارد که باعث کاهش حساسیت در تشخیص دی‌ان‌ای تا چندین برابر می‌شود[۹].

۴-۳ استخراج با CTAB

CTAB[2] یک سورفکتانت کاتیونی است که در برابر باکتری‌ها و قارچ ها مؤثر است؛ در استخراج دی‌ان ای، CTAB با بافر استخراج، برای از بین بردن لیپیدهای غشایی و ترویج لیز سلولی حتی برای بافت‌هایی که سرشار از چندقندی‌هاهستند یا آلودگی بیش از حد با متابولیت‌های ثانویه- مانند قارچ‌ها، گیاهان، باکتری‌های گِرَم منفی و

1. Salting Out

2. Cetyltrimethyl ammonium bromide

گونه‌های کیتین مانند دافنیا مگنا استراوس[1]- ترکیب شده است؛ روش استخراج CTAB مانند دیگر روش‌های معمول است که در ابتدا بافت نمونه برای پردازش مواد دیوارهٔ سلولی تجزیه می‌شود و اجازهٔ دسترسی به اسید نوکلئیک را می‌دهد [۱۰]. در روش استخراج CTAB، بافت نمونه معمولاً پس از انجماد آن با نیتروژن مایع خرد می‌شود و سپس در بافر CTAB از نو معلق می‌شود. استفاده از روش CTAB برای استخراج دی‌ان‌ای در مقایسه با سایر روش‌های متداول، رخ‌نماهای خوبی را از دی‌ان‌ایبا نتایجی سریع‌تر در پی داشته است. CTAB با وجود نشان‌دادن رخ‌نماهای دی‌ان‌ای خوب، اما هنوز هم یک عامل مضر است و پروتکل وقت‌گیری را انجام می‌دهد. افزون بر این ناخالصی‌های دی‌ان‌ای را کم می‌کند و مانند فنل، عملکرد دی‌ان‌ای را نیز پایین می‌آورد.

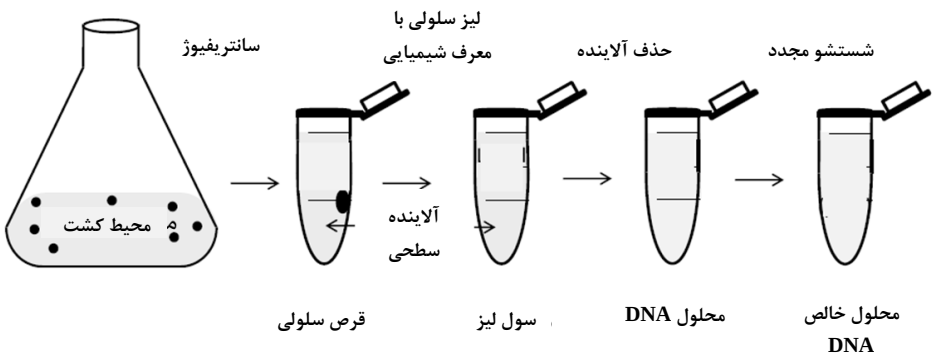
۴-۴ استخراج با فنل- کلروفرم- ایزوآمیل‌الکل

فنل- کلروفرم- ایزوآمیل الکل یک روش استخراج آلی است که امروزه در بسیاری از آزمایشگاه ها در جداسازی اسید نوکلئیک استفاده می‌شود. این روش در استخراج مقادیر زیادی دی‌ان ای ژنومیک با وزن مولکولی بالا مؤثر است. در این روش ابتدا سلول ها برای ایجاد لیزات مختل می‌شوند و به‌دنبال آن غیرفعال‌سازی هسته‌های سلولی انجام می‌شود. مخلوطی از حلال‌های آلی، فنل، کلروفرم و ایزوآمیل الکل برای دفع ماکرو مولکول‌هایی مانند پروتئین‌ها، لیپیدها، کربوهیدرات‌ها و بقایای سلولی از لیزات استفاده می‌شوند. استفاده از این روش متداول است و می‌توان از آن برای جداسازی دی‌ان‌ای از طیف گسترده‌ای از نمونه‌ها استفاده کرد. هر دو عملیات قلیایی و همچنین استفاده از فنل کلروفرم- ایزو آمیل الکل غشای سلولی را از بین می‌برد و به لیز سلول کمک می‌کند. حتی در صورت فقدان ایزو آمیل الکل، مخلوط آلی کلروفرم فنل به‌تنهایی می‌تواند در تصفیهٔ دی‌ان‌ای کمک کند، که این مورد در بسیاری از آزمایش‌های مربوط به تصفیهٔ دی‌ان‌ای از محلول حاوی پروتئین است و لایهٔ آبی دی‌ان‌ای حل‌شده را- درحالی‌که چیزهای دیگر در لایهٔ غیرآبی ته‌نشین می‌شود- با خود حمل می‌کند. با این حال، در مقایسه با روش‌های اخیر، این روش وقت‌گیر و پرکار است؛ علاوه بر آن، سمیت و سرطان‌زایی فنل و کلروفرم نیز موضوع بسیاری از مقالات علمی بوده است[۱۱].

۴-۵ گرادیان سانتریفیوژ سزیم کلرید (CsCl)

گرادیان سانتریفیوژ سزیم کلرید (CsCl) یک روش فیزیکی جداسازی دی‌ان‌ای بر اساس چگالی است که از دههٔ پنجاه میلادی استفاده می‌شود. گرادیان هنگامی اتفاق می‌افتد که دی‌ان‌ای که با ترکیب رنگ‌کنندهٔ اتیدیوم‌بروماید یا بیس‌بنزآمید مخلوط شده است، با محلول CsCl تحت نیروی گریز از مرکز بالا مخلوط می‌شود و این باعث جداسازی در مولکول‌های سزیم کلرید می‌شود؛ سپس اتم‌های سنگین Cs^+ به‌سمت بالا و انتهای لوله و به دور از مرکز حرکت می‌کنند، بنابراین، یک گرادیان چگالی خطی تشکیل می‌دهند که با توجه به تفاوت در شکل‌های دی‌ان‌ای، تفاوت چگالی در گرادیان کافی است تا انواع مختلف دی‌ان‌ای را از مخلوط با شارندگی، به‌عنوان باندهای چندگانه و جداگانه مجزا کند. بیشتر پروتکل‌ها برای استخراج دی‌ان‌ای از لیز سلولی تشکیل‌شده‌اند و پس از آن تلقیح با یک پروتئاز غیراختصاصی، مجموعه‌ای از بازیابی و رسوب نهایی دی‌ان‌ای تشکیل‌شده است. این روش‌ها منجر به حذف مانده‌های پروتئین می‌شوند؛ اما اغلب در حذف آلاینده‌های دیگر مثل اگزو پلی‌ساکاریدها مؤثر نیستند، که می‌تواند با فعالیت آنزیم‌ها (محدودیت اندونوکلئازها و لیگازها) تداخل پیدا کند؛ چون در این روش جداسازی دی‌ان‌ای مستقیم از طریق شارندگی، ماکرو مولکول‌های دیگر تخریب نشده است و به‌جای آن، دی‌ان‌ای ترکیبی، استخراج‌شده و از طریق ته‌نشینی الکل تصفیه‌شده است. در مقایسه با روش‌های دیگر که ذکر شد، گرادیان چگالی سزیم کلرید، همچنین کروماتوگرافی ستونی، روش فیزیکی دیگر جداسازی، بسیار مهم و مناسب‌تر برای تصفیهٔ دی‌ان‌ای است که از قبل از سلول ها استخراج شده بود. از کاستی‌های این روش این است که اگرچه دی‌ان ای در محلول بافر سزیم کلرید در دمای اتاق پایدار است، روش گرادیان سانتریفیوژ سزیم کلرید به خودی خود یک پروتکل تصفیهٔ پیچیده است که وقت‌گیر و گران است؛ استفاده از آن برای همهٔ ریزاندام‌ها عملی نیست؛ زیرا همهٔ باکتری‌ها به‌سرعت رشد نمی‌کنند. فاصلهٔ جدایش بین دی‌ان ای نیز اغلب پایین است، که جمع‌آوری بخش‌های مجزا را دشوار می‌کند. بنابراین، برای تهیهٔ یک مقیاس بزرگ از دی‌ان‌ای مناسب‌تر است[۱۲]. شکل (۲) یک تصویر کلی از نحوهٔ کار استخراج مایع/ مایع معمولی را نشان می‌دهد.

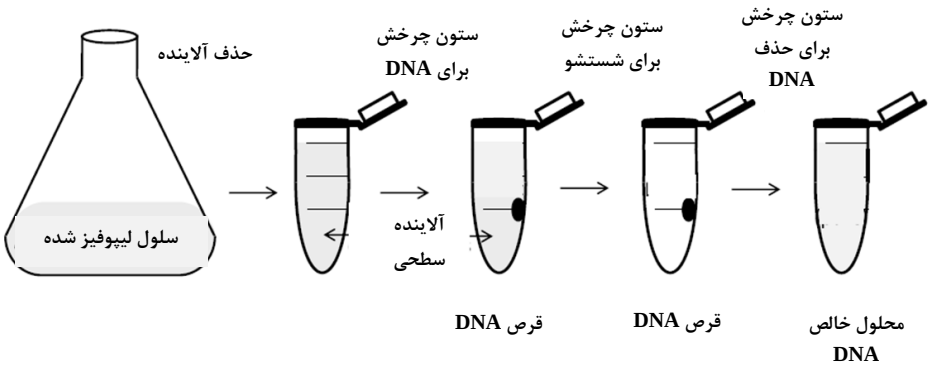
1. Daphnia Magna Straus



شکل ۲. استخراج مایع/ مایع شیمیایی متداول. تمام مراحل درج‌شده نمایش داده می‌شوند[۷].

۵. توسعه و روند فناوری استخراج فاز جامد (SPE)

ضعف استخراج مایع- مایع این است که حجم نسبتاً زیادی از حلال‌های آلی با خلوص بالا، با الزامات دفع گران مورد نیاز است که مشکلات دفع را نیز به‌همراه دارد. البته استخراج مایع-مایع به تحلیل‌گران آموزش‌دیده نیاز دارد. با توجه به این پیچیدگی‌ها، فناوری‌های استخراج فاز جامد (SPE) برای ارائهٔ روش‌های جایگزین استخراج دی‌ان‌ای ایجاد شده‌اند. در مقایسه با نسل قبلی خود، فناوری استخراج مایع- مایع، که مبتنی بر تغییر pH محلول برای استخراج دی‌ان‌ای در یک حلال آلی از راه انواع دستگاه‌ها و تجهیزات است، فناوری SPE از میل ترکیبی و همچنین خصوصیات شیمیایی و فیزیکی املاح حل‌شده یا معلق در مایع (که به‌عنوان فاز متحرک شناخته می‌شود) برای جدا کردن دی‌ان‌ای از اجزای ناخواستهٔ موجود در مخلوط هنگامی‌که از جاذب عبور می‌کند (همچنین به‌عنوان مرحلهٔ ثابت شناخته می‌شود) استفاده می‌کند؛ همان‌طور که در شکل (۳) مشاهده می‌شود[۷]. فناوری SPE برای نخستین بار در اوایل دههٔ هشتاد میلادی با استفاده از جاذب‌های پیونددهندهٔ سیلیکا برای پردازش نمونه استفاده و به‌سرعت بسیار رایج شد؛ زیرا یک روش سریع و کارامد برای جداسازی و تصفیهٔ دی‌ان‌ای در مقایسه با فناوری استخراج مایع-مایع است و امروزه در بسیاری از روش‌های آماده‌سازی نمونه برای استخراج دی‌ان‌ای به‌دلیل تنوع مواد مختلف، به‌عنوان جاذب به کار گرفته می‌شود. درنتیجه، جاذب‌ها در تعیین جداسازی کارامد دی‌ان‌ای مهم‌اند ؛ بنابراین، انواع مختلفی از مواد جاذب برای بهبود انتخاب‌پذیری و یا ویژگی نسبت به دی‌ان‌ای هدف، ظرفیت جاذب بالاتر و افزایش پایداری فیزیکی- مکانیکی برای اطمینان از عملکرد بالای دی‌ان‌ای با کمترین ضرر، ضروری هستند[۱۳]. امروزه فناوری SPE با کیت‌های استخراج دی‌ان‌ای، در بازار موجود است.



شکل ۳. استخراج فاز جامد، تمام مراحل درج‌شده نمایش داده می‌شوند[۷].

۵-۱ استخراج بر پایهٔ سیلیکا

استخراج بر پایهٔ سیلیکا رایج‌ترین روش مورد استفاده در فناوری SPE برای استخراج دی‌ان ای به‌دنبال لیز سلولی است؛ در این روش، سیلیکا که به عنوان جاذب عمل می‌کند، سطح آن را با مولکول‌های دی‌ان‌ای متصل می‌کند تا دی‌ان‌ای را از سایر ماکرومولکول‌های موجود در محلول در حضور نمک‌های ساختارشکن مانند نمک گوآنیدینیوم یا سدیم یدید با استحکام یونی بالا و تحت شرایط مشخص pH جدا کند. در غلظت بالای نمک و شرایط pH پایین، ساختارشکن ها ماهیت زیست‌مولکول ها را تغییر و به مولکول های دارای بار مثبت اجازهٔ تشکیل یک پل نمک- بین سیلیکای دارای بار مثبت و بدنهٔ دی‌ان ای دارای بار منفی- می‌دهد. در یک شرایط مطلوب، ماکرومولکول هایی که در محلول آزاد باقی مانده‌اند می‌توانند از راه سانتریفیوژها و مراحل بعدی شست‌وشوی بر پایهٔ الکل، دور ریخته شوند؛ درحالی‌که دی‌ان‌ای به‌شدت به ماتریس‌های سیلیکا پیوند می‌یابد. دی‌ان‌ای بعداً با جداکردن پیوند، با استفاده از بافر نمک ضعیف در شرایط pH بالا، از ماتریس سیلیکا استخراج می‌شود و دی‌ان‌ای جداشده برای تجزیه و تحلیل‌های تجربی بعدی، جمع‌آوری می‌شود. استخراج بر پایهٔ سیلیکا یک روش ساده و سریع برای جداسازی دی‌ان ای فراهم کرده و مقالات نیز نتیجهٔ مطلوبی را گزارش کرده اند؛ با این حال، این روش برای برخی کاربردها، به ویژه کاربردهای پایین دست مناسب نیست، زیرا می‌تواند منبع بالقوهٔ آلودگی اندوتوکسین باشد. با این وجود، ترکیب سیلیکا بر روی پشتیبان ها می‌تواند با جذب اسید نوکلئیک‌ها به غشای ژل سیلیکا این مشکلات را به حداقل برساند و آلاینده‌ها از بین می‌روند. محدودیت دیگر این روش این است که سیلیکا به‌عنوان جاذب در شرایط pH بالا ناپایدار است ($8 < pH > 2$). آن‌ها همچنین حاوی غلظت کمی از گروه‌های سیلان یونیزه شده هستند که می‌توانند املاح پایه را با ساز و کار تبادل یونی حفظ کنند[۷].

۵-۲ استخراج با تبادل آنیون

بر خلاف استخراج بر پایهٔ سیلیکا، فناوری تبادل آنیون مناسب برای استخراج دی‌ان‌ای با وزن مولکولی زیاد است و معمولاً برای کاربردهای حساس طبقه‌بندی می‌شود؛ زیرا دی‌ان‌ای کاملاً خالصی را ارائه می‌کند و نیازی به روش‌های طولانی یا استفاده از مواد شیمیایی سمی ندارد. این فناوری مبتنی بر اصل کروماتوگرافی تبادل آنیون برای استخراج و خالص‌سازی دی‌ان‌ای از محلول‌ها است و از تعامل الکترواستاتیک بین بارهای منفی در فسفات‌های بدنهٔ دی‌ان ای و مولکول‌های با بار مثبت روی سطح بسترها، مانند گروه‌های دی‌متیل‌آمینو اتیل سلولز (DEAE) در سطح رزین، تحت محلول‌های حاوی غلظت کم نمک با شرایط pH مناسب (pH=۹-۶)، استفاده می‌کند. در قالب نوعی ستون تحت این شرایط، دی‌ان‌ای به‌طور خاصی به لایهٔ رزین متصل می‌شود، که اساساً یک بسپار متخلخل یا ژل است که به عنوان واسط برای تبادل یونی عمل می‌کند، درحالی‌که ماکرومولکول ها و دیگر ناخالصی‌ها مانند آران‌ای‌ها بعد از شست وشو با بافر نمک ضعیف یا متوسط حذف می‌شوند. سپس از بافر نمک قوی برای شست وشوی دی‌ان ای از رزین استفاده و دی‌ان ای از راه رسوب الکل بازیابی می‌شود. با وجود سادگی و کارایی آن در جداسازی دی‌ان ای از روش استخراج مایع- مایع مرسوم، فناوری تبادل آنیون هنوز به مراحل اضافی مشابه برای بازیابی دی‌ان ای نیاز دارد که شامل مراحل سانتریفیوژ و رسوب الکل است و برای استخراج دی‌ان ای وزن مولکولی پایین مناسب نیست[۱۵و۱۴].

۵-۳ جداسازی مغناطیسی

در مقایسه با دو روش SPE برای استخراج دی‌ان‌ای، فناوری استخراج بر پایهٔ سیلیکا و تبادل آنیون، روش جداسازی مغناطیسی نوظهورتر است؛ در تصفیهٔ دی‌ان‌ای بسیار ساده‌تر و کارامدتر و ازنظر تجاری نیز در دسترس است. روش جداسازی مغناطیسی از مهره‌ها یا ذرات مغناطیسی عامل‌دار استفاده می‌کند؛ مانند دانه‌های زیرکونیا و دانه‌های سیلیکا که در یک سلول بافر پوشش داده‌شده با آنتی‌بادی اتصال دی‌ان‌ای یا سطحی که به‌طور خاص و با دی‌ان‌ای تعامل دارد، تلقیح شدند. مواد مغناطیسی و همچنین جاذب هایی برای جداسازی دی‌ان ای از دیگر ماکرومولکول های زیستی، به‌دلیل تعدادی از عوامل، یعنی مساحت سطح بزرگ، زیست سازگاری مناسب، کارکرد آسان و قابلیت چشمگیر برای دست کاری در بی‌حرکتی سطح برای اتصال دی‌ان ای، مناسب است. این دانه های مغناطیسی به ساختار دی‌ان‌ای تمایل نشان می‌دهند، که به اتصال دی‌ان ای به آنها و حذف آلاینده ها از محلول مخلوط کمک می‌کند. دی‌ان‌ای با شست‌وشو از بین مهره‌ها جدا و در تجزیه و تحلیل‌های بعدی استفاده می‌شود. یکی دیگر از برتری‌های مهم استفاده از این

روش کاربرد مستقیم در استخراج مواد خام و درنتیجه از بین‌بردن مراحل سانتریفیوژ غیرضروری در فرایند جداسازی مغناطیسی است که ممکن است منجر به تخریب دی‌ان ای شود. این روش همچنین برای آنالیت‌های زیست شناختی مانند پروتئین ها یا پپتیدها و حتی مجتمع های پروتئین بزرگی که نحو دیگری تمایل به شکست در فرایندهای کروماتوگرافی ستونی سنتی دارند، غیرمخرب است. علاوه بر این، به‌دلیل ماهیت ملایم، آنالیت‌های هدف به راحتی جذب و به طور انتخابی از محلول مخلوط‌شده، خارج می‌شوند؛ به ویژه برای تسهیل روش‌های استخراج و خالص‌سازی مؤثر دی‌ان‌ای در انجام عملیات در مقیاس بزرگ. با وجود همهٔ این برتری‌ها، این روش، نسبتاً جدید و هنوز در دست توسعه است که ظرفیت آن به‌طور کامل استفاده نشده است. در برخی موارد، روش جداسازی مغناطیسی نیاز به استفاده از ابزارهای تخصصی خودکار دارد و ممکن است معرف‌های شیمیایی موجود در شست وشوی نهایی با کاربردهای حساس پایین‌دست مانند استخراج دی‌ان‌ای مبتنی بر سیلیکا، سازگار نباشند[۱۳,۱۶,۱۷].

۴-۵ ابزارهای تجاری

با ترکیب تلاش‌های فوق، کیت‌های تجاری مختلفی برای استفادهٔ امروز وجود دارند که از یک حلال و پشتیبانی فاز جامد (ستونی/مهره‌ای) برای استخراج دی‌ان‌ای از انواع مختلف از نمونه‌ها استفاده می‌کند. این کیت‌ها برای استخراج دی‌ان‌ای ویژه بر اساس منبع انرژی، توسعه داده می‌شوند. کیت های تجاری دی‌ان‌ای با موفقیت در طول سال‌ها رخ نماهای دی‌ان ای را نشان داده‌اند و هنوز هم برای مؤسسات و شرکت‌هایی که امور زیست‌شناختی را به منظور سهولت در فرایندهای استخراج زیست‌مولکول در آزمایشگاه های خود به کار می‌گیرند، به طور گسترده تولید می‌شوند. این کیت های تجاری دی‌ان ای به‌دلیل سادگی و مصرف زمانی کمتر، برای پردازش نمونه‌های بزرگ در زمان محدود مطلوب هستند. با این حال، همهٔ کیت‌ها به‌آسانی قابل اجرا نیستند؛ برخی از کیت‌ها در برخی از کشورها در دسترس نیستند و یا بسیار گران هستند، به ویژه هنگامی‌که روش‌های دیگری وجود دارد که می‌تواند نتایج قابل مقایسه‌ای را با کیت‌های تجاری ارائه دهد، این کار به‌صرفه نیست[۱۸].

۶. چشم‌اندازهای آینده: سامانهٔ استخراج بر پایهٔ دستگاه میکروفلوئیدی

روش‌های مرسوم استخراج دی‌ان‌ای با استفاده از روش‌های استخراج مایع- مایع و استخراج فاز جامد برای تجزیه و تحلیل دی‌ان‌ای معمولاً شامل مراحل پرتحرک و وقت‌گیر برای انتقال نمونه، سانتریفیوژ و دیگر مراحل است. این روش‌های معمول برای استخراج دی‌ان‌ای، یا پروتکل‌های مبتنی بر محلول یا جامد، معمولاً اجازه می‌دهند که آلودگی نمونه و خطاهای آزمایشی رخ دهد. هر دو برتری‌ها و کاستی‌های خاص خود را دارند. برخی از روش‌های پیچیده در استخراج مایع- مایع به کارکنان بسیار ماهر و ابزار گران‌قیمت نیاز دارد؛ به‌عنوان مثال، استفاده از نیتروژن مایع، درحالی‌که برای استخراج فاز جامد توجه بالایی نسبت به حلال‌های آلی ندارد، برخی از روش‌ها در استخراج فاز جامد در مقایسه با حلال‌های آلی نامناسب است و به‌دلیل قرارگرفتن کمتر از مساحت سطح برای اتصال دی‌ان ای، منجر به بازده کمتری در دی‌ان ای می‌شود. ناکارامدی استخراج فاز جامد نیز می‌تواند با حساسیتی بالاتر نسبت به آلودگی پروتئین به‌علت اتصال غیر اختصاصی، نقش داشته باشد؛ به عنوان مثال، در استخراج مایع- مایع، در روش فنل کلروفرم استخراج دی‌ان‌ای، باقیمانده‌های فنل برای تغییر ماهیت این پروتئین‌ها وجود دارند، حتی کیت‌های تجاری با وجود سادگی و نتایج سریع، دارای کاستی‌های خاص خود هستند. برای کاهش این کاستی‌ها و همچنین تضمین بهبود مستمر در زمینهٔ جداسازی اسید نوکلئیک‌ها، دانشمندان شروع به ترکیب‌کردن سامانهٔ تحویل بر پایهٔ میکروفلوئیدیک برای استخراج دی‌ان‌ای کرده‌اند، که یکی از آن‌ها امکان دست‌کاری در سیالات در یک منطقهٔ معین از نظر هندسی، حداقل زیر میلی‌متر، یا حتی مقیاس نانومتری را میسر می‌سازد. از دیگر برتری‌های آن می‌توان به ساخت روش های مختلف برای استخراج دی‌ان‌ای با کارایی و کوچک‌سازی مقیاس‌های آزمایشگاهی در سامانهٔ عامل‌های در مقیاس میکرو، برای خودکارسازی دی‌ان‌ای بر روی تراشه اشاره کرد که شامل ادغام و بهینه‌سازی روش‌های استخراج فاز جامد و اجزای مختلف کارکردی مانند کانال، دریچه، پمپ، همزن و حس‌گر در سامانهٔ میکروفلوئیدی است. مطالعات نشان داده‌اند که طی سال‌های اخیر، فناوری میکروفلوئیدی موفقیت چشمگیری در کوچک‌سازی کارهای مولکولی بر روی یک تراشهٔ واحد داشته است. توانایی این سامانه

برای ادارهٔ استخراج دی‌ان ای در یک سطح پیچیده و حفظ مهارت در چندین فرایند تحلیلی با بازیابی کافی دی‌ان‌ای، توجه بیشتر محققان را به سرمایه گذاری در زمان و توجه به اعمال این فناوری درزمینهٔ علوم مختلف به خصوص در تشخیص درجا برای بیماری‌زاها در بخش کشاورزی و سامانه‌های پزشکی مراقبت‌های بهداشتی، اختصاص می‌دهد[۷].

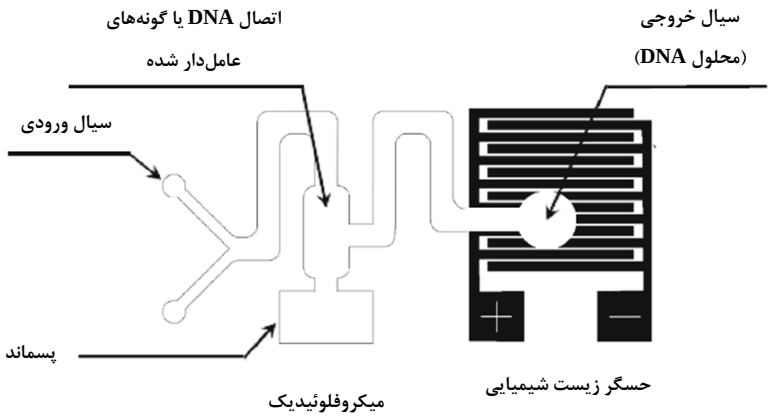
۷. فیزیک میکروفلوئیدیک‌ها

ابتدا فناوری میکروفلوئیدی در زمینهٔ ریززیست شناسی برای انجام سنجش های مختلف زیست شناختی شامل حجم بسیار کمی از نمونه‌ها و معرف‌ها به کار گرفته شد. با توجه به ویژگی قانع کنندهٔ میکروفلوئیدها برای کار در ریزتجزیه‌ها، به‌زودی تبدیل به ابزاری معتبر برای بسیاری از تحلیل ها در زمینه‌های دیگر زیست شناختی خواهد شد. توانایی دست‌کاری در خواص سیال، امکانات بی‌شماری را در ایجاد و بازآفرینی دستگاه‌های میکروفلوئیدی با خصوصیات سیال مشخص از تجهیزات معمول برای استفاده از استخراج دی‌ان‌ای فراهم کرده است[۱۹]. عدد رینولدز کم (کمتر از ۰/۱) برای استخراج دی‌ان ای در شرایط بهینه مهم است؛ از آنجایی که حتی کوچک ترین تغییر در شکل و زبری سطح می‌تواند جریان‌های بسیار متفاوتی داشته باشد، بر کارایی استخراج آن مؤثر است. عدد رینولدز همچنین رابطهٔ بین نیروهای اینرسی و نیروهای گرانرو را در یک محلول نشان می‌دهد. یک معادلهٔ دیگر که نقشی حیاتی در کسب اطمینان از ذرهٔ اختلاط مؤثر برای سلول ها بازی می‌کند تا به‌طور کامل با معرف های شیمیایی که برای لیز شدن و آزاد کردن اسید نوکلئیک‌ها در محیط محلول هستند، مؤثر باشد؛ عدد پکلت ($Pe=ul/D$) است[۱۹]. هنگامی‌که عدد رینولدز کوچک است (که معمولاً در سامانه‌های ریزسیالی این‌گونه است)، جریان آشفته نیست و اختلاط جریان به‌وسیلهٔ جابه‌جایی قابل‌توجه نیست. در چنین مواردی، اختلاط از راه نفوذ مهم می‌شود؛ برای بیان یک میزان از انتقال نفوذی در برابر انتقال جابه‌جایی، عدد پکلت (Uh/D) به‌عنوان نسبت انتقال جابه‌جایی (Uh) به انتقال نفوذی (D) تعریف می‌شود.

۸. مروری بر پژوهش‌های انجام‌شده بر پایهٔ میکروفلوئیدیک

فناوری سنجش زیستی به‌اندازهٔ کاربردهایی که بر روی این حسگرهای زیستی اعمال می‌شود، متنوع است؛ بنابراین، تعریف روشنی از حسگر زیستی دشوار است، اما در یک تعریف کلی حسگر زیستی به‌عنوان وسیله‌ای توصیف می‌شود که یک رویداد زیست‌شناختی را به یک سیگنال خروجی دیجیتال تبدیل می‌کند. تبدیل رویدادهای زیست‌شناختی به سیگنال خروجی به رسانندهٔ انرژی متکی است که ساخت و کار آن می‌تواند الکتروشیمیایی، مکانیکی، نوری، پیزوالکتریک یا مغناطیسی باشد، که به‌طور معمول با برخی از مؤلفه‌های فعال زیستی کار می‌کند که اتصال بین مولکول‌های مکمل را تسهیل می‌کند[۲۰]. از طرف دیگر، میکروفلوئید بستر جداسازی اسید نوکلئیک‌ها، کوچک‌سازی آزمایش های جامع و روش های استخراج دی‌ان‌ای را در یک تراشهٔ واحد فراهم می‌کند. از آنجایی که دستگاه های فعلی اندازه گیری‌های تحلیلی را فقط برای تشخیص دی‌ان‌ای به خودی‌خود ارائه داده‌اند، با ترکیب ساختار مشخص‌شدهٔ میکروفلوئیدی استخراج دی‌ان‌ای در دستگاه هایی از این دست، دستگاه آزمایشگاهی را روی تراشه ایجاد می‌کنند که یک سامانهٔ کامل برای تشخیص خودکار دی‌ان‌ای از تصورهای زیادی را برای شناسایی رخ‌نماهای دی‌ان‌ای گونه‌های هدفمند فراهم می‌کند (شکل (۴)). با وجود بسیاری از ویژگی‌های قانع کنندهٔ آن، همچون خودکارسازی در تهیهٔ نمونه و قابلیت کار در حجم کمی از نمونه، همچنین به حداقل رساندن مصرف، هزینه و زمان پردازش معرف‌ها، میکروفلوئیدیک هنوز با چالش‌هایی روبه‌روست، این چالش‌ها شامل ساخت تراشهٔ سیال کم‌هزینه، به حداقل رساندن تعامل آنالیت/ دیوارهٔ غیراختصاصی (از آنجایی که میکروفلوئیدیک اغلب با نسبت سطح به حجم بالا همراه است) و ایجاد یک سامانهٔ سنجش زیست شناختی کامل بر پایهٔ تراشه است. با این وجود، یک حسگر می‌تواند کاربردهایی به عنوان یک ابزار تشخیصی پیدا کند و نسبت به روش‌های مرسوم، به‌دلیل انتخاب‌پذیری بالا، حساسیت بالا و همچنین تشخیص توان عملیاتی بالا ترجیح داده شود[۷].

در جدول (۱) اطلاعاتی در مورد توده‌های مختلف دی‌ان‌ای، ام‌آران‌ای، آران‌ای ریبوزومی (آرآران‌ای) و پلی‌ریبونوکلئیک‌اسیدها با وزن مولکولی کم (انتقال و میکروآران‌ای) موجود در سلول تک‌دیپلوئیدی نسبت به مؤلفهٔ پروتئین موجود است. از بسیاری جهات، این جدول چالش مربوط به استخراج نوکلئیک اسیدها (NA) از نمونه‌های زیست‌شناختی را دارد که مؤلفهٔ نوکلئیک اسید از سلول



شکل ۴. تصویر یک سامانهٔ‌آزمایشگاهی ساده بر روی تراشه. ادغام تحویل میکروفلوئیدی در حسگر[۷].

جدول ۱. اجزای یک سلول دوتایی پستانداران معمولی[۱] [۲۱].

اجزا	جرم (pg)	٪[۲]
دی‌ان‌ای	۵-۷	۱/۶-۲
آران‌ای	۱۰-۳۰	۳-۹
آر آران‌ای	۸-۲۶	۸۰-۸۵
ام آران‌ای	۱/۵-۶	۱۵-۲۰
گونه‌هایی با وزن مولکولی کم	۱/۵-۰/۱	۱-۵
پروتئین	۳۰۰	۸۹

به‌مرتبهٔ بزرگی با تودهٔ پروتئین سلول کمرنگ شده است؛ به‌عبارت ساده، استخراج کارامد نوکلئیک اسید از یک میکرو لیتر واحد خون کامل، نیاز به حذف ده‌ها نانوگرم دی‌ان‌ای از ده‌ها میکروگرم پروتئین دارد. انتقال روش‌های مرسوم تحلیلی به قالب اندازهٔ میکرو، امکان سنجش طراحی‌شده برای کاربردهای اندازهٔ نانو به‌اندازهٔ میکرولیتر را فراهم کرده است (جدول (۲)). به‌طور خاص، کوچک‌سازی روش‌های آماده‌سازی نمونه، به‌منظور کاهش دست‌زدن به نمونه، کاهش آلودگی و تسریع زمان تجزیه و تحلیل بررسی شده است[۲۱].

با توسعهٔ سامانه‌های بر پایهٔ تراشه در طول سال‌ها، ادغام روش‌های مختلف بر روی سامانه‌های بر پایهٔ تراشه به‌عنوان یک تختگاه واحد اجرا شده است.

وو[۳] و همکاران پیرامون کوچک سازی برای استخراج، تقویت و تشخیص دی‌ان‌ای در سنجش‌های مبتنی بر میکروفلوئیدیک بحث کرده‌اند. این نوع مجموعه‌های آزمایشی ترکیبی، هزینه و مراحل آزمایشی و زمان مورد نیاز را به‌شدت کاهش می‌دهد. علاوه بر این، ترکیب اجزای کوچک، مانند ریزشیرها برای تنظیم فشار، حرکت سیال و ترکیب‌کردن، ضرورت تجهیزات خارجی را به حداقل می‌رساند[۲۲].

اُبلاث[۴] و همکاران یک سامانه بر پایهٔ تراشهٔ جدید برای تشخیص دی‌ان‌ای از کل سلول‌های باکتریایی ساکن در بزاق، که توانایی تشخیص ۳۰۰ دی‌ان‌ای را دارد، ایجاد کرده‌اند. چون سامانه‌های بر پایهٔ تراشه به خوبی برای مقدار کمی از نمونه تنظیم شده است، تجزیهٔ دی‌ان‌ای از بزاق، در دستگاه بر روی تراشه امکان‌پذیر است و از آنجایی که از نمونه برداری غیرتهاجمی پشتیبانی می‌کند، اهمیت می‌یابد. اُبلاث و همکاران همچنین اظهار داشتند که سامانه‌ای بر پایهٔ تراشهٔ مناسب با مواد بسپاری است و رسوب ناپذیری بالاتر را تسهیل می‌کند. مشخصهٔ جذاب دیگر سامانهٔ سنجش خودکار بر پایهٔ تراشهٔ -کوپل شده، کمینه‌سازی خطاها در طول جابه‌جایی نمونه‌ها و معرف‌ها است[۲۳].

۱ مقادیر درصد از کل مقدار نوکلئیک‌اسید و پروتئین تعیین شد
۲. درصد آران‌ای کل

3. Wu
4. Oblath

جدول ۲. مراحل و روش‌های استخراج برای تصفیهٔ دی‌ان‌ای با دستگاه‌های میکروفلوئیدیکی[۲۱].

بستر	فاز	نمونه	ظرفیت بارگذاری	بازدهی استخراج	حجم شست‌وشو (میکرولیتر)
سیلیکون	میکروساپورت سیلیکا	λ-دی‌ان‌ای	۴۰ng/cm^2 ۸۲ ng/cm^2	٪۵۰ -	- ۵۰-۲۵۰
موئینه	مهره‌های سیلیکا	خون کامل	-	٪۷۰	-
شیشه	مهره‌های سیلیکا، سل- ژل، TEOS	λ-دی‌ان‌ای دی‌ان‌ای باکتریای و ویروسی	- ۰/۲ میکرو لیتر خون	٪۳۰-۶۰ ٪۶۷	۱۵ ۲۰
پی‌دی‌ام‌اس	سل- ژل	g-دی‌ان‌ای	-	۷۰-۷۷	۲۰-۶۰
پی‌ام‌ام‌ای	مهره‌های سیلیکا	λ-دی‌ان‌ای	۱۰^{8}سلول اشریشیا کولی	-	-
شیشه	مونولیت‌های آلی	g-دی‌ان‌ای، خون	۱۰ میکرو لیتر خون	۷۰	۲-۵
ستون چرخشی کیاژن	پوشش سیلیکا	خون	۲۰۰ میکرو لیتر خون	٪۸۰-۱۰۰	۵۰-۲۰۰
سیلیکون	کانال پوشش داده با آمین	λ-دی‌ان‌ای، خون کامل	۹۷-۱۹۴ng/cm^2	۲۷-۴۰	۱۵-۳۰
شیشه	کانال پوشش داده با کیتوزان	λ-دی‌ان‌ای	۱/۵ میکرو لیتر خون	۷۵	۲
پلی کربنات	-	g-دی‌ان‌ای،λ-دی‌ان‌ای، آران‌ای‌کلی	۲۰ng/cm^2 gدی‌ان‌ای ۱۵۰-۲۰۰ng	۳۵-۸۵	۱۰-۴۰
سیلیکون	کانال متخلخل	g-دی‌ان‌ای آدم	۷۰ng/cm^2	۸۰	-

چونگ اون جین و همکارانش استفاده از سامانهٔ دی‌ام‌پی[1] را برای استخراج اسیدهای نوکلئیک از نمونه‌های مختلف، ازجمله سلول‌های پستانداران، سلول‌های باکتریایی و ویروس‌های ناشی از بیماری‌های انسانی ارزیابی و تأیید کردند که کیفیت و کمیت اسید نوکلئیک‌های استخراج‌شده برای تجزیه و تحلیل قوی نشانگرهای زیستی یا عوامل بیماری‌زا در تجزیه و تحلیل پایین‌دست کافی است. علاوه بر این، این سامانهٔ دی‌ام‌پی نیازی به ابزار و برق ندارد، مقرون به صرفه است و کارایی زمان و قابلیت حمل را بهبود بخشیده است[۲۴]. اما محدودیت‌های بسیاری ازجمله تخریب نوکلئیک اسیدها به‌وسیلهٔ حلال‌های آلی، خطر بالای آلودگی، نیاز به ابزارهایی ازجمله سانتریفیوژ، خلأ و سایر موارد، نیاز به مراحل آماده‌سازی ازجمله مراحل ساخت صافی/ غشاء، ذرات و پوشش معرف ماهیت فشرده و وقت‌گیر، ازجمله مراحل بررسی نمونه و بستر نامناسب برای آزمایش POC[2] ازجمله دشواری ادغام با روش تشخیص است. در اینجا، آن‌ها با استفاده از یک روش ساده و ارزان با دی‌متیل پی ملی میدات (دی‌ام‌پی) برای استخراج اسید نوکلئیک‌ها (آران‌ای و دی‌ان‌ای) در ترکیب با یک تختگاه فیلم نازک مبتنی بر میکروفلوئیدیک، بر محدودیت‌های استخراج اسید نوکلئیک از انواع مختلف نمونه‌ها با استفاده از روش‌های موجود گزارش می‌دهند[۲۴,۲۵].

دستگاه فیلم نازک برای استفاده به‌عنوان یک سامانهٔ میکروفلوئیدی

1. Dimethyl Pimelimidate

2. Point-Of-Care

(سامانهٔ بسته) با یک دستگاه برش لیزر CO_2 ساخته شد و دارای محفظه‌های میکروفلوئیدیک در یک میکروکانال تک در ترکیب با دی‌ام‌پی برای استخراج اسید نوکلئیک بود (شکل (۵)) برخلاف کیت کیاژن[1] (سامانهٔ باز)، محفظهٔ میکروفلوئیدیک این سامانه بر روی یک تختگاه بسته بناشده است تا از آلودگی ناشی از یک تختگاه باز جلوگیری کند. در طی مراحل شست‌وشو و پاک‌سازی، نمونه‌های واکنش در محفظهٔ میکروفلوئیدیک با تختگاه بسته باقی می‌مانند که باعث کاهش آلودگی می‌شود. شکل محفظهٔ میکروفلوئیدیک برای تسهیل لیز سلولی و پراکندگی نمونه از راه القای ریزمخلوط شدن منفعل در حین استخراج اسید نوکلئیک طراحی‌شده است. انبساط و انقباض ناگهانی در ناحیهٔ مقطعی جریان می‌تواند ریزگرداب‌ها را در تزریق نمونهٔ مایع ایجاد کند[۲۴,۲۵].

برای ساخت تراشهٔ یک‌بارمصرف سه‌بعدی با سه‌لایه (شکل (۵)- ب)، دستگاه برش لیزر CO_2 سه لایهٔ تشکیل‌شده از نوار دوطرفهٔ ضخامت ۳۰۰ میکرومتر را ایجاد کرد؛ به‌عنوان یک‌لایهٔ داخلی و دو فیلم نازک ۱۰۰ میکرومتر ضخامت به‌عنوان لایه‌های بیرونی (شکل (۵)- ب). لایه‌های بیرونی به سطوح چسبندهٔ دائمی بالا و پایین لایهٔ داخلی (نوار دوطرفه) وصل شده بودند تا یک تراشهٔ قابل عرضهٔ سه‌بعدی را برای واکنش دی‌ام‌پی تولید کنند (شکل (۵)- ب، راست). بر این اساس، ارتفاع محفظه در حدود ۳۰۰ میکرومتر تنظیم شده و حجم کل ۳۰۰ میکرولیتر (شکل (۵)- ب) است[۲۴,۲۵].

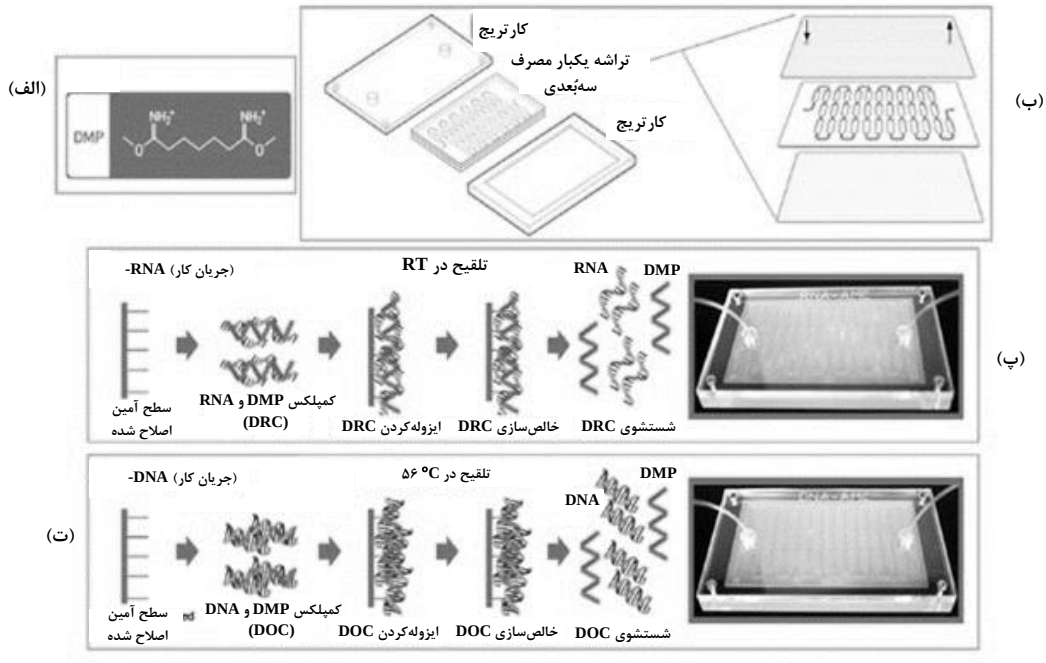
برای جابه‌جایی آسان تختگاه فیلم باریک برای استخراج اسید نوکلئیک، یک کارتریج پلاستیکی با استفاده از دستگاه برش لیزر ساخته شد (شکل (۵)- ب) کارتریج پلاستیکی (قسمت‌های بالا و پایین) تراشهٔ یک‌بارمصرف سه‌بعدی را در طول سنجش نگه داشت. ابعاد آن ۱۰۵ میلی‌متر طول، ۶۰ میلی‌متر عرض و ۱۰ میلی‌متر ارتفاع بود. طرح هر جزء پلاستیکی ابتدا با استفاده از اتوکد[2] (شکل (۵)- ب) طراحی‌شده بود. سرانجام، به‌منظور استفاده از دی‌ام‌پی (شکل۵ الف) به‌عنوان یک معرف ساختارشکن با تختگاه فیلم نازک برای استخراج اسید نوکلئیک، پروتکل اصلاح سطح بهینه شد. به‌طور خلاصه، به‌منظور ایجاد یک گروه آمین در سطح داخلی تراشهٔ یک‌بارمصرف سه‌بعدی، ابتدا سطح با پلاسمای اکسیژن به‌مدت ۳، ۵، ۷ و ۱۰ دقیقه تحت عملیات قرار گرفت تا خصوصیات سطح فیلم داخلی از آب‌گریزبودن به آب‌دوست‌بودن و غوطه‌ورشدن در محلول ۲٪، ۳- آمینوپروپیل‌تری‌نوکسیلان به‌مدت ۱۰-۶۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجهٔ سلسیوس تغییر کند و به‌دنبال آن شست‌وشوی کامل با آب دیونیزه شده است، این سامانه تا زمان استفاده می‌تواند در دمای اتاق ذخیره شود[۲۴,۲۵].

برای استخراج دی‌ان ای، سامانه به‌مدت ۲۰ دقیقه مورد تلقیح در دمای ۵۶ درجهٔ سلسیوس قرار گرفت تا دی‌ان ای از منابع استخراج شود (شکل (۵)- د). دی‌ام پی می‌تواند نوکلئیک اسیدها را با تجمع روی سطح ضبط کند. پس از شست‌وشو با PBS[3] در ۵۰ میکرولیتر بر دقیقه از سرعت جریان برای از بین بردن بقایای نمونه‌ها با استفاده از پمپ سرنگی، یک بافر شست‌وشو (۱۰میلی‌مولار بی‌کربنات سدیم، pH<۱۰,۶، سرعت جریان؛ ۵۰ میکرو لیتر بر دقیقه) برای جمع‌آوری نوکلئیک اسیدهایی که طی چند دقیقه استخراج می‌شدند، استفاده شد. مقدار و خلوص اسیدهای نوکلئیک استخراج شده با استفاده از نسبت چگالی نوری (تراکم چشمی) نمونه‌ها در ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر، با نانودراپ[4] اندازه‌گیری شد. مقدار پروتئین موجود در نمونه با استفاده از طیف نورسنج درتراکم نوری ۵۹۵ نانومتر پس از مخلوط‌کردن با معرف بردفورد اندازه گیری شد. برای مقایسهٔ سامانه با یک روش استخراج اسید نوکلئیک معمولی، از کیوآی‌ام‌پی ویرال آران‌ای مینی‌کیت[5] یا کیوآی‌ای‌ام‌پی دی‌ان‌ای[6] مطابق پروتکل سازنده استفاده شد[۲۴,۲۵].

برای آزمایش کارایی سامانه با نمونه‌های مختلف، رده‌های سلولی سرطانی(AGS[معده، ATCC_CRL-1739]، HCT116[رودهٔ بزرگ، ATCC_CCL-247]و MCF7[پستان، ATCC_HTB-22]) در ظروف پلاستیک نگهداری شدند. گلوکز بالا با ۱۰٪ سرم جنین گاوی، در انکوباتور مرطوب ۳۷ درجهٔ سلسیوس با ۵٪ CO_2 محیط تزریق شد. پس از کشت، از سلول‌ها برای استخراج اسید نوکلئیک با سامانه و کیت کیاژن استفاده شد. پس از آن، آن‌ها با استفاده از دی‌ان‌ای استخراج‌شده اشریشیا کولی با سامانه، تقویت دی‌ان‌ای مبتنی بر پی‌سی‌آر انجام شد. برای اعتبارسنجی توانایی سامانهٔ نمونه‌های بالینی انسانی، ۱۴۰ میکرولیتر از نمونه‌های پلاسمائی خون، از بیماران مبتلا به بیماری انسانی با ۲۰۰ میکرولیتر از محلول آزمایش

1. Qiagen
2. AutoCad

3. Phosphate Buffer Solution
4. Nanodrop
5. QIAamp Viral RNA Mini Kit
6. QIAmp DNA

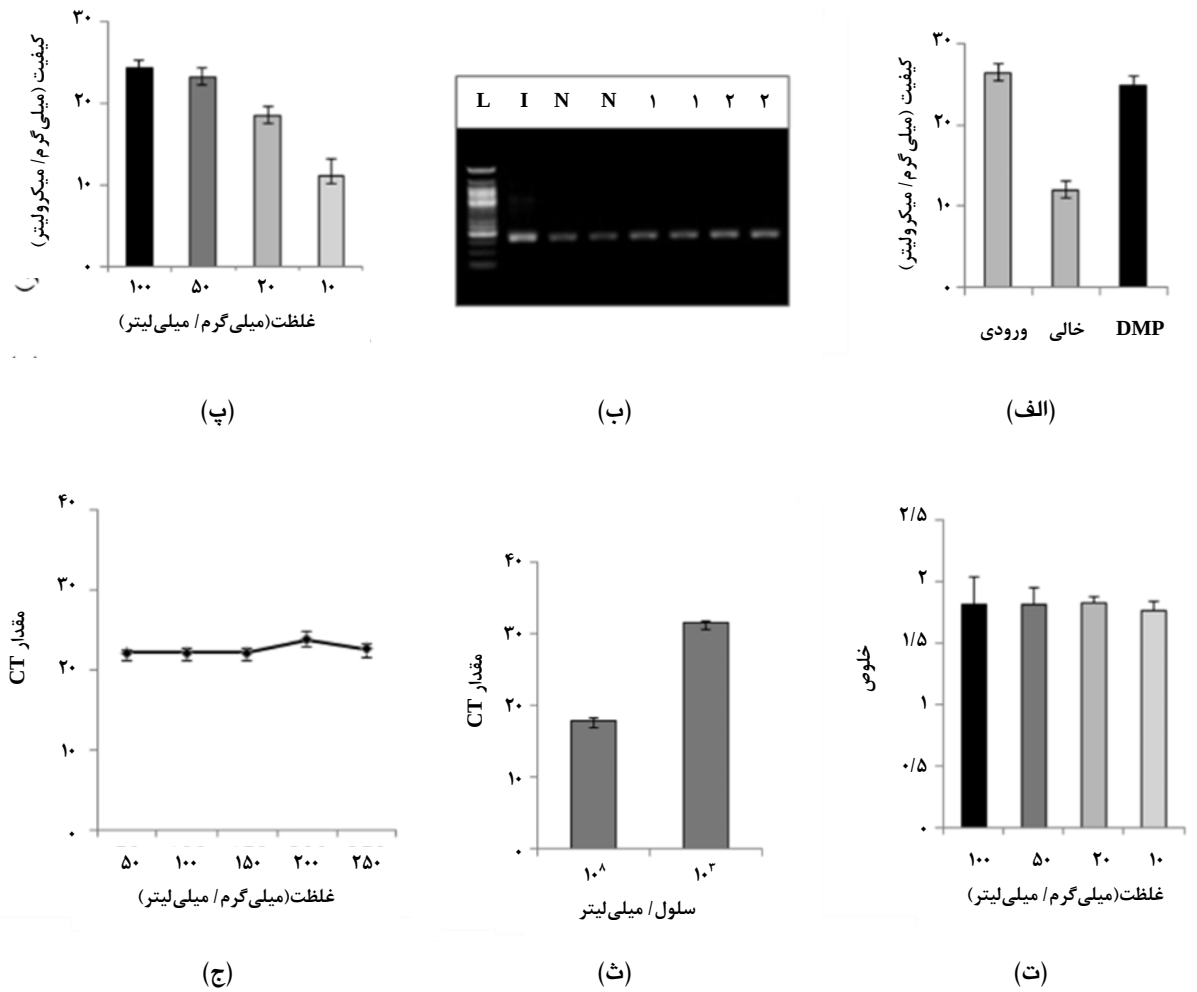


شکل ۵. نمایش طرحواره از اصل سامانهٔ دی‌ام‌پی برای استخراج اسید نوکلئیک. (الف) ساختار شیمیایی (ب) دی‌ام‌پی یک کارتریج میکروفلوئیدی پلاستیکی از نوع پلاستیک با یک تراشهٔ یک‌بارمصرف سه‌بعدی که با استفاده از دستگاه برش لیزر برای استخراج اسید نوکلئیک ساخته‌شده است. طراحی طرحواره برای مونتاژ تراشهٔ یک‌بارمصرف ۳بعدی (پ، ت) جریان کار طرحواره از سامانهٔ دی‌ام‌پی برای استخراج (پ) آران‌ای و (ت) دی‌ان‌ای یک محلول مخلوط شامل بافر لیز، نمونه‌ها و دی‌ام‌پی برای استخراج اسیدهای نوکلئیک به تراشهٔ یک‌بارمصرف سه‌بعدی اضافه می‌شود. محلول در دمای اتاق یا به‌مدت ۱۰-۲۰ دقیقه برای (آران‌ای) یا ۵۶ درجهٔ سلسیوس به‌مدت ۲۰ دقیقه برای (دی‌ان‌ای) برای جذب اسیدهای نوکلئیک از راه معرف دی‌ام‌پی روی سطح آمین اصلاح‌شده از فیلم نازک، برای جداسازی و تصفیه انکوبه می‌شود. مجتمع سرانجام، اسیدهای نوکلئیک (آران‌ای یا دی‌ان‌ای) به‌سرعت شسته می‌شوند. (پ، ت) عکسی از نمونهٔ اولیهٔ کارکرد سامانهٔ دی‌ام‌پی برای استخراج (RNA-AMC [RNA مرکز پزشکی آسان) و DNA (DNA-AMC) [۲۴].

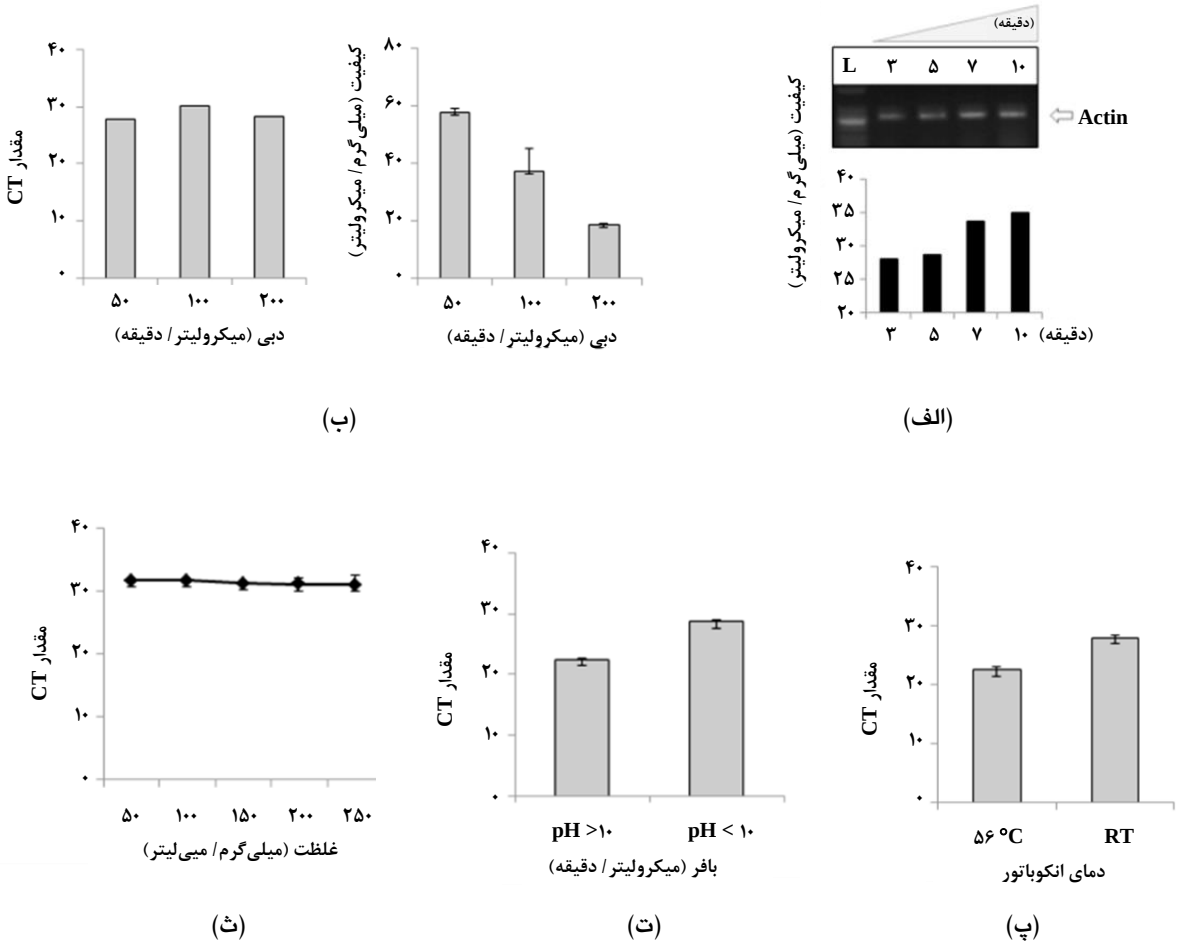
مخلوط و سپس برای آران‌ای ویروسی و استخراج دی‌ان‌ای باکتریایی به سامانه تزریق شدند. سرانجام، بافر شست‌وشو برای جمع‌آوری اسیدهای نوکلئیک استخراج‌شده (آران‌ای یا دی‌ان‌ای) با شکستن تعامل بین سطح پیچیده و داخلی سامانه که می‌تواند برای تجزیه و تحلیل پایین‌دست زیست مولکول‌ها استفاده شود، اضافه شد.

برای بررسی اینکه آیا سامانهٔ دی‌ام پی می‌تواند برای استخراج اسیدهای نوکلئیک (آران‌ای و دی‌ان‌ای) مفید باشد، خصوصیات اساسی سامانه در سلول‌های سرطانی و سلول‌های باکتریایی اجرا شد. در شکل ((۶)-الف)، میزان بازیابی دی‌ان‌ای ورودی (۱ میکروگرم دی‌ان‌ای ژنومیک انسان) با و بدون دی‌ام‌پی اندازه‌گیری شد. بیش از ۹۵٪ دی‌ان‌ای با دی‌ام‌پی (سیاه) بازیابی شد و کمتر از ۵۰٪ از دی‌ان‌ای بدون دی‌ام پی ازراه تعامل الکترواستاتیک بازیابی شد (شکل (۶)- الف). برای بهینه‌سازی پروتکل سامانه برای استخراج دی‌ان‌ای ژنومیک انسان و آران‌ای از ردهٔ سلولی سرطان (۱×۱۰^{۶} سلول از ردهٔ سلولی سرطان پستان) استفاده شد. بر اساس نتایج مشخصات (شکل (۶) و شکل (۷))، پروتکل سامانه از نظر زمان پلاسمای اکسیژن (۱۰ دقیقه) برای شکل‌گیری آب‌دوستی روی سطح کانال میکروفلوئیدی داخلی (شکل (۷)- الف) بهینه شده است. نرخ (۵۰ میکرولیتر بر دقیقه، شکل (۷)- ب) برای شست‌وشوی اسید نوکلئیک‌ها، غلظت دی‌ام‌پی (۱۰۰میلی‌گرم در میلی‌لیتر، شکل (۶)- ب و پ) و دمای تلقیح (۵۶ درجهٔ سلسیوس و دمای اتاق، شکل (۷)- پ) برای کیفیت و کمیت بالا استخراج نوکلئیک اسیدها بررسی شد. آنان نشان دادند که کارایی بافر شست‌وشو بی‌کربنات سدیم (pH > ۱۰) بهتر از بافر (Ph < ۱۰) است (شکل (۷)- ت). برخلاف استخراج دی‌ان‌ای، استخراج آران‌ای به‌دلیل تخریب آسان آران ای در همهٔ شرایط محیطی دشوارتر است.

با این وجود، سامانهٔ دی‌ام‌پی می‌تواند برای استخراج آران‌ای در غلظت سلول های سرطانی (۱×۱۰^{۳} و ۱×۱۰^{۶} سلول بر میلی‌لیتر) استفاده شود. برای استخراج دی‌ان‌ای با استفاده از سامانهٔ دی‌ام‌پی، ما همچنین از سلول‌های سرطانی (۱×۱۰^{۳} و ۱×۱۰^{۶} سلول بر میلی‌لیتر) در غلظت‌های مختلف با دی‌ام‌پی استفاده کردند (دامنهٔ ۵۰–۲۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر). برای آزمایش سازگار با پی‌سی‌آر، از دی‌ان‌ای استخراج‌شده از سامانه در دو غلظت برای تقویت ژن اکتین با پی‌سی‌آر در زمان واقعی استفاده کردند (شکل (۶)- ث، شکل (۷)- ت) آن‌ها مشاهده کردند که ژن اکتین در کلیهٔ غلظت دی‌ام‌پی با ۱×۱۰^{۶} سلول (شکل (۷)- ث، CT: ۲۲/۱۱±۰/۳۱) و ۱×۱۰^{۳} سلول (CT: ۳۱/۷۳ ±۰/۰۱ شکل (۷)- پ) تقویت شد [۲۴].



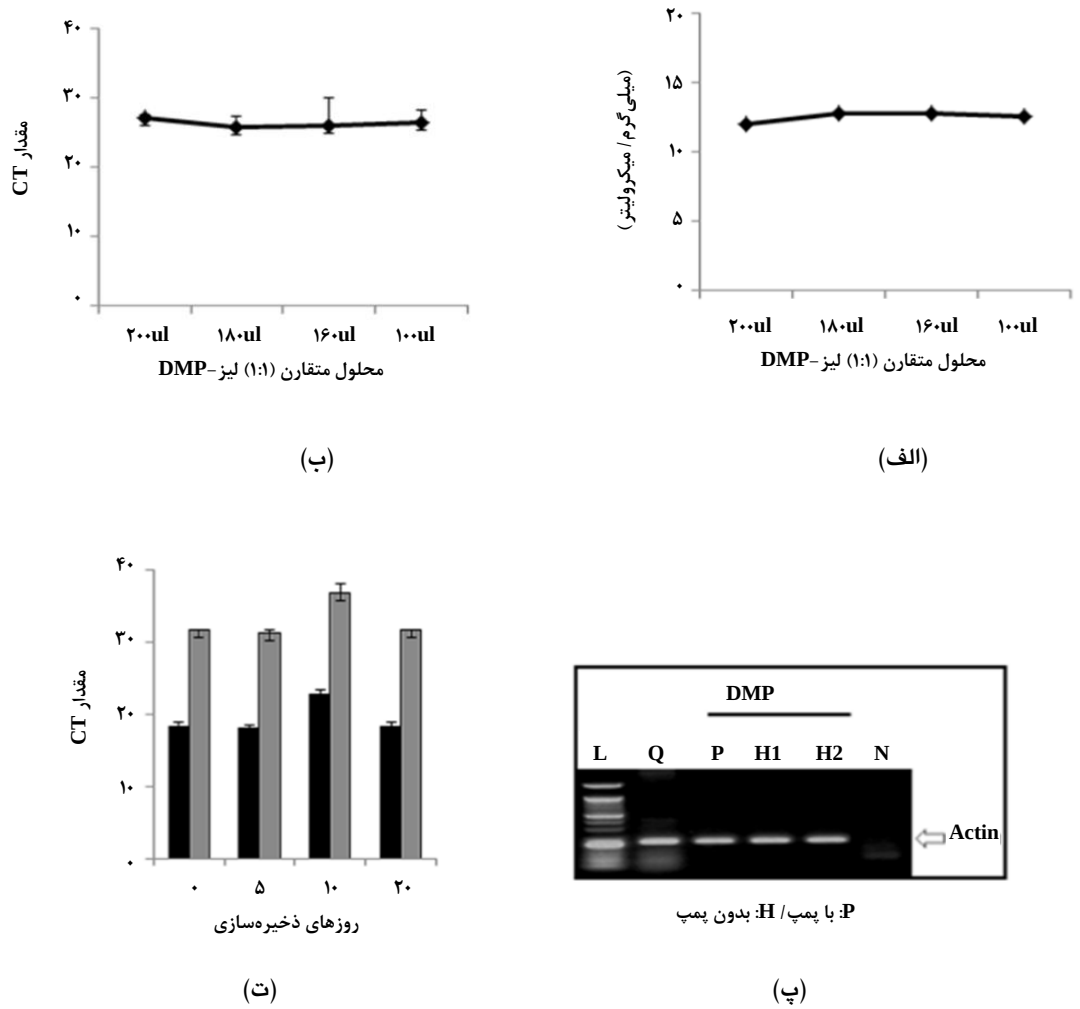
شکل ۶. خصوصیات اساسی سامانهٔ دی‌ام‌پی برای استخراج آران‌ای و دی‌ان‌ای (الف) مقادیر بازیابی دی‌ان‌ای ورودی با دی‌ام‌پی (ب) تجزیه و تحلیل پایین‌دست برای آزمایش ژنتیکی دی‌ان‌ای با ژن اکتین با دی‌ان‌ای ورودی (I)، بدون گروه دی‌ام‌پی (N) ، با (۱) دی‌ام‌ای و با (۲) دی‌ام‌پی، با استفاده از پی‌سی‌آر انجام شد. (پ) و (ت) مقدار (ث) و خلوص (ج) دی‌ان‌ای استخراج‌شده از سلول‌ها (HCT116، ردهٔ سلولی سرطان رودهٔ بزرگ) با استفاده از غلظت‌های مختلف دی‌ام‌پی (۱۰۰، ۵۰، ۲۰ و ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر). (ث) تجزیه و تحلیل پایین‌دست برای آزمایش ژنتیکی آران‌ای با ژن S۱۸، با استفاده از آران‌ای‌های استخراج‌شده از سلول‌های سرطانی، با سامانهٔ دی‌ام‌پی با استفاده از qRT-PCR یک‌مرحله‌ای انجام شد. (چ) تجزیه و تحلیل پایین‌دست برای آزمایش ژنتیکی دی‌ان‌ای با ژن اکتین، با استفاده از دی‌ان‌ای استخراج شده از سلول‌های سرطانی (سلول‌های ۱×۱۰^{۶}) با سامانه دی‌ام‌پی، با استفاده از روش Real-PCR انجام شد. همهٔ نوارهای خطا نشان‌دهندهٔ انحراف استاندارد از میانگین بر اساس حداقل سه آزمایش مستقل است[۲۴].



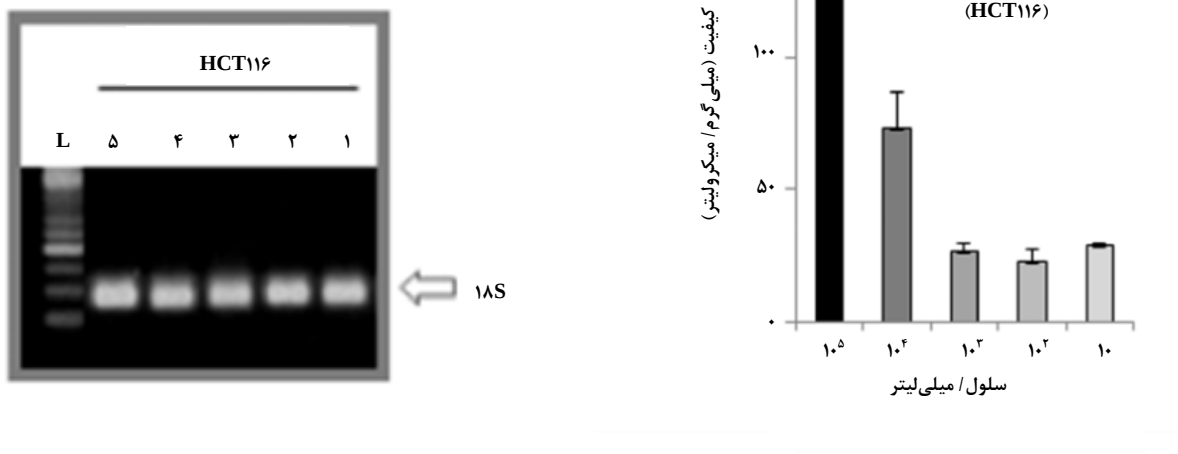
شکل ۷. خصوصیات اساسی سامانهٔ دی‌ام‌پی برای استخراج اسید نوکلئیک (الف) کارایی تقویت دی‌ان‌ای با دی‌ان‌ای استخراج‌شده از سامانهٔ دی‌ام‌پی با استفاده از پی‌سی‌آر به زمان اکسایش پلاسما (۳، ۵، ۷ و ۱۰ دقیقه) برای تغییر سطح فیلم نازک بستگی دارد. (ب) بهره‌وری (Real-PCR و کمیت) استخراج دی‌ان‌ای به میزان جریان مرحلهٔ شست‌وشو (۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرولیتر در دقیقه) با استفاده از پمپ سرنگ بستگی دارد. (پ) کارایی استخراج دی‌ان‌ای به درجهٔ حرارت تلقیح [۵۶ درجهٔ سلسیوس و دمای اتاق] بستگی دارد. کارایی استخراج دی‌ان‌ای در ۵۶ درجهٔ سلسیوس بهتر از دمای اتاق است. (ت) کارایی استخراج دی‌ان‌ای به بافر شست‌وشو بستگی دارد (pH>۱۰ و pH < ۱۰)کارایی بافر شست‌وشو (بی‌کربنات سدیم(pH> ۱۰)) بهتر از بافر است (ث) pH<۱۰ تجزیه و تحلیل پایین‌دست برای آزمایش ژنتیکی دی‌ان‌ای با ژن اکتین با استفاده از دی‌ان‌ای استخراج‌شده از سلول‌های سرطانی (سلول‌های ۱×۱۰^{۳})) با سامانهٔ دی‌ام‌پی، با استفاده از Real-time پی‌سی‌آر با غلظت‌های مختلف (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر). همهٔ نوارهای خطا نشان‌دهندهٔ انحراف استاندارد از میانگین بر اساس حداقل ۳ آزمایش مستقل است[۲۴].

علاوه بر این، آن ها برخی از موارد از قبیل کاهش محلول آزمایش، استفاده از باتری و شرایط نگهداری طولانی‌مدت را برای تختگاه قابل‌حمل ارزیابی کردند. طبق دستورالعمل WHO(سازمان بهداشت جهانی)، پردازش نمونه می‌تواند با هزینهٔ کم، ابزارهایی کمتر و بدون برق در تنظیمات واقعی انجام شود. آن‌ها مقدار و کارایی تقویت دی‌ان‌ای استخراج‌شده از سامانهٔ دی‌ام‌پی را با مقدار متفاوت محلول‌های سنجش آزمایش کردند (شکل (۸)- الف و ب). آن‌ها نشان دادند که مقدار و کارایی تقویت دی‌ان‌ای استخراج‌شده از سامانه با ۱۰۰ میکرولیتر (نسبت ۱: ۱ بافر لیز و دی‌ام‌پی) محلول سنجش شبیه به سامانه با ۲۰۰ میکرولیتر محلول سنجش است، که هزینهٔ آزمایش را کاهش می‌دهد. اگرچه سامانهٔ دی‌ام‌پی نیازی به استفاده از ابزارهای بزرگ ازقبیل سانتریفیوژها، گرداب‌ها و سایر موارد ندارد، اما این سامانه شامل نتایج حاصل از استفادهٔ بهینه از پمپ سرنگی با برق است؛ بنابراین، آن‌ها دلیل مفهوم سامانه را

بدون ابزار (بدون برق) بررسی کردند. در پی‌سی‌آر نقطهٔ پایانی، مشاهده کردند که دی‌ان‌ای‌های استخراج‌شده از سامانهٔ دی‌ام‌پی بدون پمپ سرنگ (بدون برق) نیز به خوبی تقویت می‌شوند. علاوه بر این، کارایی تقویت با استفاده از روش پی‌سی‌آر در گروه بدون پمپ سرنگی مشابه با گروه پمپ سرنگی است (شکل (۸)- پ). سپس، آن‌ها آزمایش ذخیره‌سازی را انجام دادند؛ ارزیابی مدت‌زمان برای استخراج نوکلئیک اسید را می‌توان برای تجزیه و تحلیل پایین‌دست در یخچال نگهداری کرد. آن‌ها نشان دادند که نوکلئیک اسیدهای استخراج‌شده از سامانهٔ دی‌ام‌پی می‌توانند طی ۲۰ روز در شرایط ذخیره‌سازی (در دمای $-20^{\circ}C$) استفاده شوند. آن‌ها مشاهده کردند که مقدار آران‌ای استخراج‌شده با سامانهٔ دی‌ام پی به تعداد سلول بستگی دارد (شکل (۹)- الف) شکل (۹)- پ) وابستگی آستانهٔ چرخه (مقدار CT) در qRT-PCR یک‌مرحله‌ای را بر غلظت سلول‌های HCT116 نشان می‌دهد. حالت خطی خوبی (R^2= ۰/۹۹۰۷) بین CT و غلظت مشاهده شد. علاوه بر این، آران‌ای استخراج‌شده از سامانه به‌طور قابل مقایسه‌ای با آنچه از کیت کیاژن به دست آمده، تقویت شد[۲۴].

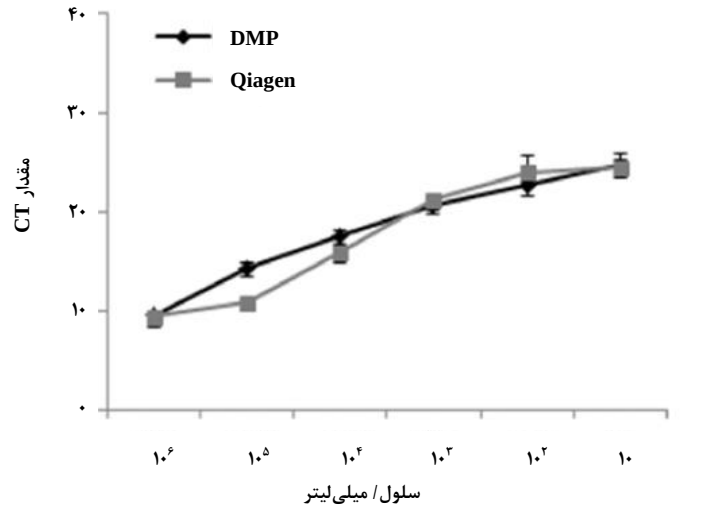


شکل ۸. خصوصیات سامانه (الف) دی‌ام‌پی اندازه‌گیری دی‌ان‌ای به محلول سنجش بستگی دارد (نسبت ۱: ۱ لیز و دی‌ام‌پی) (ب) کارایی تقویت دی‌ان‌ای استخراج‌شده از محلول‌های سنجش. (پ) آزمایش ظرفیت سامانهٔ دی‌ام‌پی بدون پمپ سرنگ (بدون برق). الکتروفورز ژل از محصولات اکتین با استفاده از پی‌سی‌آر نقطه انتهایی. (L: نشانگر اندازهٔ دی‌ان‌ای ؛ Q: کیت کیاژن ؛ P: با پمپ ؛ H1و H2 :بدون پمپ ؛ N: کنترل منفی). (ت) آزمایش تقویت دی‌ان‌ای به مدت‌زمان ذخیره (۰ روز تا ۲۰ روز) با استفاده از qRT-PCR بستگی دارد. رنگ‌ها میزان سلول‌ها را نشان می‌دهند: سیاه (۱ ×۱۰^{۶} سلول در میلی‌لیتر) و خاکستری (۱ ×۱۰^{۳} سلول در میلی‌لیتر) [۲۴].



(الف)

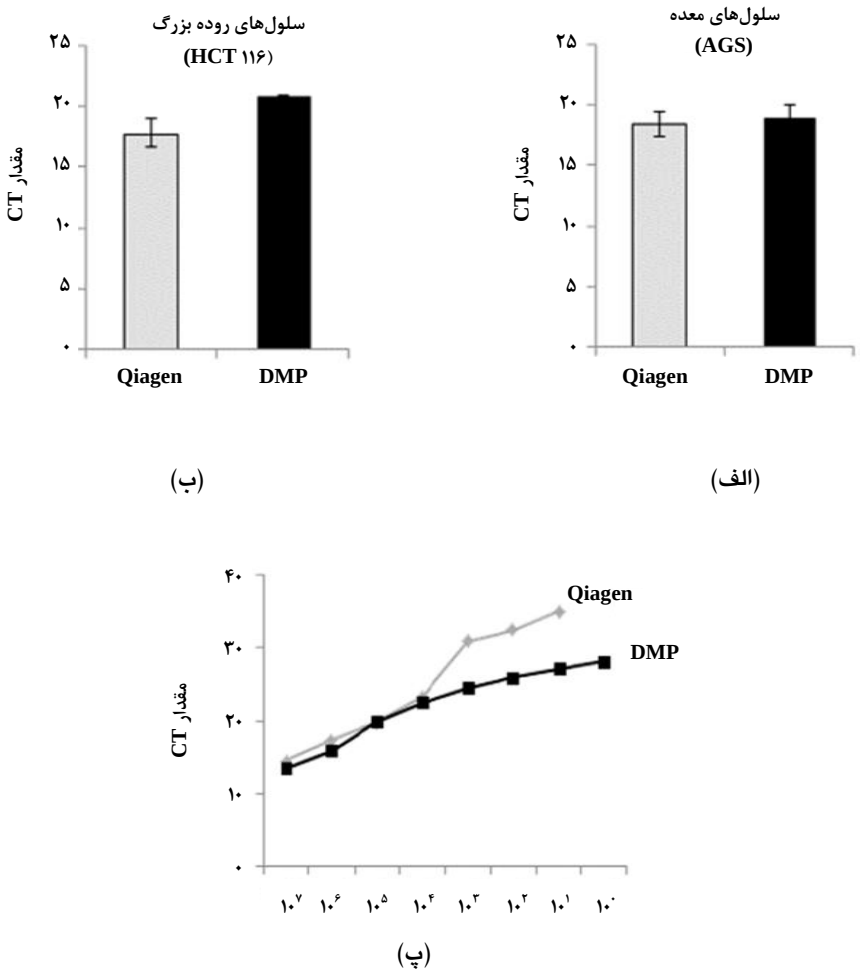
(ب)



(پ)

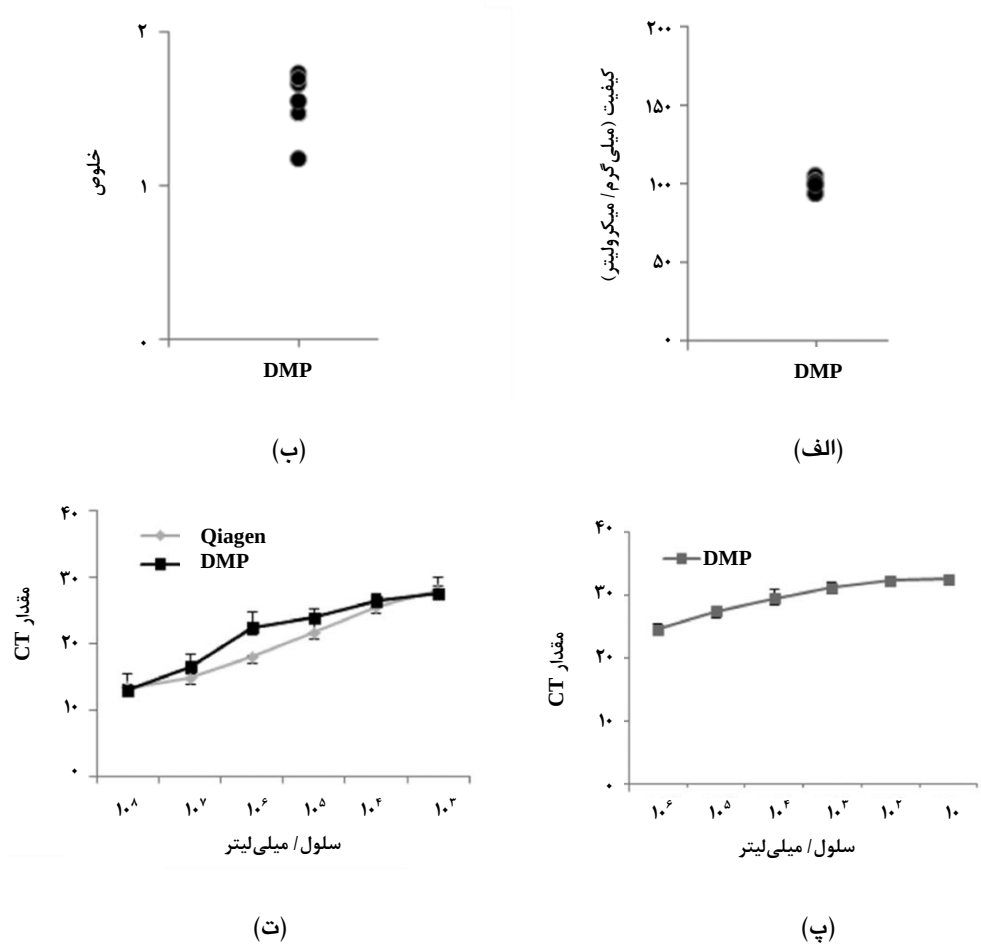
شکل ۹. کاربرد سامانهٔ دی‌ام‌پی برای استخراج آران‌ای بارده‌های سلولی سرطان (الف)ظرفیت سامانه دی‌ام‌پی با (HCT116 ردهٔ سلولی سرطان رودهٔ بزرگ) در غلظت‌های مختلف از $۱۰^{۱} \times ۱$ تا $۱۰^{۵} \times ۱$ سلول. مقدار آران‌ای استخراج‌شده از سلول‌ها با استفاده از نانو قطره اندازه‌گیری شد. همهٔ نوارهای خطا نشان‌دهندهٔ انحراف استاندارد از میانگین بر اساس حداقل سه آزمایش مستقل است. (ب) تجزیه و تحلیل پایین‌دست برای آزمایش ژنتیکی آران‌ای با ژن S۱۸ با استفاده از آران‌ای‌های استخراج‌شده از سلول‌های سرطانی با سامانهٔ دی‌ام‌پی با استفاده از RTPCR نقطهٔ پایانی تک‌مرحله انجام شد. (L: نشانگر اندازهٔ دی‌ان‌ای ؛ ۱: آران‌ای از سلول‌های $۱۰^{۱} \times ۱$ ؛ ۲: آران‌ای از سلول‌های $۱۰^{۲} \times ۱$؛ ۳: آران‌ای از سلول‌های $۱۰^{۳} \times ۱$ ؛ ۴: آران‌ای از سلول‌های $۱۰^{۴} \times ۱$ ؛ ۵: آران‌ای از $۱۰^{۵} \times ۱$ سلول‌ها (پ) تجزیه و تحلیل پایین‌دست برای آزمایش ژنتیکی آران‌ای با ژن S۱۸، با استفاده از آران‌ای‌های استخراج‌شده از سلول‌های سرطانی HCT116 در غلظت‌های مختلف از سلول‌های $۱۰^{۱} \times ۱$ تا $۱۰^{۶} \times ۱$ یا با دی‌ام‌پی (سیاه) یا کیاژن (خاکستری) انجام شد. qRT-PCR یک‌مرحله‌ای. این آزمایش برای هر غلظت سه بار تکرار شد و برای هر غلظت فقط یک منحنی نشان داده شده است [۲۴].

دی‌ان‌ای استخراج‌شده از سامانهٔ دی‌ام‌پی با مقایسهٔ حاصل از کیت کیاژن در سلول‌های AGS و HCT116 تقویت‌شده است (شکل (۱۰)- الف و ب). علاوه بر این، آن‌ها سامانهٔ دی‌ام‌پی را با محلول‌های نمونهٔ حاوی سلول‌های HCT116 در غلظت‌های مختلف از ۱×۱۰^{۱} تا ۱×۱۰^{۶} سلول در حجم ۱۰۰ میکرولیتر ارزیابی کردند. در زمان واقعی پی‌سی‌آر، مشاهده کردند که دی‌ان‌ای استخراج‌شده از سامانهٔ دی‌ام‌پی (شکل (۱۱)- پ) بسته به رقت سریالی سلول‌ها به‌تدریج تقویت می‌شود. علاوه بر این، برای آزمایش انعطاف‌پذیری سامانه در منابع مختلف نمونه، آن‌ها دی‌ان‌ای از دو باکتری (اشریشیا کولی و بروسلا[1]) را از ۱۰۰ میکرو لیتر از مایع مغذی متوسط حاوی ۱×۱۰^{۰} تا ۱×۱۰^{۸} CFU/ml[2] استخراج کردند. آن ها مشاهده کردند که ژن اشریشیا کولی با استفاده از دی‌ان‌ای‌های استخراج‌شده از نمونه‌های رقیق‌شده سریالی به‌شدت تقویت می‌شود. بازده تقویت برای دی‌ان‌ای استخراج‌شده از سامانهٔ دی‌ام‌پی و کیت کیاژن قابل مقایسه است (شکل (۱۱)- ت). کارایی تقویت دی‌ان‌ای استخراج‌شده از تختگاه دی‌ام‌پی در غلظت کم بروسلا نسبت به کیت کیاژن برتر است (شکل (۱۰)- پ). همچنین می‌تواند سرطان را از دی‌ان‌ای‌های استخراج‌شده از راه سامانه تشخیص دهد[۲۴,۲۵].



شکل ۱۰. کاربرد سامانهٔ دی‌ام‌پی برای استخراج دی‌ان‌ای باردهای سلولی سرطان. (الف- ب) ظرفیت سامانهٔ دی‌ام‌پی با (الف) (ردهٔ سلولی سرطان معده AGS) و (ب) (ردهٔ سلولی سرطان رودهٔ بزرگ HCT116) برای استخراج دی‌ان‌ای با استفاده از زمان واقعی پی‌سی‌آر کیاژن (سفید)، دی‌ام‌پی: (سیاه). همهٔ نوارهای خطا نشان‌دهندهٔ انحراف استاندارد از میانگین بر اساس حداقل ۳ آزمایش مستقل است. (پ) ظرفیت سامانهٔ دی‌ام‌پی با بروسلا در غلظت‌های مختلف از تشکیل‌دهندهٔ کلونی ۱×۱۰^{۰} تا ۱×۱۰^{۷} با استفاده از زمان واقعی پی‌سی‌آر (کیاژن سفید، دی‌ام‌پی سیاه)[۲۴].

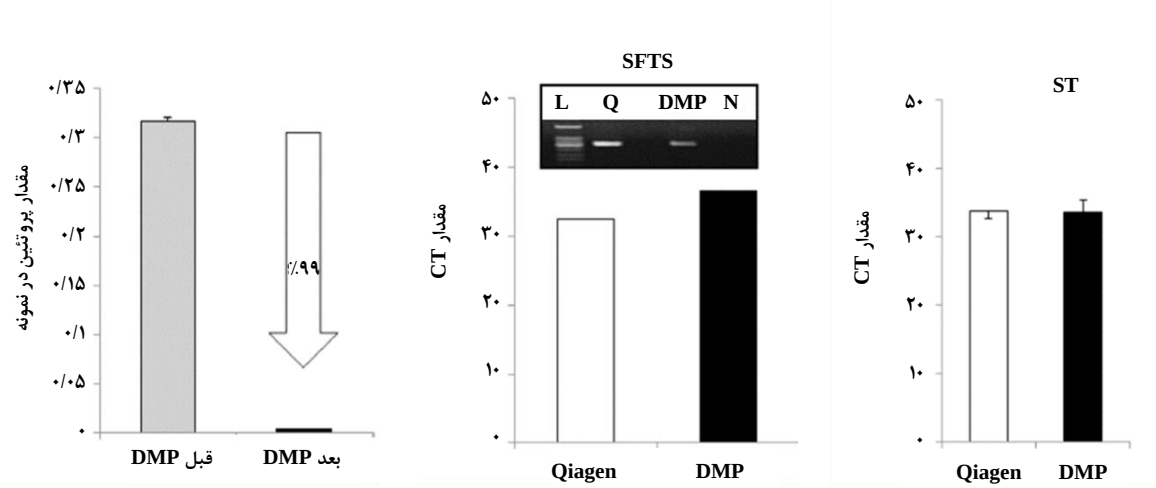
1. Brucella
2. Colony Formation Units



شکل ۱۱. کاربرد سامانهٔ دی‌ام‌پی برای استخراج دی‌ان‌ای باردهای سلولی سرطان. (الف، ب) ظرفیت سامانهٔ دی‌ام‌پی با سلول‌های MCF7 (سلول سلولی سرطان پستان) برای استخراج دی‌ان‌ای مقدار (الف) و خلوص دی‌ان‌ای (ب) استخراج‌شده با استفاده از نانو قطره اندازه‌گیری شد. (پ) ظرفیت سامانهٔ دی‌ام‌پی با سلول‌های HCT116 در غلظت‌های مختلف از سلول‌های $۱۰^{۱} \times ۱$ تا $۱۰^{۶} \times ۱$ با استفاده از پی‌سی‌آر در زمان واقعی. همه نوارهای خطا نشان‌دهندهٔ انحراف استاندارد از میانگین بر اساس حداقل سه آزمایش مستقل است. (ت) ظرفیت سامانهٔ دی‌ام‌پی با اشریشیا کولی در غلظت‌های مختلف از کلسیم‌های تشکیل‌دهندهٔ مستعمره از $۱۰^{۳} \times ۱$ تا $۱۰^{۸} \times ۱$ با استفاده از پی‌سی‌آر در زمان واقعی. (کیاژن سفید، دی‌ام‌پی سیاه). همهٔ نوارهای خطا نشان‌دهندهٔ انحراف استاندارد از میانگین بر اساس حداقل سه آزمایش مستقل است[۲۴].

در این مطالعه از نمونه‌های پلاسمائی خون از ST[1] و SFTS[2] به‌عنوان نمونه‌های بالینی استفاده‌شده است. دی‌ان‌ای باکتریایی نیز از اورینتیا تی‌ساتساگاموشی[3] در پلاسمای خون بیماران ST با استفاده از کیت کیاژن و دی‌ام پی استخراج شد. کارایی تقویت یک‌مرحله‌ای qRT-PCR برای استخراج دی‌ان‌ای باکتریایی با سامانه قابل مقایسه با کیت کیاژن است (شکل (۱۲)- الف). آران‌ای ویروسی از ویروس هوایانگشان[4] در پلاسمای خون بیماران SFTS با استفاده از کیت کیاژن و سامانهٔ دی‌ام‌پی استخراج شد. کارایی تقویت RT-PCR با روش دی‌ام‌پی نسبت به کیت کیاژن ۳-۲ سیکل طولانی‌تر بود (شکل (۱۲)- ب). این ممکن است با مطالعهٔ بالینی بیشتر بهینه شود، با این وجود؛ این سامانه می‌تواند به طور کامل پروتئین‌ها (۹۹٪) را از بین ببرد (شکل (۱۲)- پ)، که می‌تواند با پیوند کووالانسی بین گروه‌های آمینواسید نوکلئیک و دی‌ام‌پی، در نمونه‌های بالینی، اختلال ایجاد کند. بنابراین، این سامانه می‌تواند برای استخراج اسید نوکلئیک‌ها (آران‌ای و دی‌ان‌ای) از نمونه‌های بالینی مفید باشد[۲۴].

1. Scrub Typhus
2. Thrombocytopenia Syndrome
3. Orientia Tsutsugamushi
4. Huaiyangshan



(الف) (ب) (پ)

شکل ۱۲. اعتبارسنجی سامانهٔ دی‌ام‌پی در نمونه‌های بالینی. (الف) استخراج دی‌ان‌ای باکتریایی از اورینتیا تی‌ساتساگاموشی در پلاسمای خون بیمار مبتلا به تاول اسکراب (ST) همهٔ نوارهای خطا نشان‌دهندهٔ انحراف استاندارد از میانگین بر اساس حداقل سه آزمایش مستقل است. (ب) استخراج آران‌ای ویروسی از ویروس هوایانگشان در پلاسمای خونریزی تب شدید با سندرم ترومبوسیتوپنی (SFTS) بیمار. رنگ‌ها کیت (کیاژن سفید) و سنجش (دی‌ام‌پی سیاه) را نشان می‌دهند. (پ) مقدار پروتئین در نمونه‌های پلاسما قبل و بعد از دی‌ام‌پی پروتئین‌ها را می‌توان با شستن مرحله با استفاده از سامانهٔ دی‌ام‌پی به‌طور کامل (۹۹٪) از بین برد[۲۴].

برخلاف روش دی‌تی‌اس که در مقالات گذشته بیان شد (جدول (۳))، سامانهٔ توسعه‌یافته گزینهٔ مقرون‌به‌صرفهٔ پردازش نمونه را برای استخراج اسید نوکلئیک از نمونه های بالینی فراهم می‌کند و نیاز به ابزار آزمایشی بزرگ (یعنی سانتریفیوژها، گرداب‌ها و دستگاه‌های برقی) را رفع می‌کند و پیش‌آماده‌سازی (یعنی پوشش، اتصال) پرزحمت است. سامانهٔ دی‌ام‌پی همچنین یک جایگزین بدون ساختارشکن را ارائه می‌کند که می‌تواند نیاز به مهارکننده ها و حلال‌های پی‌سی‌آر را کاهش دهد و باعث انجام یکپارچه‌سازی ساده با سایر روش‌های تشخیص، که برای ایجاد یک سامانهٔ قابل‌حمل مفید است، شود. سرانجام، کیفیت و کمیت اسیدهای نوکلئیک استخراج‌شده از سامانه برای استفاده در تجزیه و تحلیل پایین‌دست از منابع مختلف نمونه (سلول‌های سرطانی، باکتری‌ها و ویروس‌های موجود از پلاسمای خون) کافی است[۲۴،۲۵].

جدول ۳. مقایسهٔ سامانهٔ دی‌ام‌پی و دی‌تی‌اس[1] [۲۴،۲۵].

		دی‌ام‌پی (رایج)	دی‌تی‌اس
نوعی از اسید نوکلئیک‌ها	دی‌ان‌ای	•	•
	(جهش‌های تک‌نقطه‌ای)		×
نوعی از منابع نمونه	آران‌ای	•	×
	سلول‌های سرطانی	•	•
	سلول‌های باکترایی	•	•
	آران‌ای ویروسی از نمونهٔ بالینی	•	×
	دی‌ان‌ای باکتریای از نمونهٔ بالینی	•	×

1. Dimethyl Adipimidate/ Thin-Film-Based Sample

در سال ۱۹۹۹، کریستل و همکاران از یک دستگاه در ابعاد میکرو سیلیکونی حاوی پشتیبان‌ها به شکلی استفاده کردند که مساحت۳/۵ میلی‌متر مربع را به دست آورد؛ بنابراین یک پیشرفت ۱۰ برابر در مساحت سطح موجود برای جذب دی‌ان‌ای در مقایسه با یک کانال استاندارد فراهم کرد[۲۶]. آن‌ها با استفاده از ساختارشکن شیمیایی استاندارد، ظرفیت اتصال ۱۲نانوگرم دی‌ان‌ای λ- فاژ پلاسمید خالص را، با کارایی استخراج تقریباً ۵۰٪ گزارش کردند. اگرچه هنگام استفاده از یک نمونهٔ دی‌ان‌ای تمیز بسیار چشمگیر نیست؛ اما نخستین میکروفلوئید را بر پایهٔ استخراج فاز جامد از نوکلئیک اسیدها نشان می‌دهد. به همین ترتیب، کدی و همکاران با استفاده از میکرو آرایهٔ پشتیبان‌های مربعی با یک لایهٔ دی‌اکسید سیلیکون در یک کانال میکروفلوئیدیکی سیلیکون یک حجم در ابعاد ماکرو از ۲۵۰ میکرولیتر لازم بود که به‌طور مؤثری دی‌ان‌ای را از پشتیبان‌ها جدا کند و امکان ادغام با دیگر فرایندهای بر پایه میکروفلوئیدیک را محدود کند. بهبود کم دی‌ان‌ای (کمتر از ۲۰٪) با ساختار پشتیبان به‌وسیلهٔ هیندسون[1] و همکاران نیز مشاهده شد؛ اگرچه مسائل مربوط به هزینه، کارایی و سازگاری شیمیایی هنوز تعریف می‌شود، ستون‌ها توانایی تولید مجدد را دارند و به‌طور بالقوه می‌توانند مقیاس ابعاد میکروخالص‌سازی قوی فاز جامد نوکلئیک‌اسید را فعال کنند. نوع جدیدی از ساختارهای با نسبت بالا که قادر به ایجاد مساحت سطح بالاتری برای ضبط نوکلئیک‌اسید هستند، احتمالاً بیشتر ناشی از روش‌های ساخت نامتعارف بر روی بسترهایی غیر از شیشه و سیلیکون خواهد بود. هنگامی‌که الکتروپلاتینگ و لیتوگرافی استفاده می‌شود، ساخت دقیق سازه‌های پیچیده با S/V بالا در مواد بسپاری امکان‌پذیر است. بیشترین استفاده از ساپورت‌های جامد برای استخراج فاز جامد از نوکلئیک اسید در میکروچیپ شیشه‌ای، دانه‌های سیلیکا یا ذره‌ای است که برای ایجاد ستون‌های پرشده، ستون‌های متشکل از سل-ژل، سیلیکای متخلخل و ساپورت‌های ترکیبی مهرهٔ سیلیکا/ سل- ژل استفاده می‌شود. این مراحل به‌طور معمول بعد از دستگاه، ایجاد یا ساخته می‌شوند و به منبع فشار خارجی متکی هستند تا معرف‌های لازم برای تصفیه را تحویل دهند. این نخستین استفاده از رزین‌های سیلیس برای استخراج مستقیم دی‌ان‌ای از یک نمونهٔ زیست‌شناختی در قالب کوچک بود. با استخراج مستقیم دی‌ان‌ای از گلبول‌های سفید، کارایی ۷۰٪، حاصل شد وکمتر از ۸۰٪ پروتئین‌های داخل سلولی حذف شدند - امکان اختلاط فناوری ستونی مبتنی بر سیلیکا در یک سامانهٔ میکروفلوئیدی برای تصفیهٔ دی‌ان‌ای از طیف گسترده‌ای از گونه‌های زیست‌شناختی (به‌عنوان‌مثال: گلبول‌های سفید، سلول‌های کشت‌شده، خون کامل) مشخص بود. وانگ[2] و همکاران این فناوری را به میکروچیپ منتقل کردند و انواع ماتریس سیلیکا و مهرهٔ سیلیکا/ سل- ژل را برای تصفیهٔ دی‌ان‌ای ارزیابی کردند[۲۷]. با این حال، بی‌حرکتی ذرات سیلیس در میکروکانال‌ها مشکل‌ساز است. این مسائل را می‌توان با بر موانع ساختار ساخته‌شده در طول مرحلهٔ حک‌کردن شیشه‌ای با یا بدون فرایند سل-ژل برای بی‌حرکت‌کردن دانه‌های سیلیس برطرف کرد [۲۱].

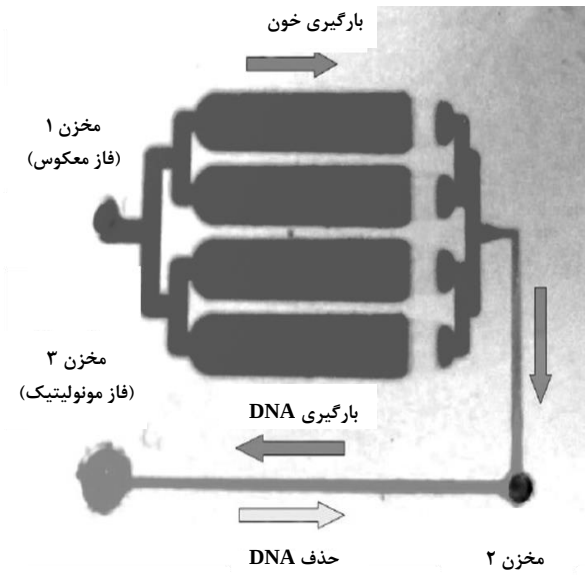
سل ژل یک آویزش کلوئیدی است که می‌تواند به‌صورت اسیدی یا پایه، کاتالیز شود تا یک مادهٔ جامد را در فرایندی که شامل انتقال محلول از یک مایع ("سل" کلوئیدی) به یک مرحلهٔ جامد ("ژل") باشد، تشکیل شود. فازهای سل- ژل برای خالص‌سازی دی‌ان‌ای به‌تنهایی و در ترکیب با مهره‌های سیلیکا استفاده شده است، که در آن مهره‌های پرشده درون یک کانال و سپس با استفاده از سل- ژل بی‌حرکت می‌شوند. این روش را بریدمور[3] و همکاران به کار بردند که یک سل-ژل بر پایهٔ TEOS[4] را در کانال مستقیمی برای بی‌حرکت کردن (ثابت نگه‌داشتن) مهره‌های سیلیکا ایجاد کردند. در مقایسه با ستون‌های پرشدهٔ سیلیکا، ترکیبی از مهره‌های سیلیکا/سل- ژل تمایل دارد با گذشت زمان پایدارتر باشد، به همین دلیل خود را به بهبود تکثیر نسبت به استخراج‌های همانند تبدیل می‌کند. در شرایط بارگذاری بهینه‌شده، استخراج میکروچیپ سریع بود (کمتر از ۱۵ دقیقه) و دی‌ان‌ای قابل تقویت پی‌سی‌آر را از انواع ماتریس‌های زیست‌شناختی پیچیده، ازجمله کشت سالمونلا تیفی‌موریوم[5] و خون کامل به دست آوردند. علاوه بر این، تصفیهٔ ابزار در ابعاد میکرو از اسید نوکلئیک‌ها از مایع منی در زمینهٔ تجزیه و تحلیل شواهد تجاوز جنسی نشان داده شد، درنتیجه این روش به‌عنوان مؤثری برای تصفیه با کیفیت بالا از دی‌ان‌ای از انواع منابع، کاربرد دارد. اما وولف و همکاران دریافتند که سل ژل‌ها به‌تنهایی کارایی خوبی برای

1. Hindson

2. Wang
3. Breadmore
4. Tetra Ethoxyortho Silicate
5. Salmonella Typhimurium

استخراج نوکلئیک اسیدها ندارند؛ این مشکل را می‌توان به دشواری در به‌دست‌آوردن اندازهٔ منافذ سل- ژل قابل تکرار و تمایل به ایجاد شکاف بین ژل و دیوارهٔ کانال اشاره کرد[۲۸].

وو و همکاران این مشکل را با یک سل- ژل بر پایهٔ TEOS با پلی‌اتیلن گلیکول به‌عنوان پوروژن[1] برای فراهم‌آوردن سطح کافی سیلیکا برای اتصال دی‌ان‌ای و بهبود جریان محلول، دور زدند. استخراج کارامد دی‌ان‌ای از λ- فاژ (۷±۸۵٪) و دی‌ان‌ای ژنومیک‌انسان از خون کامل (۳±۶۸٪) با استفاده از این سامانه فاز جامد نه‌تنها سریع، بلکه معادل یا بهتر از سامانه‌های استخراج تجاری بود. با استفاده از یک سل- ژل بر پایهٔ TEOS برای استخراج دی‌ان‌ای از لیزات اشریشیا کولی، آن‌ها به‌ترتیب متوسط ریکاوری(۹±۷۷٪) و ۵±۷۰٪ با میکرو و نانو ذرات را به دست آوردند. با این حال، اگرچه دی‌ان‌ای خالص تقویت‌شده با پی‌سی‌آر بود، اما یک حجم بزرگ شست‌وشو تا ۶۰ میکرو لیتر لازم بود. این مسئله منجر به غلظت پایین دی‌ان‌ای در محلول شسته شده شد و ساخت رابط با سایر فرایندهای در ابعاد میکرو را دشوار کرد. به‌طورکلی، هنگامی‌که یکپارچه‌سازی آنلاین تصفیهٔ نوکلئیک اسیدها و پی‌سی‌آر در نظر گرفته می‌شود، یک محلول شسته‌شدهٔ تغلیظ شده دی‌ان‌ای مورد نظر است. این نیاز به کارایی استخراج بالا و حجم شست‌وشوی کم (کمتر از ۵ میکرو لیتر) دارد. چونگ و همکاران با استفاده از رویکردی که با پروتکل‌های استخراج فاز جامد معمولی متفاوت است، ضبط دی‌ان‌ای را از نمونه‌ای با یک جریان سیال دارای نوسان تکرارشونده و جریان بعدی نمونه بر روی فاز سیلیکا، افزایش دادند. این فرایند مشابه ZipTips تجاری است. امکانات جدیدی را برای قالب‌های در ابعاد میکرو فراهم کرده است. این مواد منافذی از نانو تا اندازهٔ میکرومتر در یک شبکهٔ به‌هم‌پیوستهٔ کانال ایجاد می‌کردند. به دلیل برتری‌های استفاده از یک سطح بزرگ، اندازهٔ منافذ قابل کنترل و انتقال جرم زیاد از ساختار متخلخل، اخیراً از مونولیت برای تصفیهٔ دی‌ان‌ای در یک لولهٔ موئینه استفاده شده است. مونولیت، تشکیل‌شده از یک تکپار از ۳- (تری‌متوکسیلال) پروپیل متاکریلات، پس از آن با TMOS پیوند زده شد، و درنتیجه افزایشی چشمگیر در تعداد محل‌های عملکردی برای اتصال دی‌ان‌ای به همراه داشت و بازده استخراج در محدودهٔ ۸۵٪ در یک لوله موئین به دست آمد. بر روی ۱ میکرولیتر مونولیت با ظرفیت حداقل ۱۰۰ نانوگرم، بار نمونهٔ خون کل انسان به‌دلیل اتصال آلاینده‌ها، مانند پروتئین‌ها، به کمتر از ۱۰۰ نانو لیتر محدود شده است؛ اما عملکرد کلی بیش از آن است که با استفاده از یک کیت استخراج دی‌ان‌ای تجاری به دست آمد. ازآنجایی که ظرفیت اتصال به تمایل پروتئین‌های خون برای اشغال محلول‌های اتصال دی‌ان‌ای محدود است، یک دستگاه در ابعاد میکرو دومرحله‌ای متشکل از یک ستون فاز معکوس برای ضبط پروتئین (مرحله ۱) به‌صورت سری با یک ستون یکپارچه برای استخراج دی‌ان‌ای (مرحله ۲) توسعه داده شد (شکل (۱۳)). دو مرحله، طراحی فاز دوگانه، امکان بارگذاری ۱۰ میکرولیتر از خون کامل بر روی یک مونولیت ۲۵ میکرولیتر را فراهم می‌کند، درنتیجه ظرفیت مونولیت را برای دی‌ان‌ای خونی تقریباً ۴۰۰ برابر می‌کند، که این یکی دیگر از افزایش ۵۰ برابر ظرفیت در بیشتر دستگاه در ابعاد میکرو است. کارایی کلی سامانه، که تقریباً ۸۰٪ پروتئین را از ۱۰ میکرولیتر بار خون در کل حفظ می‌کند[۲۱].



شکل ۱۳. میکرودستگاه دومرحله‌ای و دو فاز برای استخراج پروتئین یکپارچهٔ استخراج دی‌ان‌ای از ۱۰ میکرولیتر خون کل انسان. سهم از مخازن ۱ تا ۳ نشان می‌دهد که از مرحلهٔ ۱ (سبز) به مرحلهٔ ۲ (قرمز) جریان می‌یابد. شست‌وشوی دی‌ان‌ای در جهت معکوس از مخازن ۳ به ۲ انجام شد[۲۱].

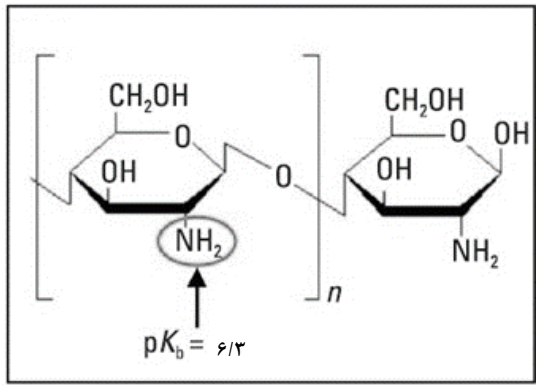
۱. برای ساخت منافذ در سازه‌های قالب استفاده‌شده برای مهندسی بافت استفاده می‌شود.

از یک مونولیت فازمعکوس متخلخل در یک دستگاه بسپاری برای بی‌حرکت‌کردن مهره‌های سیلیس استفاده کرد. با این حال، در این سامانه، مونولیت هیچ سهمی در استخراج دی‌ان‌ای ندارد و دسترسی محدود ذرات سیلیکا با بازدهی استخراج ۷۰٪ برای نخستین بار با یک ظرفیت بارگذاری کمتر از ۴۰ نانوگرم λ- فاژ دی‌ان‌ای عملکرد داشت. اگرچه کارایی استخراج پس از نخستین اجرا به‌سرعت کاهش می‌یابد، در درجهٔ اول به‌دلیل ساختار ناپایدار مونولیت و دانه‌ها این نگرانی در استفاده‌های یک‌بارمصرف دستگاه‌های قابل‌عرضه بی‌ربط می‌شود.

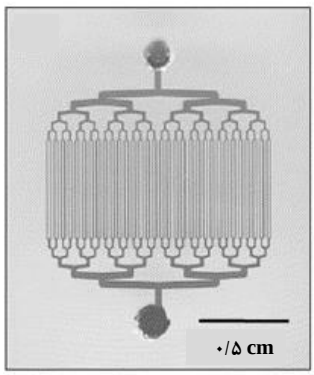
هاشیوکا و همکاران با استفاده از میکروساپورت‌ها با آلومینا؛ به‌عنوان روشی برای بی‌حرکت‌کردن نوکلئیک اسیدها در ستون‌های پوشیده‌شده در شرایط اسیدی (pH =۴/۷) به این روش بهبود بخشیدند. ضبط دی‌ان‌ای T_4 با برچسب شارندگی (۱۶۶ kbp) با استفاده از دریچه‌های هیدروژل وابسته به pH برای کنترل جریان در هنگام شست‌وشو در شرایط قلیایی (pH =۱۰/۱) نشان داده شد.

کائو و همکاران ضبط و انتشار دی‌ان‌ای ناشی از pH را با استفاده از یک فاز کیتوزان جدید برای یک سامانهٔ استخراج مطلقاً آبی کشف کردند. کیتوزان دارای یک گروه آمینه ۶/۳ pKb است که یک بار وابسته به pH را دارد که قابل اتصال به دی‌ان‌ای است (شکل (۱۴)- الف). دانه‌های پوشش داده‌شده با کیتوزان، نوکلئیک اسیدها را در pH=۵ اتصال می‌دهند و آن‌ها را در pH=۹ آزاد می‌کنند. سطح آب‌گریز، مشابه ژل‌های الکتروفورز و بسیاری از مراحل کروماتوگرافی، اتصال غیراختصاصی پروتئین‌ها را به‌طرز چشمگیری کاهش داد، بدین ترتیب پتانسیل افزایش ظرفیت بارگیری ۲۴۰۰ میکروگرم DNA/g دانه‌های روکش‌شده در مقابل ۲۰ میکروگرم DNA/g دانه‌های بدون پوشش فراهم می‌شود. حتی در صورت نبودن سطح بزرگ فراهم‌شده به‌وسیلهٔ مهره‌ها، میکروکانال‌های پوشش داده‌شده با کیتوزان استخراج مناسب و معقولی را فراهم می‌کنند (شکل (۱۴)- ب). به‌عنوان یک نتیجه از اتصال پروتئین کم به فاز میکروکانال، تصفیهٔ دی‌ان‌ای بسیار کارامد (تقریباً ۷۵٪) با حجم شست‌وشوی کوچک تا ۱/۵ میکرولیتر خون کامل می‌تواند به دست آید[۲۱].

سُپر[1] و همکارانش ساختار PPC[2] را در یک تراشهٔ میکروفلوئیدی مبتنی بر صفحات میکرو باهم ادغام کردند و نتایج امیدوارکننده‌ای در تصفیهٔ دی‌ان‌ای ژنومیک باکتریایی (gدی‌ان‌ای) از خون کامل و آران‌ای کلی[3] اشریشیا کولی در بافر نشان دادند. ظرفیت بالایی از (۹۳±۲۰۶) نانوگرم/ gدی‌ان‌ای از اشریشیا کولی در هر بستر و (۸۱±۱۶۵) نانوگرم آران‌ای کلی گزارش شد. با این حال، تغییرات بهره‌وری تصفیه در بین منابع (۲۴±۶۳٪g دی‌ان‌ای و ۱۵±۷۳٪ برای آران‌ای کلی)، موردتوجه قرار گرفت؛ به‌احتمال قوی به‌دلیل تغییرات سرعت جریان در مرحلهٔ شست‌وشو بیشتر (۸۳٪) دی‌ان‌ای استخراج‌شده در ۸ میکرولیتر بافر شست‌وشو، یک حجم شست‌وشو، کمی بزرگ‌تر از میکرودستگاه دومرحله‌ای دو فاز شسته شد. اگرچه این دستگاه به تصفیهٔ gدی‌ان‌ای انسانی که بسیار بزرگ‌تر از gدی‌ان ای باکتریایی است نپرداخته است، اما این کار پتانسیل این دستگاه‌ها را برای پذیرش نمونه‌های بالینی واقعی نشان داده است[۲۹].



(الف)



(ب)

شکل ۱۴. (الف) ساختار کیتوزان. (ب) تصویر از میکروچیپ کانال باز که در استخراج استفاده می‌شود[۲۱].

1. Soper
2. Photoactivated Polycarbonate
3. tRNA

درنتیجه، ظرفیت کارایی استخراج، حجم شست وشوی کم، حداقل آلودگی و انعطاف پذیری حجم نمونهٔ ورودی برای توسعهٔ هر سامانهٔ تصفیه برای کاربردهای بالینی و پزشکی قانونی ضروری است، درحالی‌که انگیزهٔ چنین الزاماتی متفاوت است. با این حال، با هر نمونه انتقال فناوری تحلیلی، سرعت تجزیه و تحلیل و توانمندی مسائل اساسی است در جدول (۴) به بررسی کلی در مورد استخراج دی‌ان‌ای و امکان استفاده از سامانه‌های میکروفلوئیدی پرداخته شده است[۳۰].

جدول ۴. مقایسهٔ روش‌های استخراج اسید نوکلئیک در متن با جوانب مثبت / منفی و اینکه آیا آن‌ها با قالب‌های میکروچیپ سازگار شده‌اند یا خیر[۳۰].

روش	سازگار با میکروفلوئیدیک؟
سزیم کلرید	خیر
فنل- کلروفرم	خیر
سامانه‌های تجاری Econo spin,Zygem	خیر
استخراج بر پایهٔ سیلیکا	بله
اتصال الکترواستاتیک (مانند کیتوزان،آلمینیوم‌اکسید)	بله
کروماتوگرافی تمایل ژل	بله

۹. نتیجه‌گیری

در بسیاری از زمینه‌های علمی به‌ویژه درزمینه‌های پزشکی و پزشکی قانونی نیاز به یک روش یک‌پارچه حساس، نیرومند و قابل اعتماد برای استخراج دی‌ان‌ای وجود دارد که سریع و به‌صرفه باشد. برای غلبه بر مسائلی با روش‌های شیمیایی مرسوم، استخراج مایع- مایع و همچنین فناوری استخراج فاز جامد، بر روی سامانهٔ مبتنی بر میکروفلوئیدیک برای استخراج دی‌ان‌ای روی تراشه، به‌طور گسترده ای بحث شده و جایگزینی مناسب است؛ این امر شامل استفاده از مواد زیست‌شناختی مناسب برای ساخت دستگاه‌های میکرو با کمک میکروفلوئید، ادغام فناوری استخراج فاز جامد در (پی‌دی‌ام‌اس) برای استخراج سریع اما پیچیدهٔ دی‌ان‌ای و همچنین اجرای سامانه‌های بر روی تراشه است، که فناوری میکروفلوئید و یک حسگر را برای کامل‌کردن خودکار و بسیار کارامد تشخیص دی‌ان‌ای تلفیق می‌کند.

اگرچه بیشتر سامانه های میکرو برای ارزیابی ظرفیت و بهره‌وری استخراج، نیاز به ارزیابی مؤلفه دارند؛ اما انگیزه و الزامات موجود در آن ارزیابی ممکن است برای کاربردهای مختلف متفاوت باشد؛ به عنوان مثال کارایی استخراج بالا در آزمایشگاه بالینی هنگام تشخیص حداقل بیماری باقی‌مانده و عوامل عفونی از اهمیت بالایی برخوردار است؛ زیرا نوکلئیک اسیدهای هدف اغلب در تعداد کپی‌های پایین موجود است. در آزمایشگاه های پزشکی قانونی، بازده استخراج بالا برای تجزیه و تحلیل نمونه‌های با تعداد کم‌نسخه (اثبات ردیابی) و نمونه‌های دی‌ان‌ای بسیار تخریب‌شده مهم است؛ زیرا موفقیت تحلیلی ذاتاً وابسته به تودهٔ نوکلئیک اسیدهای بازیابی شده است. علاوه بر این، حجم شست وشوی کم (که اساساً نوکلئیک اسیدهای تغلیظ شده هستند) برای تجزیه و تحلیل پایین‌دست مؤثرتر و نتایج باکیفیت بالاتر مهم هستند.

درنتیجه، ظرفیت، کارایی استخراج، حجم شست وشوی کم، حداقل آلودگی و انعطاف پذیری حجم نمونهٔ ورودی برای توسعهٔ هر سامانهٔ تصفیه برای کاربردهای بالینی و پزشکی قانونی ضروری است؛ درحالی‌که انگیزهٔ چنین الزاماتی متفاوت است. با این حال، با هر نمونه انتقال فناوری تحلیلی، سرعت تجزیه و تحلیل و توانمندی مسائل اساسی است. برای هر نوع کاربرد، سرعت پیشرفتهٔ امکان پردازش چند برابر و موازی نمونه ها را فراهم می‌کند و خودکارسازی باعث کاهش زمان تجزیه و تحلیل و میزان کار مفید با روش‌های معیارهایی می‌شود که در سامانه‌های آماده‌سازی نمونهٔ جدید تقاضا می‌شود و همچنان ادامه خواهند یافت.

در این کار از سامانه‌های میکروفلوئیدی دیجیتال (دی‌ام‌اف) برای استخراج و خالص‌سازی پروتئین از استانداردهای پروتئین و مخلوط ناهمگن نام‌برده شد؛ روش جدید دارای عملکرد قابل مقایسه‌ای نسبت به روش‌های معمولی، همراه با برتری‌های کاهش مصرف معرف و مصرف نمونه، نداشتن سانتریفیوژ و انتقال خودکار مایع است. این نتایج پتانسیل بزرگی را برای توسعهٔ فرایندهای یکپارچه و چندمرحله‌ای شامل کاهش نمونه، آلکیلاسیون و هضم نشان می‌دهد.

همچنین از سامانه‌های بر پایهٔ دی‌ام‌پی نام‌برده شد که باوجود تمـام توانمندی‌ها، این سامانه نیازمند بهینه‌سازی پروتکل سنجش با یـک گروه بالینی بزرگ به‌دلیل وضعیت غیرتجاری است. بنابراین، سـامانهٔ دی‌ام‌پی ممکن است باعث تغییر الگو در زمینـهٔ پـردازش نمونـه در تشخیص بالینی شود. ما معتقدیم که سامانهٔ دی‌ام‌پی می‌تواند بـرای پـردازش نمونـه در تحقیقـات علـوم زنـدگی، بسـیار مهـم و دارای کاربردهای بالینی باشد.

مراجع

[1] Xu, C., Xie, T., "Review of microfluidic liquid–liquid extractors", Industrial and Engineering Chemistry Research, 56: pp. 7593-7622, (2017).

[2] Artyukhin, A. B., Woo, Y. H., "DNA extraction method with improved efficiency and specificity using DNA methyltransferase and "click" chemistry", Analytical Biochemistry, 425: pp. 169-174, (2012).

[3] Dahm, R., "Friedrich Miescher and the discovery of DNA", Developmental biology, 278: pp. 274-288, (2005).

[4] Dahm, R., "Discovering DNA: Friedrich Miescher and the early years of nucleic acid research", Human genetics, 122: pp. 565-581, (2008).

[5] Sia, S. K., Kricka, L., "Microfluidics and point-of-care testing", Lab on a Chip, 8: pp. 1982-1983, (2008).

[6] Ruiz-Fuentes, J. L., Díaz, A., Entenza, A. E., Frion, Y., Suárez, O., Torres, P., de Armas, Y., Acosta, L., "Comparison of four DNA extraction methods for the detection of Mycobacterium leprae from Ziehl–Neelsen-stained microscopic slides", International journal of mycobacteriology, 4: pp. 284-289, (2015).

[7] Ayoib, A., Hashim, U., Gopinath, S. C. B., Arshad, M. K., "DNA extraction on bio-chip: history and preeminence over conventional and solid-phase extraction methods", Applied Microbiology and Biotechnology, 101: pp. 8077–8088, (2017).

[8] Farajzadeh, M. A., Feriduni, B., Mogaddam, M. R. A., "Development of counter current salting-out homogenous liquid–liquid extraction for isolation and preconcentration of some pesticides from aqueous samples", Analytica chimica acta, 885: pp. 122-131, (2015).

[9] Ruggiero, M. A., Gordon, D. P., Orrell, T. M., Bailly, N., Bourgoin, T., Brusca, R. C., Cavalier-Smith, T., Guiry, M. D., Kirk, P. M., "A higher level classification of all living organisms", PloS one, 10: p. e0119248, (2015).

[10] Athanasio, C. G., Chipman, J. K., Viant, M. R., Mirbahai, L., "Optimisation of DNA extraction from the crustacean Daphnia", PeerJ, 4: p. e2004, (2016).

[11] Mirnejad, R., Babavalian, H., Moghaddam, M. M., Khodi, S., Shakeri, F., "Rapid DNA extraction of bacterial genome using laundry detergents and assessment of the efficiency of DNA in downstream process using polymerase chain reaction", African Journal of Biotechnology, 11: pp. 173-178, (2012).

[12] Tran-Nguyen, L. T., Schneider, B., "Cesium Chloride-Bisbenzimide Gradients for Separation of Phytoplasma and Plant DNA". Phytoplasma, pp. 381-393: Springer, (2013).

[13] Van Reenen, A., de Jong, A. M., den Toonder, J. M., Prins, M. W., "Integrated lab-on-chip biosensing systems based on magnetic particle actuation–a comprehensive review", Lab on a Chip, 14: pp. 1966-1986, (2014).

[14] Dreyer, S., Kragl, U., "Ionic liquids for aqueous two-phase extraction and stabilization of enzymes", Biotechnology and bioengineering, 99: pp. 1416-1424, (2008).

[15] Vicente, F. A., Plazl, I., Ventura, S. P., Žnidaršič-Plazl, P., Groß, J., Kühlborn, J., Opatz, T., "Cutting-edge research for a greener sustainable future", Green Chem, 22: pp. 4381-4390, (2020).

[16] Deraney, R. N., Schneider, L., Tripathi, A., "Synergistic use of electroosmotic flow and magnetic forces for nucleic acid extraction", Analyst, 145: pp. 2412-2419, (2020)..

[17] Chen, X., Wang, J., Shen, H. Y., Su, X., Cao, Y., Li, T., Gan, N., "Microfluidic chip for multiplex detection of trace chemical contaminants based on magnetic encoded aptamer probes and multibranched DNA nanostructures as signal tags", ACS sensors, 4: pp. 2131-2139, (2019).

[18] Mikaeili, F., Kia, E., Sharbatkhori, M., Sharifdini, M., Jalalizand, N., Heidari, Z., Zarei, Z., Stensvold, C., Mirhendi, H., "Comparison of six simple methods for extracting ribosomal and mitochondrial DNA from Toxocara and Toxascaris nematodes", Experimental parasitology, 134: pp. 155-159, (2013).

[19] Tanyeri, M., Ranka, M., Sittipolkul, N., Schroeder, C. M., "A microfluidic-based hydrodynamic trap: design and implementation", Lab on a Chip, 11: pp. 1786-1794, (2011).

[20] Kye, H. G., Ahrberg, C. D., Park, B. S., Lee, J. M., Chung, B. G., "Separation, Purification, and Detection of cfDNA in a Microfluidic Device", BioChip Journal, 14: pp. 195-203, (2020).

[21] Wen, J., Legendre, L. A., Bienvenue, J. M., Landers, J. P., "Purification of nucleic acids in microfluidic devices". ACS Publications, (2008).

[22] Wu, J., Kodzius, R., Cao, W., Wen, W., "Extraction, amplification and detection of DNA in microfluidic chip-based assays", Microchimica Acta, 181: pp. 1611-1631, (2014).

[23] Oblath, E. A., Henley, W. H., Alarie, J. P., Ramsey, J. M., "A microfluidic chip integrating DNA extraction and real-time PCR for the detection of bacteria in saliva", Lab on a Chip, 13: pp. 1325-1332, (2013).

[24] Jin, C. E., Lee, T. Y., Koo, B., Choi, K. C., Chang, S., Park, S. Y., Kim, J. Y., Kim, S. H., Shin, Y., "Use of Dimethyl Pimelimidate with Microfluidic System for Nucleic Acids Extraction without Electricity", Analytical chemistry, 89: pp. 7502-7510, (2017).

[25] Tian, F., Liu, C., Lin, L., Chen, Q., Sun, J., "Microfluidic analysis of circulating tumor cells and tumor-derived extracellular vesicles", TrAC Trends in Analytical Chemistry, 117: pp. 128-145, (2019).

[26] Christel, L., Petersen, K., McMillan, W., Northrup, M., "Rapid, automated nucleic acid probe assays using silicon microstructures for nucleic acid concentration", J. Biomech Eng, 12: pp. 22-27 (1999).

[27] Wang, J., Pei, Y., Zhao, Y., Hu, Z., "Recovery of amino acids by imidazolium based ionic liquids from aqueous media", Green Chemistry, 7: pp. 196-202, (2005).

[28] Tetala, K. K., Vijayalakshmi, M., "A review on recent developments for biomolecule separation at analytical scale using microfluidic devices", Analytica chimica acta, 906: pp. 7-21, (2016).

[29] Witek, M. A., Hupert, M. L., Park, D. S. W., Fears, K., Murphy, M. C., Soper, S. A., "96-well polycarbonate-based microfluidic titer plate for high-throughput purification of DNA and RNA", Analytical chemistry, 80: pp. 3483-3491, (2008).

[30] Price, C. W., Leslie, D. C., Landers, J. P., "Nucleic acid extraction techniques and application to the microchip", Lab on a Chip, 9: pp. 2484-2494, (2009).