



Digital Droplet Polymerase Chain Reaction Device Using a Microfluidic Chip

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Bahrami A.¹ MSc,
Moghadas H.² PhD,
Saidi M.S. ^{*1} PhD

How to cite this article

Bahrami A, Moghadas H, Saidi M.S.
Digital Droplet Polymerase Chain
Reaction Device Using a Microflu-
idic Chip. Modares Mechanical En-
gineering. 2020;20(8):1943-1950.

ABSTRACT

Research on DNA is particularly important in the diagnosis, control, and treatment of many diseases, including cancer. Today, the use of digital droplet polymerase chain reaction (ddPCR) for different DNA tests has attracted much researchers' attention. A large number of micron-sized droplets are required to perform ddPCR. In the present study, a ddPCR system was designed, fabricated, and evaluated using a microfluidic chip. The system comprises a microfluidic chip for droplet generation and a thermal cycling device needed for PCR. The droplet generation in the microchip was simulated in 3D. The simulation results were validated. The average error is about 5% in the radius of the droplets. The constructed thermal cycling device controls the chip temperature with a precision of $\pm 1.5^\circ\text{C}$. The in-chip PCR process was successfully performed by applying 25 heat cycles. The fluorescent property was observed in most droplets that prove the thermal cycling device can provide the conditions for DNA proliferation in the laboratory. The images were processed, and different levels of fluorescent light were identified in the droplets. The coefficient of variation of the selected droplets is 2.5%, which gives a good accuracy compared to the acceptable amount for these types of systems (less than 8%). The results obtained from this fully native device can be used in many fields, including cancer detection, examination of malignant tissue, and evaluation of the success in tissue surgery.

Keywords Polymerase Chain Reaction; Microfluidic; DNA; Cancer

CITATION LINKS

[1] Digital droplet PCR for monitoring tissue-specific cell death using ... [2] A novel approach for tuberculosis diagnosis using exosomal DNA and ... [3] Diagnostic accuracy of droplet digital PCR (ddPCR) and amplification refractory mutation ... [4] Current and emerging applications of droplet digital PCR in ... [5] Evaluation of digital real-time PCR assay as a molecular diagnostic tool for ... [6] Free convective PCR: From principle study to commercial applications—a critical ... [7] Nanoliter scale PCR with TaqMan ... [8] Proceedings of the National Academy of ... [9] Quantitative and sensitive detection of rare mutations using droplet-based ... [10] Droplet-based digital PCR: Application in cancer ... [11] Plasma cell-free circulating tumor DNA (ctDNA) detection in longitudinally followed glioblastoma patients using TERT promoter mutation-specific droplet ... [12] Evaluation of the analytical and diagnostic performance of a digital droplet ... [13] A thermosetting oil for droplet-based real-time monitoring of digital PCR ... [14] Droplet digital PCR enabled by microfluidic impact printing for absolute gene ... [15] 1-Million droplet array with wide-field fluorescence imaging for ... [16] High-throughput quantitative polymerase chain reaction in picoliter ... [17] High-throughput droplet ... [18] Numerical and experimental study of a droplet-based PCR ... [19] Droplet-based microfluidics methods for detecting enzyme ... [20] A review of planar PIV systems and image processing tools for ... [21] Lab-on-chip technology: A review on design trends and future scope in biomedical ... [22] Expansion of patient-derived circulating tumor cells from liquid biopsies using ... [23] Application of microfluidic chips in separation ... [24] Integrated human organ-on-chip ... [25] A high-performance polydimethylsiloxane electrospun ... [26] Biological diagnosis based on microfluidics ... [27] Droplet microfluidics as a tool for the generation of granular ... [28] Droplet-based microfluidics for cell encapsulation ... [29] A modular microfluidic device ... [30] A low-cost portable dynamic droplet sensing system for ... [31] Gas-liquid droplet microfluidics under confined ... [32] Three-color crystal digital ... [33] Effects of magnetic nanoparticles on ... [34] Microfluidic systems for droplet generation in aqueous ... [35] Effect of intersection angle and wettability on droplet generation ... [36] Development of a flow focusing droplet generation microfluidic system based on ...

¹Department of Mechanical Engineering, Faculty of Mechanical Engineering, Sharif University of Technology, Tehran, Iran

²Department of Mechanical Engineering, Faculty of Gas and Petroleum, Yasouj University, Gachsaran, Iran

*Correspondence

Address: Sharif University of Technology, Azadi Street, Tehran, Iran.
Post Box: 11155-11365
Phone: +98 (21) 66165558
Fax: -
mssaidi@sharif.edu

Article History

Received: November 12, 2019
Accepted: May 3, 2020
ePublished: August 15, 2020

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز دیجیتال قطره‌ای با استفاده از تراشه میکروفلوئیدیکی

امین بهرامی MSc

گروه مهندسی مکانیک، دانشکده مهندسی مکانیک، دانشگاه صنعتی شریف، تهران، ایران

هاجر مقدس PhD

گروه مهندسی مکانیک، دانشکده نفت و گاز، دانشگاه یاسوج، گچساران، ایران

محمدسعید سعیدی* PhD

گروه مهندسی مکانیک، دانشکده مهندسی مکانیک، دانشگاه صنعتی شریف، تهران، ایران

چکیده

تحقیقات بر روی DNA در تشخیص، کنترل و درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله سرطان اهمیت ویژه‌ای دارد. امروزه استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز دیجیتال قطره‌ای (ddPCR) برای آزمایشات مختلف بر روی DNA توجه محققان زیادی را جلب کرده است. برای انجام ddPCR به تعداد زیادی قطره با ابعاد میکرونی نیاز است. در مطالعه حاضر، یک سیستم ddPCR با استفاده از تراشه میکروفلوئیدیکی طراحی، ساخته و ارزیابی شد. این سیستم شامل یک تراشه میکروفلوئیدیکی برای تولید قطره و یک دستگاه تامین‌کننده چرخه‌های حرارتی مورد نیاز در PCR است. تولید قطره در ریزتراشه به صورت سه‌بعدی شبیه‌سازی شد. نتایج شبیه‌سازی اعتبارسنجی شد. خطای متوسط در شعاع قطرات تولیدشده حدود ۵٪ است. دستگاه چرخه حرارتی ساخته‌شده، دمای تراشه را با دقت $\pm 1/5$ درجه سانتی‌گراد کنترل می‌کند. فرآیند PCR درون تراشه با اعمال ۲۵ چرخه حرارتی با موفقیت انجام شد. در اکثر قطرات خاصیت فلورسنت مشاهده شد که اثبات می‌کند دستگاه چرخه حرارتی شرایط تکثیر DNA را در آزمایشگاه به‌خوبی فراهم کرده است. تصاویر پردازش و سطوح مختلف نور فلورسنت در قطرات شناسایی شد. ضریب تغییرات قطرات انتخاب‌شده در برنامه پردازش، برابر با ۲/۵٪ است که در مقایسه با حالت قابل قبول برای این نوع سیستم‌ها (کمتر از ۸٪) دقت مطلوبی را ارائه می‌دهد. نتایج به‌دست‌آمده از این دستگاه کاملاً بومی، می‌تواند در زمینه‌های متعددی از جمله تشخیص سرطان، بررسی بافت سرطانی و ارزیابی موفقیت عمل بافت‌برداری استفاده شود.

کلیدواژه‌ها: واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، میکروفلوئیدیکی، DNA، سرطان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۸/۲۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۲/۱۴

*نویسنده مسئول: mssaidi@sharif.edu

مقدمه

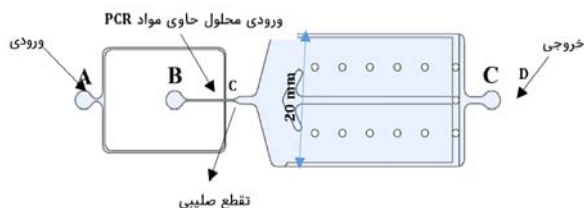
مطالعات بر روی جهش‌های نادر دئوکسی‌ریبوزنوکلئیک‌اسید (Deoxyribo Nucleic Acid; DNA) کاربرد فراوانی در تشخیص، کنترل و درمان بسیاری از بیماری‌های خاص مخصوصاً سرطان دارد^[1, 2]. تعداد DNAهای نادر اندک است، بنابراین دانشمندان همواره به دنبال راهی برای تکثیر آنها در شرایط آزمایشگاهی هستند^[3, 4]. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (Polymerase Chain Reaction; PCR)، فرآیندی است که طی آن توالی‌های مشخص DNA به‌وسیله آنزیم‌های خاص و تحت چرخه‌های حرارتی متعدد و پیاپی تکثیر می‌شوند^[5]. تاکنون

روش‌های متنوعی برای انجام PCR ابداع شده‌است^[6]. در تحقیقات پیشین، نمونه‌های رقیق‌شده DNA درون لوله‌های موبین^[7] و یا ظروف چاهک‌دار تحت چرخه‌های حرارتی قرار می‌گرفتند^[8]. برخی از توالی‌های نادر و کمیاب DNA به‌دلیل تعداد اندک و اندازه کوچک در لوله‌های موبین یا چاهک‌ها گم می‌شوند^[9, 10]. انجام PCR به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز دیجیتال قطره‌ای ddPCR امکان به دام‌انداختن و تشخیص توالی‌های کمیاب را فراهم می‌کند^[11].

در روش ddPCR نمونه اولیه محلول PCR به‌صورت سریالی و تا حد لازم رقیق می‌شود. سپس به تعداد زیادی قطره جدا از هم در یک سیال پایه دیگر (معمولاً روغن) تقسیم می‌شود. تعداد تقسیمات باید به‌گونه‌ای باشد که در هر قطره حداکثر یک نسخه از توالی مورد نظر قرار بگیرد. سپس چرخه‌های گرمایی لازم به آن اعمال می‌شود تا عمل تکثیر انجام شود. قطراتی که در آنها عمل تکثیر اتفاق بیفتد، خاصیت فلورسنت پیدا می‌کنند^[12]. با شمارش تعداد کل قطرات و تعداد قطراتی که خاصیت فلورسنت دارند، می‌توان تعداد کل DNAها در نمونه اولیه را تخمین زد. قطرات فضاهای کوچک آزمایشگاهی را برای تکثیر و رشد DNA فراهم می‌کنند، بنابراین مطلوب است که قطراتی با اندازه‌های یکسان تولید شوند^[13, 14]. مقدار قابل قبول ضریب تغییرات اندازه قطرات برای این نوع سیستم‌ها، کمتر از ۸٪ است^[15]. تولید تعداد زیادی قطره کوچک و هم‌اندازه از لحاظ فنی چالش‌های متعددی دارد^[16]. یکی از راه‌کارهای پیشنهادی به‌کارگیری فناوری میکروفلوئیدیکی بود که منجر به تحول چشمگیری در این زمینه شد^[18, 19].

با پیشرفت علم میکروفلوئیدیکی طی دهه‌های گذشته^[20]، فناوری آزمایشگاه بر روی تراشه پیشرفت‌های زیادی کرده است^[21]. کاربردهای گسترده و فراوانی از این فناوری جدید در زمینه‌های مختلف مانند جداسازی ذرات زیستی^[22, 23]، شبیه‌سازی اندام‌های زیستی^[24, 25]، فرآیندهای تشخیصی آزمایشگاهی^[26] و تولید قطرات میکرونی برای انجام مطالعات زیستی با به دام‌انداختن مولکول‌ها^[27] یا سلول‌ها^[28] ارایه شده است. ریزتراشه‌های متنوعی برای تولید قطره به روش لیتوگرافی^[19]، پرینت سه‌بعدی^[29] و روش‌های دیگر ساخته شده‌اند. هر کدام از این روش‌های ساخت، دقت و هزینه‌های متفاوتی دارند^[30]. به‌کاربردن هر کدام از این روش‌ها به امکانات آزمایشگاهی و دقت مورد نیاز در ساخت دستگاه بستگی دارد^[31]. ریزتراشه‌های دارای میکروکانال‌های موازی شرایط تولید تعداد زیادی قطره با فرکانس ۸۳۰۰ و حتی ۱۵۰۰۰ قطره بر ثانیه را فراهم کردند^[17]. اما با توجه به ابعاد کوچک تراشه‌های میکروفلوئیدیکی، ساخت میکروکانال‌های موازی و ایجاد جریان در آنها مساله‌ای چالشی است. به‌علاوه شرایط تولید قطرات هم‌اندازه را به‌خوبی فراهم نمی‌کند^[32]. برای تولید قطرات ریز با استفاده از تراشه‌های میکروفلوئیدیکی روش‌های متعددی ابداع شده است^[33, 34]. در بین آنها روش تمرکز جریان به‌دلیل

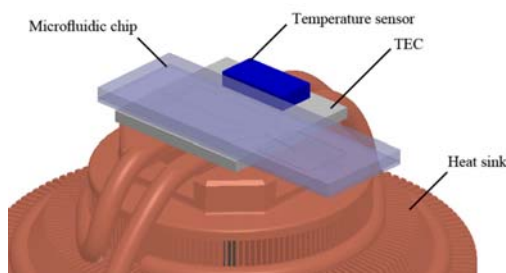
دبی جریان برای هر دو سیال برابر و در محدوده ۱۰ تا ۶۰ میکرولیتر بر دقیقه در نظر گرفته شد. برای تولید قطرات پایدار از ترکیب مواد فعال سطحی ABIL EM90 و Triton X-100 به ترتیب با ۷٪ و ۰.۳٪ حجمی/حجمی استفاده شد^[15]. تغییر فشار در مخزن حین انجام آزمایش منجر به تغییر ارتفاع مخزن و انباشتگی قطرات بر روی یکدیگر می‌شود. برای جلوگیری از تغییر ارتفاع تعدادی ستون در فاصله‌های مشخص در مخزن تعبیه شده است که با دایره‌های روشن در قسمت مخزن شکل ۱ قابل مشاهده است.



شکل ۱) هندسه کانال‌های موجود در تراشه.

سیستم چرخه حرارتی

در PCR، چرخه‌های حرارتی متعددی بر نمونه اعمال می‌شود. طی این چرخه‌های حرارتی لازم است که دمای تراشه با دقت و سرعت مناسب و معینی تغییر کند. بدین منظور، دستگاهی خاص طراحی و ساخته شد. شماتیک دستگاه چرخه حرارتی، نحوه قرارگیری حسگر دما و تراشه بر روی آن در شکل ۲ نشان داده شده است. در این دستگاه یک صفحه ترموالکتریک (۱۵۰ وات) به کار رفته است. جریان لازم، توسط یک درایور با سیگنال (Pulse-Width Modulation; PWM) فراهم می‌شود. انرژی مورد نیاز از یک منبع تغذیه ۱۲ ولت با حداکثر ظرفیت ۳۰ آمپر تامین می‌شود. برای افزایش راندمان، در سمت مخالف تراشه یک فن پردازشگر برای تهویه نصب شده است. کنترل سیستم به وسیله کد کنترلر PID (نوشته شده بر پردازنده مرکزی آردوینو UNO) و دماسنج دیجیتالی صورت می‌گیرد. دماسنج درون تراشه‌ای از جنس PDMS و ضخامتی کاملاً مشابه با تراشه اصلی قرار گرفته است. برای کاهش مقاومت حرارتی بین صفحه ترموالکتریک و فن از خمیر سیلیکونی استفاده شد. از پد سیلیکونی نیز برای کاهش مقاومت حرارتی و افزایش یکنواختی دما بین صفحه ترموالکتریک و ریزتراشه استفاده شد.



شکل ۲) شماتیک دستگاه چرخه حرارتی و نحوه قرارگیری تراشه و دماسنج روی آن

ساده بودن مکانیزم اجرایی، مورد توجه بیشتری قرار گرفته است^[35,36]. در مطالعه حاضر، برای انجام فرآیند ddPCR یک سیستم میکروفلوئیدیکی به همراه دستگاه چرخه حرارتی طراحی، ساخته و ارزیابی شد. فرآیند تولید قطره در تراشه با مدل سه‌بعدی شبیه‌سازی و اعتبارسنجی شد. در این ریزتراشه، قطرات به روش تمرکز جریان در یک مقطع صلیبی تولید می‌شوند. بدین ترتیب در این طرح، مشکل موازی‌سازی میکروکانال‌ها برطرف شده است. به علاوه طراحی مناسب مخزن امکان سنجش دقیق قطر قطرات را فراهم می‌کند. همچنین طراحی به گونه‌ای انجام شده که قالب تراشه به راحتی و با قیمتی اقتصادی از طریق CNC قابل تولید باشد. این تراشه به همراه سیستم چرخه گرمایی، قابلیت انجام فرآیند ddPCR جهت تکثیر ژن‌های مختلف و تعیین غلظت آنها را فراهم می‌کند. برای تحلیل تصاویر و محاسبات تعیین غلظت یا تعداد DNAها یک برنامه پردازش تصویر نوشته شد. این برنامه با دقت بسیار خوبی تصاویر میکروسکوپ نوری و همچنین تصاویر فلورسنتی را پردازش می‌کند. طراحی خاص این سیستم امکان قطره‌سازی، تکثیر و پردازش نتایج را با هزینه‌های بسیار پایین‌تر نسبت به نمونه‌های مشابه خارجی در داخل کشور فراهم کرده است.

مواد و روش‌ها

ساخت تراشه میکروفلوئیدیکی

طرح میکروکانال‌ها در نرم‌افزار سالی‌دورک طراحی شد. با استفاده از دستگاه CNC، قالب تراشه بر روی یک قطعه پلیمری از جنس (Poly Methyl Methacrylate; PMMA) ساخته شد. میکروکانال‌های ریزتراشه به روش قالب‌ریزی بر روی لایه‌ای از جنس (Poly Dimethyl Siloxane; PDMS) ایجاد شد. سپس با استفاده از اکسیژن پلاسما لایه PDMS بین دو لام شیشه‌ای باند شد. در انتها برای آب‌گریز کردن لایه PDMS، کل تراشه به مدت ۴ ساعت درون اجاق در دمای ۸۰ درجه قرار داده شد.

هندسه تراشه میکروفلوئیدیکی و تولید قطره

هندسه ریزتراشه براساس روش تمرکز جریان برای تولید قطره طراحی شده است. شماتیک ریزتراشه، ورودی محلول PCR، ورودی روغن، محل تلاقی محلول PCR و روغن و تشکیل قطرات در تقاطع صلیبی، مخزن تجمع قطرات تشکیل شده و همچنین خروجی در شکل ۱ نشان داده شده است. روغن از ورودی A و محلول حاوی مواد PCR (که مقدار زیادی از آن را آب تشکیل می‌دهد) از ورودی B وارد تراشه می‌شود. دو سیال در تقاطع صلیبی C (به عرض ۱۴۰ و ارتفاع ۱۶۰ میکرون) به یکدیگر می‌رسند. به واسطه تمرکز جریان در تقاطع صلیبی، قطرات حاوی مواد PCR در سیال پایه روغن تشکیل می‌شوند. قطرات تولید شده به سمت مخزن مستطیل شکل (با ابعاد ۲۰ در ۴۰ میلی‌متر) هدایت می‌شوند. پس از پر شدن مخزن، قطرات و روغن اضافه از خروجی D خارج می‌شوند. نسبت آب به روغن به صورت ۵۰٪ در نظر گرفته شد^[17].

$$p = \lambda e^{-\lambda} \quad (2)$$

که در این رابطه p نسبت تعداد قطرات دارای خاصیت فلورسنت به تعداد کل قطرات و λ نسبت تعداد نمونه‌های اولیه DNA به تعداد کل قطرات است.

برنامه نوشته شده همچنین به صورت خودکار قطرات با شدت فلورسنت بسیار اندک (قطرات حاوی تعداد اندک DNA) را با رنگ سبز و قطرات با شدت فلورسنت بالا (قطرات حاوی تعداد زیاد DNA) را با رنگ قرمز مشخص می‌کند.

مواد و پروتکل PCR

برای انجام فرآیند PCR از یک ژن میکروبی با طول ۳۲۵ جفت‌باز و پرایمرهایی با طول ۱۲ جفت‌باز استفاده شد که توالی ژن آن به صورت زیر است:

'5GACTGGTTCCAATTGACAAGCTTTTGGATTTTAACG
ACTTTTAACGACAACCTTGAGAAGATCAAAAAACAAC
TAATTATTCGAAACGAGGAATTCACGTGGCCAGCC
GGCCGTCTCGGATCGGTACCTCGAGCCGCGCGGCCG
CCAGCTTGGGCCCCAACAACAACTCATCTCAGAAGA
GGATCTGAATAGCGCCGTCGACCATCATCATCATCA
TCATTGAGTTTTAGCCTTAGACATGACTGTTCTCTCA
GTTCAAGTTGGGCACTTACGAGAAGACCGGTCTTGC
TAGATTCTAATCAAGAGGATGTCAGAATGCCATTTG
C3'

مواد لازم برای فرآیند PCR از مسترمیکس EvaGreen qPCR Mix Plus5 تهیه شد. جزییات ترکیبیات استفاده شده در آزمایش PCR در جدول ۱ ارائه شده است.

برای انجام فرآیند، محلول در ابتدا به مدت ۱۲ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار می‌گیرد. پس از آن چرخه‌های دمایی شامل ۱۵ ثانیه دمای ۹۵ درجه، ۲۰ ثانیه دمای ۶۰ درجه و ۲۰ ثانیه دمای ۷۲ درجه به آن اعمال می‌شود.

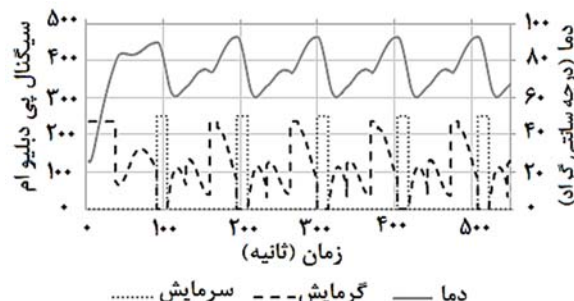
جدول ۱) ترکیبیات استفاده شده برای آزمایش PCR

نام ماده	مقدار	غلظت نهایی
EvaGreen qPCR Mix Plus5	۱۵ (μl)	۱
پرایمر رفت (10 5pmol/μl)	۱/۳ (μl)	۲۵۰ (nM)
پرایمر برگشت (10pmol/μl)	۱/۳ (μl)	۲۵۰ (nM)
نمونه DNA	۱/۳ (μl)	۱۰-۱ (ng/l)
BSA (۱۰۰ گرم بر لیتر)	۰/۸ (μl)	۱ (g/l)
H ₂ O PCR grade	۴۰ میکرولیتر	۴۰ میکرولیتر

شبیه‌سازی عددی

برای پیش‌بینی و امکان‌سنجی تولید قطره در ریزتراشه، فرآیند تشکیل قطره در تقاطع صلیبی ریزتراشه به صورت سه‌بعدی شبیه‌سازی شد. مدل کانال ریزتراشه با دو صفحه تقارن ایجاد شد. شبکه محاسباتی با شبکه مکعبی ساختار یافته ایجاد شد. در ورودی‌ها شرط مرزی سرعت و در خروجی شرط مرزی فشار در نظر گرفته شد. نقاط کنترلی و شرایط مرزی مدل شبیه‌سازی شده در شکل ۳ نشان داده شده است.

دستگاه چرخه حرارتی، دمای تراشه را با دقت $\pm 1/5$ درجه سانتی‌گراد و حداکثر سرعت ۳ درجه سانتی‌گراد بر ثانیه برای سرد کردن و ۲ درجه سانتی‌گراد بر ثانیه برای گرم کردن کنترل می‌کند. نمودار عملکرد دما و سیگنال‌های کنترلی دستگاه چرخه حرارتی در نمودار ۱ نشان داده شده است.



نمودار ۱) دمای اندازه‌گیری شده توسط سنسور دماسنج درون تراشه و سیگنال‌های کنترلی مربوط به آن

سیستم پردازش نوری و تحلیل داده‌ها

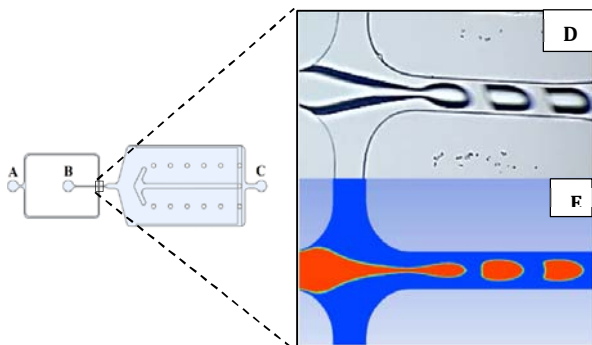
با استفاده از میکروسکوپ نوری معمولی، میکروسکوپ فلورسنت و یک دوربین ۱۳ مگاپیکسلی با نوردهی طولانی‌مدت از قطرات تصویربرداری شد. بررسی و تحلیل نتایج PCR براساس تصاویر گرفته شده از قطرات نزدیک به هم و بسیار کوچک، کاری سخت و پرتکرار است. انجام این کار به صورت چشمی و توسط انسان، خطای کار را به شدت بالا می‌برد. تجزیه و تحلیل نتایج به صورت خودکار، دقت و سرعت آنالیز داده‌ها را بالا می‌برد. برای تحلیل خودکار نتایج یک برنامه پردازش تصویر در محیط نرم‌افزار متلب نوشته شد. در این برنامه نخست محدوده مجاز قطر قطرات تعریف می‌شود. محاسبات PCR فقط بر روی قطراتی که اندازه آنها در محدوده مجاز است، انجام می‌شوند. به عبارت دیگر قطرات بزرگ‌تر و کوچک‌تر از اندازه مجاز از محاسبات حذف می‌شوند. در واقع قطرات فضای رشد و تکثیر DNA را فراهم می‌کنند. بنابراین منطقی است که فقط قطرات با اندازه‌های نسبتاً یکسان در نظر گرفته شوند. زیرا شرایط محیطی در قطرات بزرگ و کوچک با یکدیگر متفاوت است.

برنامه نوشته شده، حاشیه تصویر را اصلاح، قطرات با قطر برابر را انتخاب و ضریب تغییرات آنها را طبق رابطه زیر محاسبه می‌کند.

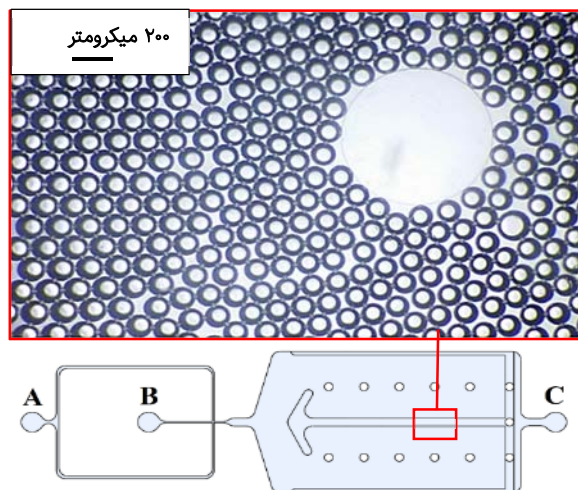
$$CV = \frac{\sigma}{\mu} \quad (1)$$

در این رابطه σ انحراف معیار اندازه قطرات و μ میانگین قطر قطرات است. داده‌هایی که ضریب تغییرات آنها در محدوده قابل قبول (کمتر از ۸٪) باشد، برای محاسبه غلظت DNA به کار می‌رود. هر چه عدد ضریب تغییرات کوچک‌تر باشد، اندازه قطرات به یکدیگر نزدیک‌تر و نتایج مستخرج شده معتبرتر هستند. غلظت اولیه DNA با استفاده از رابطه آماری پواسن که به صورت زیر ساده‌سازی شده برآورد می‌شود:

آزمایشگاه را نشان می‌دهد. در شرایط فوق در آزمایشگاه شعاع متوسط قطرات تولید شده در حدود ۷۵ میکرومتر است. در این حالت نتایج شبیه‌سازی و نتایج آزمایشگاهی با خطای ۵٪ تطابق خوبی دارند. عوامل متعددی از جمله خواص محلول PCR، خواص روغن، درجه خلوص و دیگر شرایط آزمایشگاهی در متفاوت بودن نتایج شبیه‌سازی با نتایج آزمایشگاهی تأثیرگذار هستند.



شکل ۴ تولید قطره در تراشه در دبی ۲۰ میکرولیتر بر دقیقه برای هر دو سیال روغن و آب؛ سمت چپ شماتیک ریز تراشه، سمت راست تصویر بالا، قطرات تولید شده در آزمایشگاه (D) و سمت راست تصویر پایین، قطرات شبیه‌سازی شده (E)

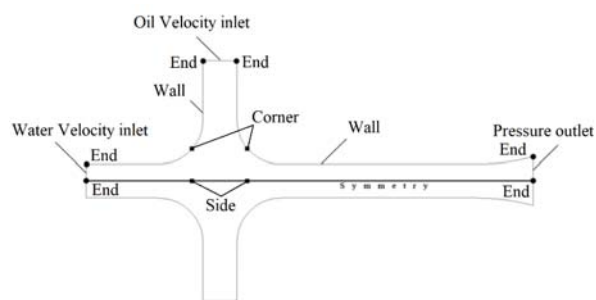


شکل ۵ نمونه قطرات ذخیره شده در مخزن تراشه در دبی ۲۰ میکرولیتر بر دقیقه برای هر دو سیال روغن و آب در دمای محیط. دایره سفید بزرگ ستون نگه‌دارنده مخزن تراشه و دایره کوچک‌تر قطرات ذخیره شده در مخزن هستند (قطر این قطرات به‌طور متوسط برابر با ۱۵۰ میکرون است)

نتایج به‌دست‌آمده از شبیه‌سازی نشان می‌دهد که مقدار کشش سطحی بین روغن و آب در اندازه قطرات تأثیر زیادی دارد. بنابراین با انتخاب مواد فعال سطحی مختلف که میزان کشش سطحی را تغییر می‌دهند، می‌توان قطرات با اندازه‌های مختلف را تولید کرد.

عملکرد تراشه در تولید و حفظ قطرات

تولید قطره در این تراشه با نسبت آب به روغن ۵۰٪ و دبی سیال در محدوده ۱۰ تا ۴۰ میکرولیتر بر دقیقه انجام شد. در این شرایط قطرات تولید شده شعاعی بین ۶۵ تا ۹۰ میکرومتر دارند. قطرات تولید شده در دبی ۲۰ میکرولیتر بر دقیقه برای هر دو سیال روغن و



شکل ۳ نقاط کنترل شبکه و شرایط مرزی در مدل شبیه‌سازی شده مقطع صلیبی تولید قطره

با توجه به اینکه عدد رینولدز بسیار کوچک‌تر از ۱ است، رژیم جریان به‌صورت آرام در نظر گرفته شد. در این شبیه‌سازی تولید و انتقال جرم بین فازها رخ نمی‌دهد. معادله میدان جریان برای سیال تراکم ناپذیر در محیط دوفازی، به‌صورت زیر در نظر گرفته شد:

$$\frac{1}{\rho_q} \left[\frac{\partial}{\partial t} (\alpha_q \rho_q) + \nabla \cdot (\alpha_q \rho_q \vec{v}_q) \right] = 0 \quad (1)$$

در این رابطه α نسبت حجمی سیال در سلول مورد نظر، ρ چگالی و $\vec{v}$ میدان سرعت سیال است. زیروند q نماینده ویژگی‌های سیال در حال حل و زیروند p مربوط به سیال دوم است. مقدار زیادی از محلول PCR را آب تشکیل می‌دهد. بنابراین برای شبیه‌سازی محلول PCR، مشخصات آب با چگالی ۹۹۸/۲ کیلوگرم بر متر مکعب در دمای محیط در نظر گرفته شد. چگالی روغن معدنی که به‌عنوان سیال بستر، قطرات PCR در آن تشکیل می‌شود، ۸۰۰ کیلوگرم بر متر مکعب است.

معادلات ناویر استوکس در رژیم آرام به‌همراه معادله حجم سیال (VOF) با استفاده از نرم‌افزار انسیس فلوئنت ۲۰۱۵ حل شد. برای ارتباط بین میدان سرعت و فشار از روش SIMPLE و برای حل میدان فشار از روش PRESTO استفاده شد. گام‌های زمانی براساس سرعت در بازه ۱۰^{-۶} تا ۱۰^{-۵} در نظر گرفته شد. استقلال حل از تعداد المان‌های شبکه محاسباتی به‌ازای تعداد المان ۱۳، ۲۴، ۳۴ و ۴۴ هزار بررسی شد. شبکه محاسباتی با ۲۴ هزار المان انتخاب شد. حل تا زمانی ادامه می‌یابد که سیستم به حالت کاملاً تناوبی برسد. معیار رسیدن به چنین حالتی کاهش ضریب تغییرات حجم قطرات تشکیل شده به زیر ۳٪ در نظر گرفته شد.

نتایج

شبیه‌سازی عددی

فرآیند تولید قطره در تراشه با یک مدل سه‌بعدی شبیه‌سازی شد. تصویر سمت راست پایین شکل ۴، قطرات شبیه‌سازی شده در مقطع صلیبی را نشان می‌دهد. نتایج شبیه‌سازی عددی پیش‌بینی می‌کند که در دبی ۲۰ میکرولیتر بر دقیقه برای آب و روغن، قطرات تولیدی شعاعی در حدود ۷۱ میکرومتر خواهند داشت. تصویر سمت راست بالای شکل ۵ قطرات تولید شده در مقطع صلیبی در

آب در دمای محیط در شکل ۵ نشان داده شده است. همان گونه که در این تصویر مشاهده می‌شود، قطرات نسبتاً هم‌اندازه هستند. در دبی ۲۰ میکرولیتر بر دقیقه متوسط شعاع قطرات ۷۵ میکرومتر است.

حداکثر فرکانس تولید قطره در این تراشه در جریان ۴۰ میکرولیتر بر دقیقه تقریباً فرکانس ۴۶۰ قطره بر ثانیه است. قطراتی که در فرکانس‌های بالا تولید می‌شوند، پایداری طولانی ندارد. در این تراشه تولید قطره با فرکانس حداکثر حدود ۲۳۰ قطره بر ثانیه از پایداری مناسبی برخوردار است. در این حالت تراشه در مدت حداکثر ۴۵ ثانیه کاملاً پر می‌شود زیرا ظرفیت مخزن آن حدود ۸ تا ۱۰ هزار قطره است.

نتایج آزمایشگاهی نشان می‌دهد که اندازه و پایداری قطرات تولیدی به دبی جریان و ترکیب ماده فعال سطحی انتخاب شده بستگی دارد. با افزایش دبی جریان که منجر به افزایش فرکانس تولید قطره می‌شود، ناپایداری قطرات افزایش می‌یابد. برای تولید قطرات پایدار با فرکانس بالا، لازم است که از مواد فعال سطحی با کیفیت‌تر و مرغوب‌تر استفاده شود. نتایج آزمایشگاهی همچنین نشان داد که در صورت عبور ناخالصی از تقاطع صلیبی، تولید قطره به سرعت دچار اختلال می‌شود. منابع ناخالصی‌ها ممکن است ناشی از حل‌نشدن مواد PCR، کیفیت پایین روغن (وجود ذرات ناخالصی در روغن) یا ذرات معلق در اتصالات سیستم یا کنده‌شدن قسمتی از جداره میکروکانال‌ها در اثر عبور جریان سیال باشد.

فرآیند PCR

پس از تولید قطرات و ذخیره آنها درون مخزن تراشه در دمای محیط، فرآیند PCR با اعمال ۲۵ چرخه حرارتی بر روی قطرات حاوی DNA انجام شد. تصویر قطرات پس از فرآیند PCR در نور معمولی و همچنین تحت فیلتر فلورسنت در شکل ۶ نشان داده شده است. همان گونه که در این تصویر مشاهده می‌شود، تمامی قطرات خاصیت فلورسنت پیدا کرده‌اند. وجود خاصیت فلورسنت در قطرات اثبات می‌کند که عملکرد دستگاه چرخه حرارتی مناسب بوده و توانسته است منجر به تکثیر DNA در قطرات درون تراشه در شرایط آزمایشگاهی شود.

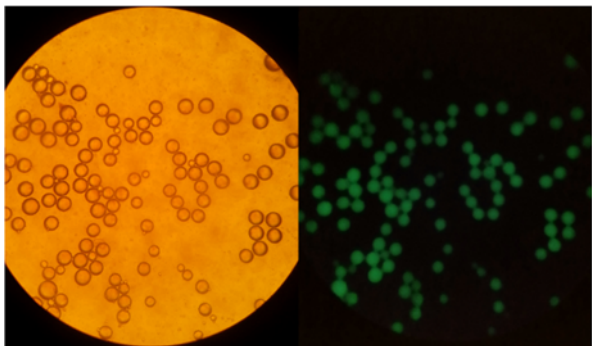
فرآیند PCR در محدوده دمایی نسبتاً بالایی انجام می‌شود. پایداری قطرات در دمای بالا یکی از مهم‌ترین چالش‌های این روش است. در شکل ۷ قطرات موجود در تراشه پس از قرارگرفتن در شش سیکل PCR نشان داده شده است. مشاهده می‌شود که با افزایش دما رنگ ترکیب به شکل محسوسی کدر می‌شود. علت آن جداسدن مواد فعال سطحی از جداره قطرات در اثر افزایش دما و نفوذ آنها به فضای داخل قطره و روغن است. استفاده از ترکیب مواد فعال سطحی مناسب‌تر و با کیفیت‌تر می‌تواند از چنین اتفاقی جلوگیری کند.

محدوده دلخواهی از قطرات به‌عنوان نمونه توسط میکروسکوپ نوری و میکروسکوپ فلورسنت تصویربرداری شدند که به‌ترتیب در شکل‌های ۸ و ۹ نشان داده شده است. پس از پردازش تصویر

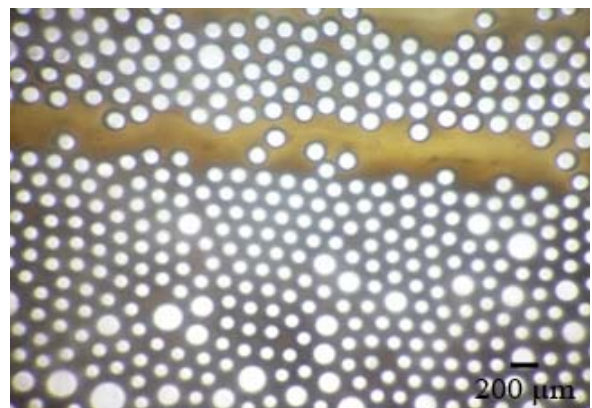
نمونه میکروسکوپ معمولی، ۸۵ قطره هم‌اندازه شناسایی و مرز آنها با رنگ سبز مشخص شد (شکل ۸). پردازش تصویر نمونه فلورسنتی نیز همان ۸۵ قطره هم‌اندازه را شناسایی کرده است (شکل ۹). برنامه دو عدد از این قطرات را با رنگ سبز و مابقی را به رنگ قرمز مشخص کرده است. قطرات سبزرنگ قطراتی هستند که شدت فلورسنت آنها بسیار اندک بوده است. این تصویر اثبات می‌کند که برنامه نوشته‌شده قابلیت تشخیص سطوح مختلف نور فلورسنت و در نتیجه تعیین غلظت DNA موجود در قطرات را دارد. هر چه تعداد DNAهای تکثیرشده بیشتر باشد، شدت نور فلورسنت بیشتری متصاعد می‌شود.

به‌علاوه بررسی شکل‌های ۸ و ۹ نشان می‌دهد که برنامه نوشته‌شده فقط قطرات در محدوده قطری تعریف‌شده را مجزا کرده است و قطرات بزرگ‌تر و کوچک‌تر از اندازه مطلوب را در نظر نگرفته است. محاسبات نشان می‌دهد که ضریب تغییرات قطرات انتخاب‌شده برابر با ۲/۵٪ است که در مقایسه با حالت قابل قبول (کمتر از ۸٪ برای این نوع سیستم‌ها)، دقت مطلوبی را ارائه می‌دهد.

نتایج به‌دست‌آمده نشان می‌دهد که سیستم ساخته‌شده، قابلیت تولید قطرات در ابعاد دلخواه را دارد. به‌علاوه دستگاه چرخه حرارتی قابلیت ایجاد شرایط مناسب فرآیند PCR و تکثیر DNA را فراهم می‌کند. برنامه پردازش تصاویر نوشته‌شده به‌خوبی می‌تواند تصاویر معمولی و فلورسنتی را پردازش و آنالیز کند.



شکل ۶ تصویر میکروسکوپی نمونه قطرات موجود در تراشه پس از فرآیند PCR با ۲۵ چرخه حرارتی در زیر نور معمولی (چپ) و فیلتر فلورسنت (راست)



شکل ۷ قطرات موجود در تراشه پس از قرارگرفتن در شش سیکل PCR

ساخته شده، در مقایسه با دستگاه‌های پیچیده و گران قیمت مشابه خارجی، این تراشه قابلیت خوبی برای انجام مطالعات پزشکی فراهم می‌کند. این قابلیت در داخل کشور می‌تواند ابزار پیشرفته‌ای در کاربردهای ژنتیکی و پزشکی در اختیار محققان این عرصه قرار دهد.

تشکر و قدردانی: موردی توسط نویسندگان ذکر نشد.

تاییدیه اخلاقی: موردی توسط نویسندگان ذکر نشد.

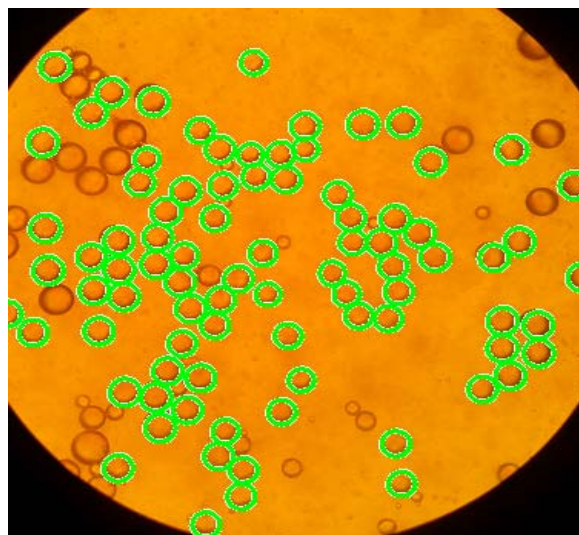
تعارض منافع: موردی توسط نویسندگان ذکر نشد.

سهم نویسندگان: امین بهرامی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۵۰٪)؛ هاجر مقدس (نویسنده دوم)، نگارنده مقدمه/روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۲۵٪)؛ محمدسعید سعیدی (نویسنده سوم)، نگارنده مقدمه/روش‌شناس/پژوهشگر کمکی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۲۵٪).

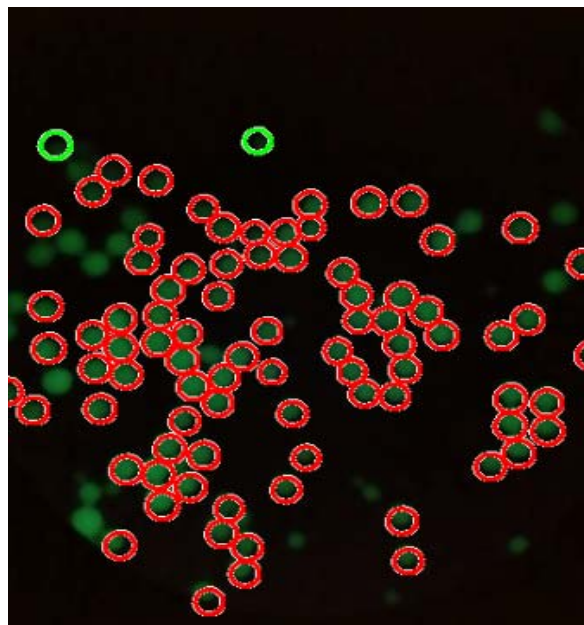
منابع مالی: موردی توسط نویسندگان ذکر نشد.

منابع

- 1- Shemer R, Magenheimer J, Dor Y. Digital droplet PCR for monitoring tissue-specific cell death using DNA methylation patterns of circulating cell-free DNA. *Current Protocols in Molecular Biology*. 2019;127(1):90.
- 2- Cho SM, Shin S, Kim Y, Song W, Hong SG, Jeong SH, et al. A novel approach for tuberculosis diagnosis using exosomal DNA and droplet digital PCR. *Clinical Microbiology and Infection*. 2019.
- 3- Li C, He Q, Liang H, Cheng B, Li J, Xiong S, et al. Diagnostic accuracy of droplet digital PCR (ddPCR) and amplification refractory mutation system PCR (ARMS-PCR) for detecting EGFR mutation in cell-free DNA of advanced lung cancer: A meta-analysis. *Annals of Oncology*. 2020;10:290.
- 4- Olmedillas-López S, García-Arranz M, García-Olmo D. Current and emerging applications of droplet digital PCR in oncology. *Molecular Diagnosis & Therapy*. 2017;21(5):493-510.
- 5- Chang CH, Mau-Hsu D, Chen KC, Wei CW, Chiu CY, Young TH. Evaluation of digital real-time PCR assay as a molecular diagnostic tool for single-cell analysis. *Scientific Reports*. 2018;8(1):1-12.
- 6- Miao G, Zhang L, Zhang J, Ge S, Xia N, Qian S, et al. Free convective PCR: From principle study to commercial applications—a critical review. *Analytica Chimica Acta*. 2020;1108:177-197.
- 7- Kalinina O, Lebedeva I, Brown J, Silver J. Nanoliter scale PCR with TaqMan detection. *Nucleic Acids Research*. 1997;25(10):1999-2004.
- 8- Vogelstein B, Kinzler KW. Digital PCR. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999;96(16):9236-9241.
- 9- Pekin D, Skhiri Y, Baret JC, Le Corre D, Mazutis L, Ben Salem C, et al. Quantitative and sensitive detection of rare mutations using droplet-based microfluidics. *Lab on a Chip*. 2011;11(13):2156-2166.
- 10- Perkins G, Lu H, Garlan F, Taly V. Droplet-based digital PCR: Application in cancer research. *Advances in Clinical Chemistry*. 2017;79:43-91.
- 11- Cordova C, Syeda MM, Corless B, Wiggins JM, Patel A,



شکل ۸) قطرات تشخیص داده شده در تصویر میکروسکوپ نوری معمولی توسط برنامه پردازش تصویر



شکل ۹) قطرات تشخیص داده شده بر روی تصویر فلورسنت توسط برنامه پردازش تصویر

بحث و نتیجه گیری

یک سیستم میکروفلوئیدیکی برای انجام فرآیند ddPCR طراحی، ساخته و ارزیابی شد. نتایج حاصل از شبیه سازی و آزمایشات تولید قطره تطابق قابل قبولی داشتند. سیستم ساخته شده قابلیت تولید قطرات در ابعاد دلخواه با دبی‌های مختلف سیال را دارد. فرآیند PCR و تکثیر DNA با موفقیت توسط قسمت چرخه حرارتی سیستم انجام شد. علاوه بر این برنامه پردازش تصاویر نوشته شده، به خوبی قادر است که تصاویر میکروسکوپ نوری و میکروسکوپ فلورسنتی را با دقت قابل قبولی آنالیز و پردازش کند. با بهبود کیفیت فرآیند ساخت ریزتراشه، مواد سطحی و روغن مورد نیاز می‌توان داده‌های دقیق‌تری جهت مطالعات ژنتیکی به دست آورد. با توجه به هزینه ساخت و ساده بودن سازوکار دستگاه

- 24- Ingber DE. Integrated human organ-on-chip microphysiological systems [Internet]. Unknown City: Google Patents; 2019 [Unknown Cited]. Available from: Not Found.
- 25- Moghadas H, Saidi MS, Kashaninejad N, Nguyen NT. A high-performance polydimethylsiloxane electrospun membrane for cell culture in lab-on-a-chip. *Biomicrofluidics*. 2018;12(2):024117.
- 26- Kashaninejad N, Yaghoobi M, Pourhassan-Moghaddam M, Bazaz SR, Jin D, Warkiani ME. Biological diagnosis based on microfluidics and nanotechnology. In: Jiang X, Bai C, Liu M. *Nanotechnology and Microfluidic*. Hoboken: John Wiley & Sons; 2020.
- 27- Opalski AS, Kaminski TS, Garstecki P. Droplet microfluidics as a tool for the generation of granular matters and functional emulsions. *KONA Powder and Particle Journal*. 2019;36:50-71.
- 28- Chen R, Sun Z, Chen D. Droplet-based microfluidics for cell encapsulation and delivery. In: Santos H, Liu D, Zhang H. *Microfluidics for pharmaceutical applications*. Amsterdam: Elsevier; 2019.
- 29- Ji Q, Zhang JM, Liu Y, Li X, Lv P, Jin D, et al. A modular microfluidic device via multimaterial 3D printing for emulsion generation. *Scientific Reports*. 2018;8(1):1-11.
- 30- Jain V, Patrikar RM. A low-cost portable dynamic droplet sensing system for digital microfluidics Applications. *IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement*. 2019;69(6):3623-3630.
- 31- Orejuela JDA. Gas-liquid droplet microfluidics under confined 3D flow-focusing geometries for droplet generation under the jetting regime [dissertation]. Boston: Northeastern University; 2019.
- 32- Madic J, Zocevic A, Senlis V, Fradet E, Andre B, Muller S, et al. Three-color crystal digital PCR. *Biomolecular Detection Quantification*. 2016;10:34-46.
- 33- Maleki MA, Soltani M, Kashaninejad N, Nguyen NT. Effects of magnetic nanoparticles on mixing in droplet-based microfluidics. *Physics of Fluids*. 2019;31(3):032001.
- 34- Doufène K, Tourné-Péteilh C, Etienne P, Aubert-Pouëssel A. Microfluidic systems for droplet generation in aqueous continuous phases: A focus review. *Langmuir*. 2019;35(39):12597-12612.
- 35- Iqbal S, Bashir S, Ahsan M, Bashir M, Shoukat S. Effect of intersection angle and wettability on droplet generation in microfluidic flow-focusing device. *Journal of Fluids Engineering*. 2020;142(4):041404.
- 36- Do LQ, Vu QT, Nguyen NC, Nguyen TH, Tran TH, Bui TT, et al. Development of a flow focusing droplet generation microfluidic system based on rapidprototyping technique. Conference, 19 December 2019. Unknown Publisher; 2019.
- Kurz SC, et al. Plasma cell-free circulating tumor DNA (ctDNA) detection in longitudinally followed glioblastoma patients using TERT promoter mutation-specific droplet digital PCR assays. *Journal of Clinical Oncology*. 2019;37(15):2026.
- 12- Ramírez JD, Herrera G, Hernandez C, Cruz-Saavedra L, Munoz M, Florez C, et al. Evaluation of the analytical and diagnostic performance of a digital droplet polymerase chain reaction (ddPCR) assay to detect *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2018;12(12):e0007063.
- 13- Wu W, Zhou S, Hu J, Wang G, Ding X, Gou T, et al. A thermosetting oil for droplet-based real-time monitoring of digital PCR and cell culture. *Advanced Functional Materials*. 2018;28(39):1803559.
- 14- Pan Y, Ma T, Meng Q, Mao Y, Chu K, Men Y, et al. Droplet digital PCR enabled by microfluidic impact printing for absolute gene quantification. *Talanta*. 2020;211:120680.
- 15- Hatch AC, Fisher JS, Tovar AR, Hsieh AT, Lin R, Pentoney SL, et al. 1-Million droplet array with wide-field fluorescence imaging for digital PCR. *Lab on a Chip*. 2011;11(22):3838-3845.
- 16- Kiss MM, Ortoleva-Donnelly L, Beer NR, Warner J, Bailey CG, Colston BW, et al. High-throughput quantitative polymerase chain reaction in picoliter droplets. *Analytical Chemistry*. 2008;80(23):8975-8981.
- 17- Markey AL, Mohr S, Day PJR. High-throughput droplet PCR. *Methods*. 2010;50(4):277-281.
- 18- Mohr S, Zhang YH, Macaskill A, Day PJR, Barber RW, Goddard N, et al. Numerical and experimental study of a droplet-based PCR chip. *Microfluidics and Nanofluidics*. 2007;3(5):611-621.
- 19- Ochoa A, Trejo F, Olguín LF. Droplet-based microfluidics methods for detecting enzyme inhibitors. In: Labrou N. *Targeting enzymes for pharmaceutical development*. New York: Springer; 2020.
- 20- Ergin FG, Watz BB, Gade-Nielsen NF. A review of planar PIV systems and image processing tools for lab-on-chip microfluidics. *Sensors*. 2018;18(9):3090.
- 21- Gupta S, Ramesh K, Ahmed S, Kakkar V. Lab-on-chip technology: A review on design trends and future scope in biomedical applications. *International Journal of Bio-Science and Bio-Technology*. 2016;8(5):311-322.
- 22- Khoo BL, Greci G, Lim YB, Lee SC, Han J, Lim CT. Expansion of patient-derived circulating tumor cells from liquid biopsies using a CTC microfluidic culture device. *Nature Protocols*. 2018;13(1):34-58.
- 23- Lu J, Pang J, Chen Y, Dong Q, Sheng J, Luo Y, et al. Application of microfluidic chips in separation and analysis of extracellular vesicles in liquid biopsy for cancer. *Micromachines*. 2019;10(6):390.