

La rivoluzione dei Lab-on-a-chip

di Viviana Desperati

Nel campo della ricerca scientifica e tecnologica si riscontra da qualche anno una forte tendenza alla miniaturizzazione che coinvolge vari settori, dagli strumenti analitici, ai dispositivi elettrici e meccanici, fino agli impianti chimici. In questo articolo sono presentati i concetti base della microfluidica applicati alle tecniche analitiche, i nuovi componenti usati per costruire i lab-on-a-chip e le loro applicazioni nel campo farmaceutico e delle scienze biologiche.



Esempio di microchip per il sequenziamento di Dna

A partire dall'inizio del progetto genoma, circa 15 anni fa, è emersa nel mondo scientifico l'urgenza di disporre di sistemi analitici innovativi ad elevatissima capacità, in grado di ridurre il più possibile i tempi ed i costi connessi con un lavoro di grandi proporzioni come il sequenziamento di tutto il Dna umano. La soluzione più semplice scelta per ovviare a questa necessità fu sin da subito quella di miniaturizzare il più possibile gli strumenti ed i dispositivi presenti nei laboratori analitici. I primi sequenziatori di Dna controllati manualmente sono stati sostituiti inizialmente da macchine in grado di svolgere le stesse funzioni in modo totalmente automatico senza mai fermarsi, che permettono di analizzare fino a 96 campioni contemporaneamente, e successivamente da veri e propri microchip delle dimensioni di un francobollo, su cui viene inciso un labirinto di canali e camere di reazione quasi invisibili a occhio nudo. Poiché questi chip possono essere facilmente prodotti su scala industriale con una tecnologia simile a quella impiegata dall'industria dei semiconduttori e dei computer, si è pensato che il loro utilizzo continuativo avrebbe permesso di abbattere drasticamente i costi del sequenziamento genico e di velocizzarne enormemente i tempi.

L'impulso alla miniaturizzazione

Il settore della genomica ha così dato il primo impulso ad una vera e propria tendenza alla miniaturizzazione che sta coinvolgendo oggi diversi campi, dalla chimica all'ingegneria. Per quanto riguarda le scienze analitiche, ad esempio, negli ultimi anni sono nate moltissime nuove compagnie, soprattutto statunitensi, che stan-

no lavorando per rimpicciolire a dimensioni tascabili tutti i tipi di strumenti, dai cromatografi liquidi ad alta pressione ai dispositivi per lo screening ad alto flusso di principi attivi, alle attrezzature portatili per il monitoraggio ambientale, fino ai rivelatori di armi biologiche ed agli impianti chimici di produzione. In breve tempo, una feconda sinergia tra il mondo accademico e quello industriale sta favorendo la rapida evoluzione dei primi prototipi di strumenti analitici miniaturizzati verso il loro vantaggioso impiego per numerose applicazioni pratiche impensabili con gli strumenti attuali, analogamente a come qualche anno fa la miniaturizzazione degli apparecchi elettronici ha permesso la diffusione di personal computers, telefoni cellulari e vari altri oggetti di uso quotidiano. Negli anni Novanta sono nati i primi "sistemi microanalitici totalmente integrati" (micro-TAS), chiamati anche *lab-on-a-chip*, piccoli dispositivi del tutto simili ai circuiti integrati che costituiscono il cuore dei moderni computer. Come questi infatti sono fabbricati a partire da sottilissimi fogli di vetro, silicio o plastica su cui viene inciso mediante fotolitografia un intricato intreccio di canali sottilissimi, attraverso cui i liquidi scorrono e si miscelano, o di piccoli pozzetti, dove avvengono le reazioni.

Molti dei *lab-on-a-chip* creati finora sono in grado di effettuare in modo totalmente automatico varie operazioni, dal campionamento alla purificazione, diluizione e derivatizzazione del campione, fino ad eventuali reazioni enzimatiche o chimiche, per mezzo di un singolo microchip. I principali vantaggi connessi con questi sistemi integrati risiedono tra l'altro nella riduzione dei costi e dei consumi, nell'aumento del recovery e della capacità analitica e nella notevole automatizzazione dei vari processi. Benché l'idea di miniaturizzare i sistemi analitici stesse circolando da diversi anni negli ambienti accademici

ed industriali, i progetti sono rimasti inattuati per molto tempo, finché non furono disponibili le tecnologie adatte per la microfabbricazione di tali dispositivi. Molti ricercatori all'inizio accolsero con scetticismo l'idea rivoluzionaria di realizzare un laboratorio analitico su un microchip, proprio per l'enorme difficoltà di costruzione e assemblaggio dei componenti microfabbricati necessari a tutte le operazioni di analisi. La grande sfida per la realizzazione di un simile progetto ha reso necessarie fin da subito una sinergia tra le conoscenze di chimica, fisica e ingegneria ed un notevole sforzo per ricercare nuove soluzioni tecnologiche adatte a superare problemi connessi, ad esempio, con il fatto di dover maneggiare quantità di liquidi pari a pochi nanolitri. Solo l'invenzione di nuovi metodi di iniezione, la messa a punto delle tecniche per la microfabbricazione dei chip, lo studio dei metodi per dirigere i fluidi e soprattutto di rivelatori sufficientemente sensibili (possibilmente on-chip per evitare perdita di risoluzione) hanno reso materialmente possibile la realizzazione di questi dispositivi destinati a rivoluzionare completamente l'attuale settore delle scienze analitiche.

Metodologia di costruzione e funzionamento

Le prime metodiche messe a punto per la fabbricazione dei dispositivi miniaturizzati sono state importate ed adattate dalla tecnologia usata per i semiconduttori. Piccole lastre di vetro o di silicio vengono incise mediante fotolitografia e trattamento chimico con acido fluoridrico per realizzare i pozzetti ed il circuito di microcanali (aventi sezione trasversale pari a 10-100 μm e lunghezza pari a pochi centimetri)

V. Desperati, Vicuron Pharmaceuticals – Genzano (VA). vdesperati@vicuron.it

utilizzabili per le separazioni cromatografiche ed elettroforetiche al posto delle tradizionali colonne capillari. Recentemente ha riscontrato un notevole successo anche l'impiego di materiali alternativi di tipo polimerico, come ad esempio il polidimetilsilossano, come supporti per i microchip. La maggior flessibilità e semplicità di lavorazione di questi materiali permette infatti di impiegare tecniche di fabbricazione meno costose, più precise e veloci, particolarmente adatte per una rapida costruzione di nuovi prototipi. Invece di praticare delle microincisioni su lastre già preformate e difficili da maneggiare, si può alternativamente costruire il microchip per estrusione del polimero intorno ad uno schema guida del circuito ed eventualmente poi lavorare la superficie interna dei microcanali per renderli adatti alla separazione analitica. La movimentazione dei liquidi nel circuito del microchip avviene mediante forza elettroosmotica-elettrocinetica o idrodinamica, a seconda che si applichi una differenza di potenziale o una differenza di pressione tra le due estremità del canale in cui scorre il liquido. Entrambi i sistemi presentano vantaggi e svantaggi a seconda del tipo di applicazioni a cui sono destinati.

Il meccanismo elettrocinetico

Il meccanismo di tipo elettrocinetico già sfruttato per le tecniche di elettroforesi è stato introdotto per primo in quanto sembrava maggiormente adattabile allo spostamento ed al controllo di liquidi in quantità pari a pochi nanolitri o addirittura picolitri. L'applicazione di un voltaggio mediante due elettrodi risultava infatti molto più semplice, flessibile e dinamico rispetto all'applicazione di una pressione con microsiringhe e valvole microfabbricate non sufficientemente affidabili.

La caratteristica più interessante connessa con il flusso elettroosmotico, che si genera con le soluzioni elettrolitiche per applicazione di un campo elettrico, risiede nell'elevata efficienza di separazione dovuta alla minore dispersione longitudinale e ad un profilo trasversale praticamente piatto. I supporti in vetro o silice sono ideali in questo caso perché i gruppi silanici presenti sulla superficie interna dei microcanali permettono di modulare la velocità del flusso elettroosmotico in base al pH delle soluzioni di riempimento ed alla differenza di potenziale applicata agli elettrodi. La velocità netta di un analita è data dalla somma della velocità dovuta all'elettrosmosi e della sua velocità elettroforetica, una caratteristica peculiare di ogni

molecola dotata di carica che permette di differenziare i componenti di una miscela. Per evitare il trascinarsi di un liquido da un canale all'altro è spesso necessario studiare attentamente il design del chip, eventualmente modellando un'impedenza o controllando attivamente il voltaggio in diversi punti del circuito.

Il meccanismo idrodinamico

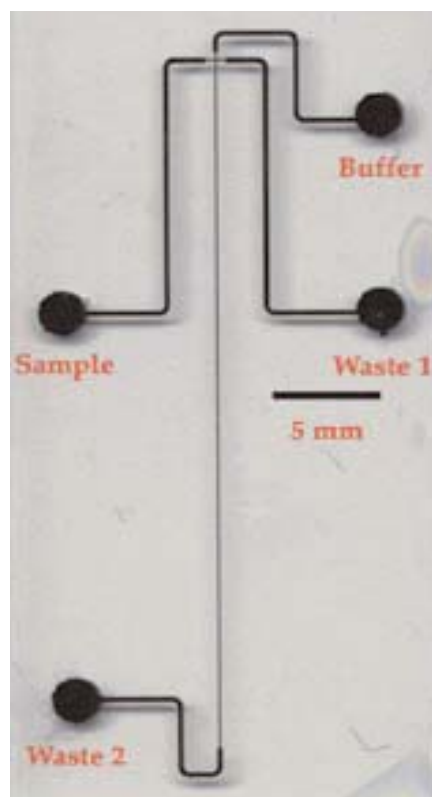
Lo sviluppo esponenziale della microfluidica avvenuto negli ultimissimi anni ha portato alla creazione di nuovi sistemi sempre più sofisticati che hanno reso possibile la ricerca e l'implementazione di metodi alternativi per movimentare, fermare, miscelare e misurare i fluidi nei microcanali. In molti casi può essere vantaggioso sostituire il movimento elettroosmotico con il flusso idrodinamico guidato dalla pressione mediante l'uso delle moderne valvole microfabbricate. L'uso della pressione al posto del voltaggio può essere utile in particolare quando si intende separare cellule o particelle di grosse dimensioni, per rendere più agevole il passaggio dei soluti attraverso i microcanali, quando si usano tamponi ad elevata forza ionica o tutte le

volte che si vogliano limitare gli effetti di adsorbimento degli analiti alla parete ionica dei microcanali (ad esempio nel caso di proteine basiche).

Il pompaggio dei liquidi

Il problema principale risiede nella necessità di creare dei sistemi innovativi per il pompaggio dei liquidi, data la difficoltà a miniaturizzare le pompe pneumatiche per dispensare o movimentare pochi nanolitri con sufficiente precisione. Molte sfide tecniche per fabbricare una valvola a prova di perdite che sia abbastanza piccola da essere incorporata in canali delle dimensioni di pochi micrometri devono essere ancora superate ma l'enorme accelerazione subita dal settore della microfluidica lascia ben sperare per una repentina soluzione di molti dei problemi ancora irrisolti. La combinazione di cammini idrofobici e idrofilici, ad esempio, potrebbe essere un modo tecnicamente semplice per regolare il movimento dei fluidi e costruire valvole passive e camere di miscelamento per sistemi guidati dalla pressione. Spesso si ricorre anche a piccole differenze di pressione create da gradienti di viscosità, temperatura ecc. tra due punti di un microcanale oppure all'impiego del vuoto, molto utile per effettuare un campionamento preciso e totalmente automatico. Anche i sistemi di iniezione sono stati reinventati e studiati *ad hoc* per i microchip: piccolissime quantità di campione vengono iniettate nei microcanali in cui avviene la separazione applicando una differenza di potenziale elettrico o di pressione e movimentando la quantità di liquido presente nell'intersezione tra due canali.

Ovviamente, date le dimensioni estremamente ridotte dei microcanali, i volumi di liquidi iniettati non superano mai l'ordine di grandezza dei picolitri. Questo è sicuramente un vantaggio nel caso in cui si disponga solo di quantità minime di campione ma comporta anche la necessità di equipaggiare questi sistemi analitici con rivelatori ad elevatissima sensibilità, in grado di incrementare notevolmente il rapporto segnale/rumore. In molti casi, soprattutto per applicazioni nel campo delle scienze biologiche, viene scelto il detector a fluorescenza laser-indotta, preferibile rispetto al più comune rivelatore di assorbanza UV in quanto molto più sensibile. Nel prossimo futuro è probabile che la maggior parte dei microchip di nuova creazione saranno collegati ad uno spettrometro di massa, scelto come rivelatore migliore per la sua elevata specificità e sensibilità. Una caratteristica molto interessante della microfluidica



Esempio di microchip in cui sono evidenziati i pozzetti contenenti il campione ed il tampone di riempimento del circuito ed il microcanale delle dimensioni di pochi millimetri utilizzato per la separazione analitica

deriva dal fatto che a basse velocità e con numeri di Reynolds molto bassi, come accade nei canali dei microchip, il movimento dei fluidi diviene di tipo laminare, ossia i liquidi diventano molto densi e tendono a fluire lentamente senza creare turbolenze, come avviene invece su macroscale.

Due soluzioni acquose che si trovino a passare contemporaneamente in un canale di dimensioni inferiori a 100 μm non solo acquisiscono una viscosità molto elevata, ma tendono a scorrere parallelamente senza miscelarsi se non all'interfaccia, dove alcune particelle di soluto di una soluzione tendono a diffondere nel liquido adiacente in misura proporzionale al proprio grado di diffusività. Questa proprietà può rappresentare uno svantaggio nel caso in cui il tempo di miscelamento tra due soluzioni sia troppo lento ai fini dell'analisi, ma recentemente si è rivelata particolarmente vantaggiosa per costruire nuovi strumenti che sfruttano le differenze di indice di diffusività delle molecole come mezzo per separare o identificare i componenti di una miscela. Sono nati così dei dispositivi definiti "T-sensors" che sfruttano il miscela-

mento diffusionale per eseguire, ad esempio, delle analisi del sangue da cui ottenere le informazioni volute in meno di un minuto (praticamente in tempo reale), direttamente sul luogo del prelievo e consumando meno di un microlitro di campione.

Conclusioni

Questo nuovo tipo di approccio è solo un esempio che dimostra come la tendenza alla miniaturizzazione non si limita solo allo sforzo di rimpicciolire gli strumenti attualmente in uso, riadattando le tecnologie già esistenti, ma coinvolge una vera e propria ricerca di nuove tecniche e nuove opportunità per la creazione di sistemi analitici totalmente innovativi. In molti casi infatti la riduzione di vari dispositivi a dimensioni microscopiche consente lo sfruttamento di proprietà fisiche e meccaniche del tutto inesistenti su macroscale. La chiave del successo dei *lab-on-a-chip* non dipenderà quindi solo dalla capacità di sviluppare nuovi componenti microfabbricati sufficientemente precisi e adatti a movimentare piccoli volumi di liquidi, ma soprattutto dal-

la capacità di implementare le prestazioni analitiche consentite dalle attuali tecnologie e di aprire gli orizzonti verso nuove opportunità di indagine finora impensabili. Una volta divenuti abbastanza economici, resistenti e compatti, diversi strumenti d'analisi microfabbricati potranno entrare nelle case ed essere utilizzati da chiunque per diagnosticare una malattia, monitorare un inquinante chimico o batteriologico o per innumerevoli altre funzioni.

Bibliografia

- [1] R.F. Service, *Science*, 1998, **282**, 396.
- [2] D. Figeys, D. Pinto, *Anal. Chem.*, 2000, **72**, 330.
- [3] G.J.M. Bruin, *Electrophoresis*, 2000, **21**, 3931.
- [4] B. He *et al.*, *Anal. Chem.*, 1998, **70**, 3790.
- [5] D.C. Duffy *et al.*, *Anal. Chem.*, 1998, **70**, 4974.
- [6] M.A., Burns, *Science*, 2002, 296, 1818.
- [7] J. Knight *et al.*, *Anal. Chem.*, 2002, **74**, 2623.
- [8] P. Gwynne, *Science*, 2002, **297**, 629.
- [9] C.M. Harris, *Anal. Chem.*, 2003, **75**, 65.