

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 245205 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **438521**

(22) Data zgłoszenia: **2021.07.19**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2023.01.23 BUP 04/2023**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2024.06.03 WUP 23/2024**

(51) MKP:

G01N 27/447 (2006.01)

H01J 37/26 (2006.01)

G01N 33/483 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

POLITECHNIKA WROCŁAWSKA, Wrocław, PL

(72) Twórca(-y) wynalazku:

MICHAŁ KRYSZTOF, Wrocław, PL

WOJCIECH KUBICKI, Sobótka, PL

TOMASZ GRZEBYK, Wrocław, PL

(54) Tytuł:

Miniaturowe urządzenie do żelowej elektroforezy kapilarnej z miniaturową wyrzutnią elektronową

PL 245205 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest miniaturowe urządzenie do żelowej elektroforezy kapilarnej zintegrowane z miniaturową wyrzutnią elektronową wykonane metodami mikroinżynieryjnymi.

Elektroforeza żelowa używana jest do separacji nici DNA, przez co możliwa jest analiza sekwencji DNA. Zwyczajowo realizowana jest w dużych urządzeniach, wykorzystujących płytki z naniesionym żelem separującym, których końce zanurzone są w pojemniku z roztworem przewodzącym, umożliwiającym przyłożenie do końców płytek wysokiego napięcia. Próbkę DNA naniesiona na jednym końcu płytki żelowej, poddana działaniu silnego pola elektrycznego, porusza się wzdłuż linii pola. Fragmenty DNA o różnej długości mają różną ruchliwość w żelu separującym. Krótsze nici w danym czasie przebędą dłuższą drogę, niż dłuższe nici. Po procesie rozdzielania można odczytać unikatowy kod danego DNA za pomocą technik optycznych, tj. mierząc absorpcję światła przez żel, lub wybarwiając odpowiednimi odczynnikami płytkę, obserwować, powstałe przez nagromadzenie nici DNA, prążki na płytce. Elektroforeza kapilarna to odmiana elektroforezy żelowej, wykorzystująca bardzo wąskie i długie rurki, najczęściej szklane lub kwarcowe, oraz inne odczynniki do zapewnienia rozdziału fragmentów DNA. Szczególnym typem urządzeń do elektroforezy kapilarnej są, tzw. laboratoria na chipie, wykonane metodami mikroinżynieryjnymi, miniaturowe urządzenia wykonane ze szkła, o wymiarach kilku centymetrów, umożliwiające wykonanie badania DNA.

Elektroforeza kapilarna wykorzystywana jest nie tylko do sekwencjonowania DNA i genomu organizmów żywych. Dzięki zastosowaniu tej techniki badawczej możliwe jest również diagnozowanie różnych uszkodzeń nici DNA wskutek czynników zewnętrznych, np. promieniowania jonizującego. Od wielu lat wiadomo, iż promieniowanie jonizujące, w postaci promieniowania Roentgena, promieniowania gamma, promieniowania alfa, itp., może powodować uszkodzenia DNA w komórkach, co może doprowadzać do mutacji, wzrostu komórek nowotworowych, a w szczególnych wypadkach do śmierci organizmu. Również od wielu lat prowadzone są badania nad mechanizmami rozpadu DNA pod wpływem promieniowania jonizującego. Przez długi czas uważano, iż w największym stopniu, za uszkodzenia DNA odpowiada wysoka energia promieniowania. Jednak badania przeprowadzone w 2000 roku przez grupę naukowców z Kanady pokazały, iż ta wysoka energia promieniowania, powoduje generację bardzo wielu elektronów wtórnych o niskich energiach. To te potencjalnie nieszkodliwe cząstki, o energii poniżej energii jonizacji, w największym stopniu mają wpływ na rozpad łańcuchów DNA. W celu poznania mechanizmów stojących za tym zjawiskiem należało opracować nowe metody badawcze.

Z publikacji B. Boudaïffa, P. Cloutier, D. Hunting, M. A. Huels, L. Sanche, Resonant Formation of DNA Strand Breaks by Low-Energy (3 to 20 eV) Electrons, *Science*, vol. 287 (2000), pp. 1658–1660, wiadomo, że do badania rozpadu DNA używano komory próżniowej wyposażonej w działo elektronowe wytwarzające niskoenergetyczną wiązkę elektronową o znanym prądzie. Odpowiednio przygotowane DNA umieszczano na przewodzącym podłożu i zamykano w komorze, którą odpompowywano do ultra wysokiej próżni. Naświetlano następnie próbkę za pomocą wiązki elektronów. Po tym procesie próbka była badana za pomocą urządzenia do agarowej elektroforezy żelowej, w której uwidaczniały się prążki określone mianem pęknięcia jednoniciowego (SSB) oraz pęknięcia dwuniciowego (DSB). Widoczny był również prążek nieuszkodzonych fragmentów DNA.

Z publikacji M. A. Huels, B. Boudaïffa, P. Cloutier, D. Hunting, L. Sanche, Single, Double, and Multiple Double Strand Breaks Induced in DNA by 3–100 eV Electrons, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 4467–4477, wiadomo, że do badania rozpadu DNA wykorzystano również komorę próżniową z działem elektronowym oraz urządzenie do agarowej elektroforezy żelowej, jednak aby zabezpieczyć próbkę przed warunkami zewnętrznymi, od momentu przygotowania preparatu, do momentu zakończenia eksperymentu, proces był realizowany w urządzeniu napełnionym suchym azotem.

Z publikacji A. N. Sidorov, T. M. Orlando, Monolayer Graphene Platform for the Study of DNA Damage by Low-Energy Electron Irradiation, *J. Phys. Chem. Lett.*, 4 (2013) 2328–2333, do badania rozpadu DNA wykorzystano podłoże przewodzące z cienką warstwą złota pokrytą warstwą grafenu. Przygotowane DNA osadzano na takiej powierzchni i umieszczano w komorze próżniowej. Komora zaopatrzona była w działo elektronowe oraz w aparaturę do spektroskopii Ramanowskiej. Po odpompowaniu komory próżniowej do wysokiej próżni wykonywano pomiar spektroskopowy, który służył jako pomiar referencyjny. Następnie naświetlano próbkę DNA za pomocą niskoenergetycznej wiązki elektronowej. Tuż po naświetleniu powtarzano pomiar spektroskopowy i określano zmiany w sygnale świadczące o zmianach w DNA.

Z publikacji M. B. Hahn, S. Meyer, M.-A. Schröter, H. Seitz, H.-J. Kunte, T. Solomun, H. Sturm, Direct electron irradiation of DNA in a fully aqueous environment. Damage determination in combination with Monte Carlo simulations, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 19 (2017) 1798, wiadomo, że do badania rozpadu DNA wykorzystano komercyjny skaningowy mikroskop elektronowy wyposażony w specjalnie wykonany uchwyt do próbki DNA, wyposażony w mikroziornik oraz cienką membranę. Przygotowane DNA umieszczano w roztworze wodnym w mikroziorniku i przykrywano chipem krzemowym z wykonaną w nim cienką membraną. Całość, szczelnie zamkniętą, wkładano do komory przedmiotowej mikroskopu elektronowego, gdzie następowało naświetlenie próbki za pomocą wiązki elektronowej mikroskopu. Takie rozwiązanie umożliwiało naświetlanie DNA w jego naturalnym, uwodnionym środowisku, a nie jak wcześniej w próżni. Po naświetlaniu, próbki przechowywano w obniżonej temperaturze, a następnie analizowano za pomocą elektroforezy żelowej.

Z artykułu W. Kubicki, R. Walczak, J. Dziuban, Injection, separation and fluorimetric detection of DNA in glass lab-on-a-chip for capillary gel electrophoresis, *Opt. Appl.*, Vol. XLI, No. 2 (2011) 409–416, znane jest miniaturowe urządzenie do żelowej elektroforezy kapilarnej. Zbudowane jest w całości ze szkła. Zawiera dwa kanały, krótszy kanał dozujący próbkę oraz dłuższy kanał separujący. W końcowej części kanału separującego znajduje się obszar detekcji, oświetlany za pomocą diody laserowej. Gdy część DNA o określonej długości nici dociera do tego obszaru, znaczniki fluorescencyjne zawarte w próbce zaczynają świecić. Światło jest mierzone za pomocą matrycy CCD. Od początku pomiaru mierzony jest czas, zatem kolejno docierające próbki do obszaru detekcji dają informację w czasie, co później interpretowane jest jako sygnał dla konkretnej próbki DNA. Każda próbka, ze względu na swój specyficzny skład, da inny sygnał całościowy. Za pomocą tego urządzenia możliwe jest sekwencjonowanie DNA, jak również pomiar rozpadu DNA pod wpływem działania wiązki elektronowej. Urządzenie nie posiada własnego źródła elektronów i może badać tylko wcześniej naświetlone próbki.

Z patentu A2 Michał Krysztof, Tomasz P. Grzebyk, Anna Górecka-Drzazga, Jan Dziuban, nr Pat.225546, Zintegrowany, miniaturowy, transmisyjny mikroskop elektronowy, znany jest miniaturowy mikroskop elektronowy wykonany metodami mikroinżynieryjnymi, wyposażony w miniaturową kolumnę elektrooptyczną oraz miniaturową pompę próżniową, zdolny do generacji wiązki elektronowej i transmisji tej wiązki przez cienką membranę z azotku krzemu do preparatu umieszczonego na niej. Urządzenie zostało przedstawione na fig. 1 jako stan techniki. Mikropompa próżniowa składa się z dolnej katody mikropompy próżniowej 17, dystansownika katody 18, elektrody ekstrakcyjnej 7, dystansownika elektrody ekstrakcyjnej 19 i górnej katody mikropompy próżniowej 20, na powierzchniach których po zewnętrznej stronie umieszczono magnesy stałe 21, a dystansowniki katody 18 i elektrody ekstrakcyjnej 19 łączą się z komorą wyrzutni elektronowej poprzez kanały dolny i górny wykonane w dystansownikach wspólnych dla obu części.

Problemem technicznym, rozwiązywanym przez przedstawiony wynalazek jest wspólna cecha opisywanych w literaturze przedmiotu rozwiązań, polegająca na tym, że badania rozpadu DNA pod wpływem wiązki elektronów możliwe są jedynie w wysokiej próżni, co nie jest środowiskiem typowym dla DNA, albo pomiar elektroforetyczny naświetlonej próbki następuje po pewnym czasie od naświetlenia. Nie istnieje dotychczas urządzenie umożliwiające naświetlenie próbki DNA wiązką elektronów w naturalnym, uwodnionym środowisku typowym dla DNA, w trakcie procesu separacji elektroforetycznej.

Istota miniaturowego urządzenia do żelowej elektroforezy kapilarnej z miniaturową wyrzutnią elektronową, według wynalazku polega na tym, że zbudowane jest z naprzemiennie ułożonych dystansowników szklanych i krzemowych elektrod, uformowanych za pomocą metod mikroinżynieryjnych, połączonych ze sobą, z wykorzystaniem bondingu anodowego i składa się z co najmniej 3 elektrod, pomiędzy którymi znajdują się co najmniej 2 dystansowniki szklane, przy czym na znajdującej się na dole katodzie, z wytworzonym na środku ostrzem krzemowym, na które naniesiono warstwę nanorurek węglowych, znajduje się dystansownik katody z wykonanym na środku przelotowym otworem katody, połączony mikrokanalem dolnym ze znaną mikropompą, na dystansowniku katody znajduje się elektroda ekstrakcyjna z wykonanym przelotowym otworem elektrody ekstrakcyjnej, współdzielona z mikropompą, następnie dystansownik elektrody ekstrakcyjnej, z wykonanym przelotowym otworem dystansownika elektrody ekstrakcyjnej, połączony mikrokanalem górnym z mikropompą, następnie anoda, z wykonanym otworem anody przykrytym membraną, na anodzie zaś znajduje się podłoże szklane główne, które ma wewnątrz wykonany kanał separacyjny zawierający w swym ciągu membranę, zakończony otworem wlotowym i częścią wylotową, zaopatrzony w obszar detekcji umieszczony przed częścią wylotową,

z kanałem separacyjnym zaś skrzyżowany jest kanał dozujący zakończony otworami wlotowo – wylotowymi, znajdujący się pomiędzy otworem wlotowym kanału separującego a membraną, ponadto ostrze krzemowe oraz otwory w poszczególnych warstwach a także membrana, są współśrodkowe, zaś katoda spolaryzowana jest napięciem ujemnym, którego wartość bezwzględna jest nie mniejsza niż 1000 V, elektroda ekstrakcyjna spolaryzowana jest napięciem ujemnym mniejszym, bądź równym co do wartości, niż katoda, w szczególności potencjałem masy, a anoda z membraną znajduje się na potencjale masy.

Korzystnie, gdy kanał dozujący ma długość nie mniejszą niż 10 mm, a kanał separujący długość nie mniejszą niż 30 mm, a ich szerokość jest nie większa niż 0.5 mm.

Korzystnie, gdy oba kanały przecinają się w odległości nie większej niż 5 mm od wlotu kanału separującego.

W wariacie wynalazku, część wylotowa kanału separującego jest wykonana w formie dwóch odnóg posiadających kanały wylotowe z otworami wylotowymi.

Korzystnie, na końcach kanałów w otworach wlotowych/wylotowych znajdują się elektrody polaryzujące do wymuszania przepływu przez kanały zgodnie z procedurą badania.

W wariacie wynalazku, pomiędzy anodą a dystansownikiem elektrody ekstrakcyjnej, licząc od dołu, dodano elektrodę ogniskującą, w której wykonano przelotowy otwór elektrody ogniskującej oraz dystansownik elektrody ogniskującej, w którym wykonano otwór dystansownika elektrody ogniskującej, przy czym otwory te są współśrodkowe z pozostałymi otworami przelotowymi.

Korzystnie, membrana ma kształt kwadratu, którego wymiar boku jest nie większy, niż szerokość kanału separującego znajdującego się nad nią.

Korzystnie, ostrze krzemowe ma promień nie większy niż 10 μm i wysokość nie większą niż połowa grubości katody.

Korzystnie, w elektrodzie ekstrakcyjnej oraz w elektrodzie ogniskującej w części wyrzutni elektronowej wykonane są otwory o tych samych wymiarach nie większych niż 2 x 2 mm^2 .

Korzystnie, otwory w dystansownikach mają wymiary większe niż wymiary największego otworu w elektrodach.

Zaletami wynalazku są małe wymiary, zastosowanie metod mikroinżynierskich do produkcji pozwoli na wielkoseryjną produkcję oraz eliminuje konieczność stosowania zewnętrznej próżniowej obudowy. Największą zaletą wynalazku jest możliwość naświetlania próbek DNA bezpośrednio przed lub w trakcie trwania procesu elektroforezy, dzięki czemu wynik wpływu wiązki elektronowej na DNA nie mają czynniki zewnętrzne, jak również czas. Dodatkowo naświetlanie DNA wiązką elektronów odbywa się w środowisku uwodnionym, zbliżonym do naturalnego, co jest niezbędne do dokładnego poznania efektów wpływu elektronów na rozpad DNA.

Wynalazek jest bliżej przedstawiony w przykładach realizacji i w oparciu o rysunek, którego fig. 1 przedstawia stan techniki, fig. 2 przedstawia konstrukcję urządzenia w wariacie z trzema elektrodami wyrzutni oraz prostym kanałem separującym, natomiast fig. 3 wariant z czterema elektrodami wyrzutni oraz rozwidlonym kanałem separującym.

Przykład 1

Miniaturowe urządzenie do żelowej elektroforezy kapilarnej z miniaturową wyrzutnią elektronową, zbudowane jest z naprzemiennie ułożonych płytek szklanych (dystansowników) i krzemowych (elektrod), uformowanych za pomocą metod mikroinżynierskich, połączonych ze sobą, z wykorzystaniem bondingu anodowego. Urządzenie składa się z trzech podłoży szklanych i pięciu podłoży krzemowych. Podłoże główne 1, stanowi główną część urządzenia do żelowej elektroforezy kapilarnej. Wykonano w nim kanał separacyjny 2, rozpoczynający się otworem wlotowym 3 i zakończony częścią wylotową 2a wraz z otworem wylotowym 4, oraz skrzyżowany z nim kanał dozujący 5, z otworem wlotowym 6 i otworem wylotowym 7, przy czym tuż za skrzyżowaniem obu kanałów znajduje się cienka membrana 8, a przy końcu kanału separującego 2, znajduje się obszar detekcji 9, natomiast membrana 8 wykonana jest z azotku krzemu naniesionego na podłoże krzemowe stanowiące anodę 10, które jest dolną podstawą urządzenia do żelowej elektroforezy. Poniżej znajdują się pozostałe podłoża i dystansowniki stanowiące wyrzutnię elektronową, składającą się, idąc w dół, kolejno ze wspomnianej anody 10, dystansownika elektrody ekstrakcyjnej 11, wspólnego dla wyrzutni elektronowej i mikropompy próżniowej, w którym wykonany jest górny kanał 12 łączący wewnątrz wyrzutni elektronowej i mikropompy, oraz przelotowy otwór dystansownika elektrody ekstrakcyjnej 11a o wymiarach 6 x 6 mm^2 , elektrody ekstrakcyjnej 13, wspólnej dla wyrzutni elektronowej i mikropompy próżniowej, w której wykonano przelotowy otwór elektrody ekstrakcyjnej 13a o wymiarach 2 x 2 mm^2 w części wyrzutni elektronowej oraz otwór 4 x 4 mm^2

w części mikropompy próżniowej, dystansownika katody 14, wspólnego dla wyrzutni elektronowej i mikropompy próżniowej, w którym wykonany jest dolny kanał 15 łączący obie te części oraz przelotowy otwór katody 14a o wymiarach 6 x 6 mm², katody 16, w której wytworzono ostrze krzemowe 17 o promieniu krzywizny 1 μm i naniesiono na nie warstwę nanorurek węglowych, dolnej katody mikropompy próżniowej 18 i górnej katody mikropompy próżniowej 19, na powierzchniach których po zewnętrznej stronie umieszczono magnesy stałe 20. Otwory przelotowe wykonane w elementach wyrzutni elektronowej, ostrze katody 17 oraz powierzchnia membrany 8 wytworzonej w anodzie 10 są współśrodkowe, jak również otwory wykonane w mikropompie próżniowej są współśrodkowe. Katoda 16 spolaryzowana jest napięciem -4000 V, elektroda ekstrakcyjna 13 spolaryzowana jest napięciem -3000 V, natomiast anoda 10 utrzymywana jest na potencjale masy. Górna 19 i dolna katoda 18 mikropompy próżniowej są połączone ze sobą elektrycznie i spolaryzowane napięciem -4000 V. Membrana 8 ma wymiary 0.5 x 0.5 mm² i grubość 100 nm. Wewnątrz komór wyrzutni elektronowej i mikropompy próżniowej panuje próżnia początkowa rzędu 1 hPa. Kanał separujący 2 ma długość 30 mm, szerokość 0.5 mm i głębokość 30 μm, natomiast kanał dozujący 5 ma długość 10 mm, szerokość 0.5 mm i głębokość 30 μm. Otwory doprowadzające kanałów mają średnicę 0.5 mm. Kanały, dozujący 5 i separujący 2, przecinają się pod kątem prostym w środkowej części kanału dozującego 5 i 5 mm od wlotu kanału separującego 3.

Przykład 2

Urządzenie jak w przykładzie 1, z tą różnicą, że w podłożu głównym 1, przy końcu kanału separującego 2, część wylotowa 2a kanału separacyjnego 2 jest wykonana w formie dwóch odnóg posiadających kanały wylotowe, pierwszy kanał wylotowy 23, zakończony otworem wylotowym 24, oraz drugi kanał wylotowy 25, zakończony otworem wylotowym 26.

Przykład 3

Urządzenie jak w poprzednich przykładach, z tą różnicą, że w wyrzutni elektronowej pomiędzy anodą 10, a dystansownikiem elektrody ekstrakcyjnej 11, licząc od dołu, dodano elektrodę ogniskującą 21, w której wykonano przelotowy otwór elektrody ogniskującej 21a o wymiarach 2 x 2 mm², oraz dystansownik elektrody ogniskującej 22, w którym wykonano otwór dystansownika elektrody ogniskującej 22a o wymiarach 6 x 6 mm². Na elektrodę ogniskującą przyłożone jest napięcie -4000 V a otwory przelotowe są współśrodkowe z pozostałymi otworami w wyrzutni elektronowej.

Działanie urządzenia według wynalazku z przykładu 1 jest następujące: kanały, separujący i dozujący, wypełniane są żelazem do separacji elektroforetycznej. Próbka DNA znakowana fluorochromem Cy5 oraz wymieszana z buforem dozującym, umieszczana jest w otworze wlotowym kanału dozującego. Następnie przygotowana zostaje wyrzutnia elektronowa. Najpierw uruchamiana jest mikropompa próżniowa, przez podanie na elektrodę ekstrakcyjną napięcia -3000 V, natomiast na katodę górną i katodę dolną napięcia -4000 V. Pompa pozostaje włączona przez cały czas działania wyrzutni elektronowej. Po odpompowaniu komory do wysokiej próżni, na katodę wyrzutni podawane jest napięcie -4000 V, co powoduje generację wiązki elektronowej, która pada na powierzchnię membrany. W tym momencie następuje włączenie zasilania na końcach kanału dozującego. Na wlocie kanału podane jest ujemne napięcie, natomiast na wylocie napięcie dodatnie, przy czym różnica napięć wynosi 200 V. Próbka DNA zaczyna poruszać się w stronę środka kanału. Gdy próbka znajdzie się na skrzyżowaniu kanałów napięcie na końcach kanału dozującego jest wyłączane, a włączane jest napięcie na końcach kanału separującego, w taki sposób, aby zapewnić natężenie pola elektrycznego w kanale w wysokości 200 V/cm. Próbka DNA zaczyna poruszać się wzdłuż kanału separującego, gdzie na początku poddana jest działaniu wiązki elektronowej przechodzącej przez membranę z wyrzutni elektronowej. W tym miejscu następuje rozpad DNA pod wpływem działania elektronów. Wszystkie części próbki, zarówno uszkodzone DNA, jak i nieuszkodzone DNA, przemieszcza się dalej przez kanał separujący i dzieli się ze względu na szybkość przemieszczania się poszczególnych części przez żel separujący. Obszar detekcji kanału separującego oświetlany jest w tym czasie wiązką promieniowania laserowego o długości fali 635 nm. Gdy pierwsze części DNA docierają do tego obszaru, światło laserowe pobudza fluorochrom znajdujący się w DNA do świecenia. Światło to jest przechwytywane przez matrycę CCD i przetwarzane na sygnał elektryczny. Wysokość tego sygnału jest zależna od intensywności świecenia próbki DNA, natomiast mierzony jest równocześnie czas od podania napięcia na końce kanału separującego. Za pomocą tych dwóch parametrów możliwe jest wyznaczenie elektroforegramu, pokazującego efekty naświetlania próbki DNA przez wiązkę elektronów.

Działanie urządzenia według wynalazku z przykładu 3 jest podobne jak dla przykładu 1, z tym że: w przy tych samych napięciach na elektrodach wyrzutni elektronowej, generowana jest wiązka elektronowa o tej samej wartości prądu, natomiast na elektrodę ogniskującą podane jest napięcie -4000 V, co

powoduje skupienie wiązki na membranie, a co za tym idzie, więcej elektronów dostaje się do wnętrza kanału separującego. W części związanej z separacją elektroforetyczną przebieg działania jest podobny, z tym, że do momentu detekcji fragmentów próbki DNA w obszarze detekcji napięcie dodatnie przykładane jest do obu otworów wylotowych kanałów wylotowych. Po minięciu pierwszego fragmentu DNA obszaru detekcji, tylko na jednym otworze pozostaje napięcie dodatnie, na drugi otwór podane jest napięcie ujemne o wartości takiej samej jak na otworze wlotowym kanału separującego. W tym wypadku pierwszy fragment DNA zostanie skierowany do otworu wylotowego spolaryzowanego dodatnio. W momencie detekcji drugiego fragmentu DNA, następuje zamiana polaryzacji otworów wylotowych, w taki sposób, że drugi fragment DNA zostaje skierowany do drugiego otworu wylotowego. Takie rozwiązanie umożliwia separację efektów naświetlania DNA przez wiązkę elektronową, a co za tym idzie późniejsze ich badania z pomocą innych środków.

Zastrzeżenia patentowe

1. Miniaturowe urządzenie do żelowej elektroforezy kapilarnej z miniaturową wyrzutnią elektro-nową, zbudowane z naprzemiennie ułożonych elektrod krzemowych i dystansowników szkla-nych, połączonych w procesie bondingu anodowego, stanowiących jednocześnie obudowę urządzenia, połączone za pomocą co najmniej jednego wspólnego podłoża i co najmniej dwóch szklanych dystansowników z wykonanymi w nich kanałami, ze znaną mikropompą próżniową składającą się kolejno od dołu z katody dolnej mikropompy (18), dystansownika dolnego z mikrokanalem dolnym (15), elektrody ekstrakcyjnej (13), dystansownika górnego z mikrokanalem górnym (12) oraz katody górnej mikropompy (19) zaś na katodzie górnej (19) i pod katodą dolną (18) znajdują się magnesy stałe (20), **znamiennie tym**, że posiada co naj-mniej 3 elektrody pomiędzy którymi znajdują się co najmniej 2 dystansowniki szklane, przy czym na znajdującej się na dole katodzie (16), z wytworzonym na środku ostrzem krzemowym (17) znajduje się dystansownik katody (14) z wykonanym na środku przelotowym otworem katody, połączony mikrokanalem dolnym (15) z mikropompą, na dystansowniku katody (14) znajduje się elektroda ekstrakcyjna (13) z wykonanym przelotowym otworem elektrody eks-trakcyjnej, współdzielona z mikropompą, następnie dystansownik elektrody ekstrakcyjnej (11), z wykonanym przelotowym otworem dystansownika elektrody ekstrakcyjnej, połączony mikro-kanalem górnym (12) z mikropompą, następnie anoda (10), z wykonanym otworem anody przykrytym membraną (8), na anodzie zaś znajduje się podłoże szklane główne (1), które ma wewnątrz wykonany kanał separacyjny (2) zawierający w swym ciągu membranę (8), zakoń-czony otworem wlotowym (3) i częścią wylotową (7), zaopatrzony w obszar detekcji (9) umieszczony przed częścią wylotową, z kanałem separacyjnym zaś skrzyżowany jest kanał dozujący (5) zakończony otworami wlotowo – wylotowymi (6), znajdujący się pomiędzy otwo-rem wlotowym kanału separującego (3) a membraną (8), ponadto ostrze krzemowe (17) oraz otwory w poszczególnych warstwach a także membrana (8), są współśrodkowe, zaś katoda (14) spolaryzowana jest napięciem ujemnym, którego wartość bezwzględna jest nie mniejsza niż 1000 V, elektroda ekstrakcyjna (11) spolaryzowana jest napięciem ujemnym mniejszym, bądź równym co do wartości, niż katoda, w szczególności potencjałem masy, a anoda (10) z membraną (8) znajduje się na potencjale masy.
2. Urządzenie według zastrz. 1, **znamiennie tym**, że pomiędzy dystansownikiem elektrody eks-trakcyjnej (11) a anodą (10) znajduje się dodatkowo elektroda ogniskująca (21), w której wy-konano przelotowy otwór elektrody ogniskującej (21a) oraz dystansownik elektrody ognisku-jącej (22), w którym wykonano otwór dystansownika elektrody ogniskującej (22a), przy czym otwory te są współśrodkowe z pozostałymi otworami przelotowymi.
3. Urządzenie według zastrz. 1, **znamiennie tym**, że część wylotowa (7) kanału separacyjnego (2) jest wykonana w formie dwóch odnóg (23) posiadających kanały wylotowe (4).
4. Urządzenie według zastrz. 1, **znamiennie tym**, że kanał dozujący (5) ma długość nie mniejszą niż 10 mm, a kanał separujący (2) długość nie mniejszą niż 30 mm, a ich szerokość jest nie większa niż 0.5 mm.
5. Urządzenie według zastrz. 1, **znamiennie tym**, że kanały dozujący (5) i separujący (5) przeci-nają się w odległości nie większej niż 5 mm od otworu wlotowego (3) kanału separującego (2).

6. Urządzenie według zastrz. 1, **znamiennie tym**, że na końcach kanałów dozującego (5) i separacyjnego (2) w ich otworach wlotowych/wylotowych znajdują się elektrody polaryzujące do wymuszania przepływu przez kanały zgodnie z procedurą badania.
7. Urządzenie według zastrz. 1, **znamiennie tym**, że membrana (8) ma kształt kwadratu, którego wymiar boku jest nie większy, niż szerokość kanału separującego (2) znajdującego się nad nią.
8. Urządzenie według zastrz. 1, **znamiennie tym**, że ostrze krzemowe (17) ma promień nie większy niż $10\ \mu\text{m}$ i wysokość nie większą niż połowa grubości katody (14).
9. Urządzenie według zastrz. 2, **znamiennie tym**, że w elektrodzie ekstrakcyjnej (11) oraz w elektrodzie ogniskującej (21) w części wyrzutni elektronowej wykonane są otwory o tych samych wymiarach nie większych niż $2 \times 2\ \text{mm}^2$.
10. Urządzenie według zastrz. 1, **znamiennie tym**, że otwory w dystansownikach mają wymiary większe niż wymiary największego otworu w elektrodach.

Rysunki

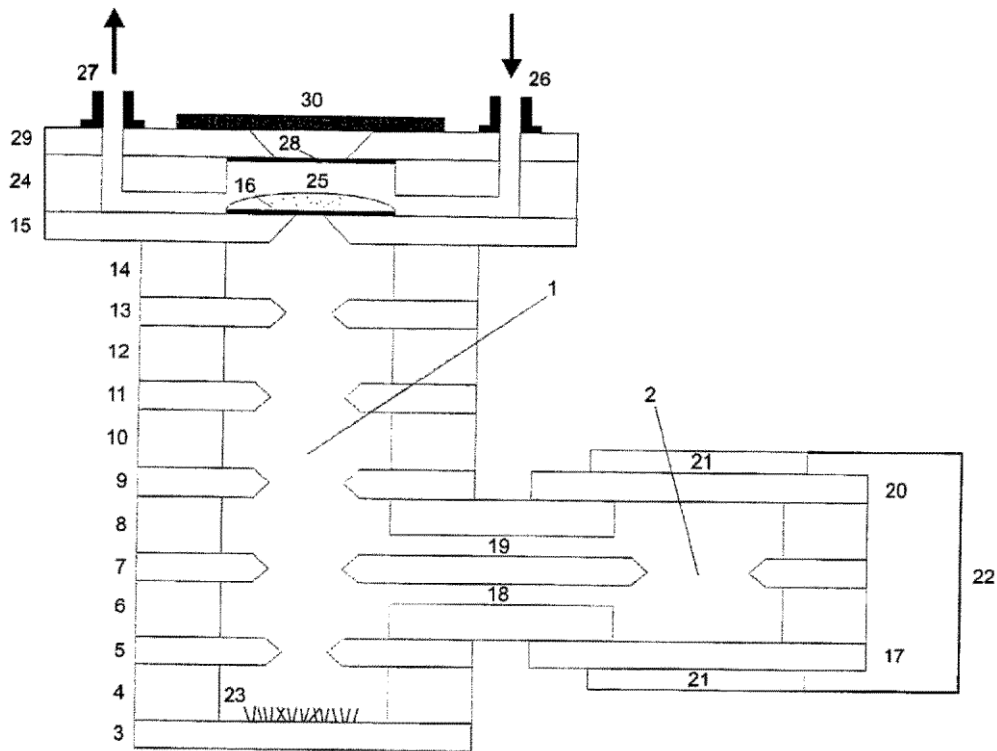


Fig. 1 - stan techniki

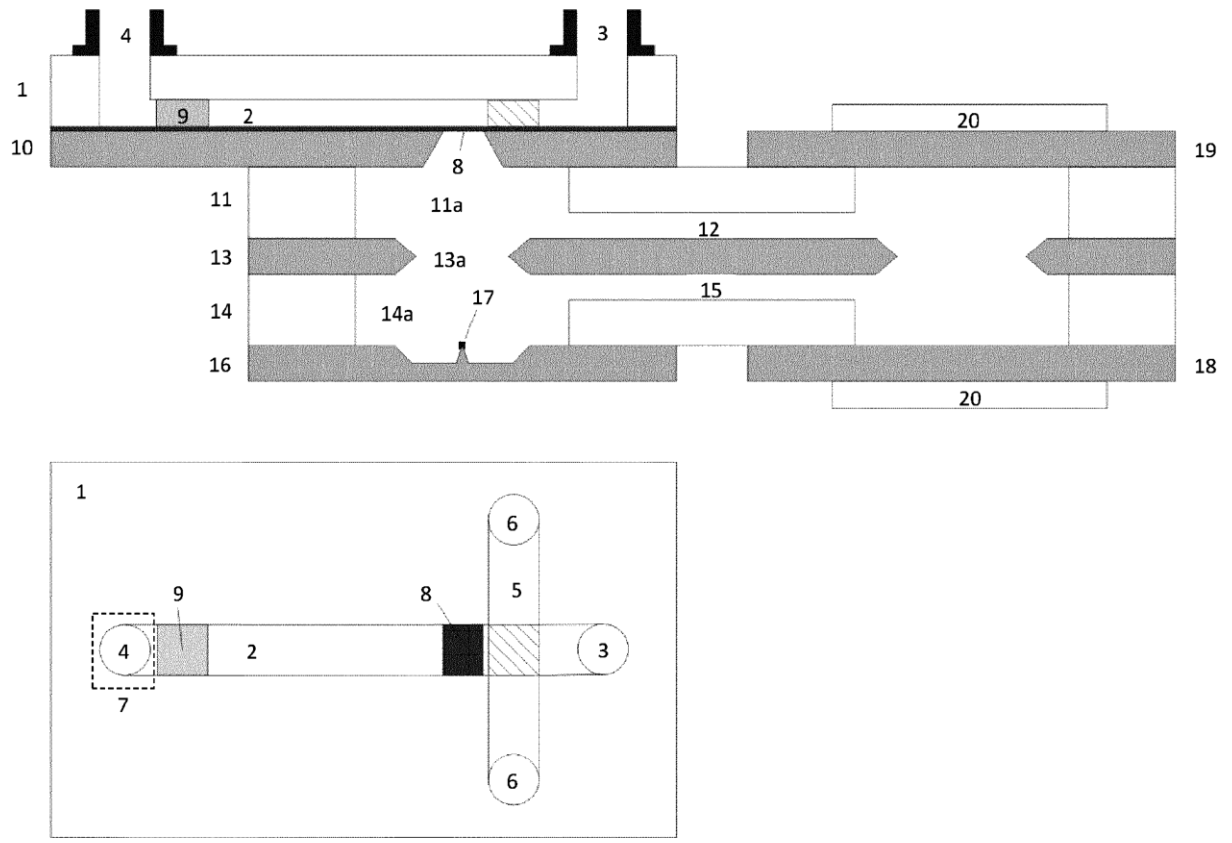


Fig. 2

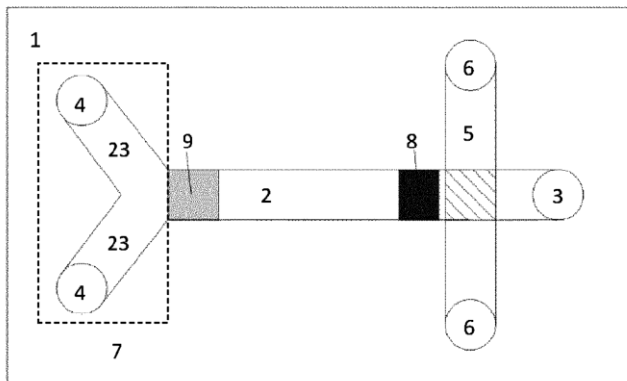
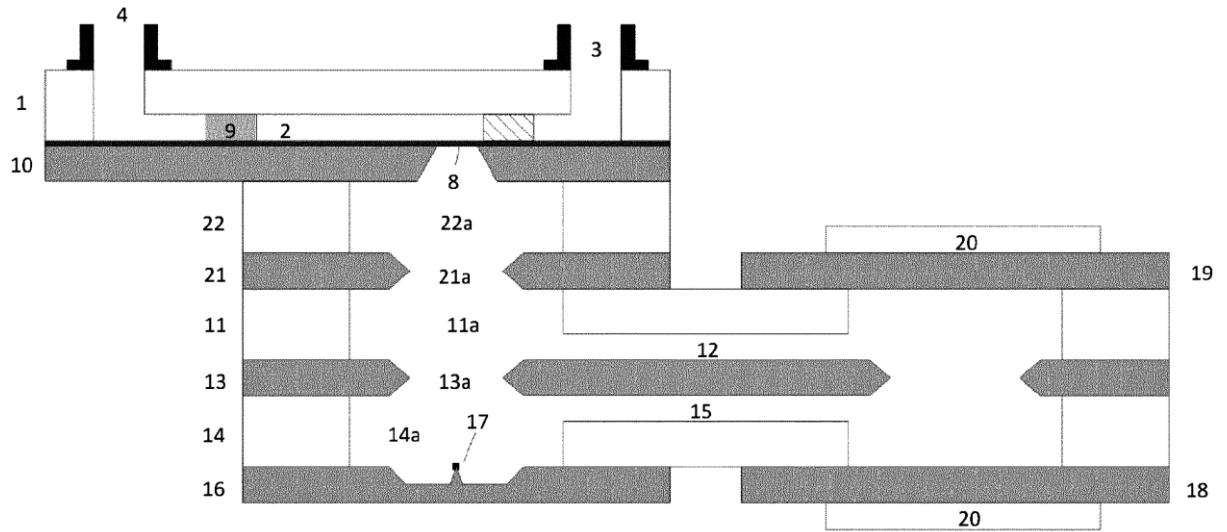


Fig. 3