



**TURUN
YLIOPISTO**

Mikrofluidistiset immunomääritykset

Laboratorioprosessien automatisointi helppokäyttöiselle testikasetille

Biokemian tutkinto-ohjelma (LuK)

Laatija:

Elsa Nieppola

29.4.2025

Turku

Turun yliopiston laatu järjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu

Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

Kandidatutkielma

Oppiaine: Biokemian tutkinto-ohjelma (LuK)

Tekijä(t): Elsa Nieppola

Otsikko: Mikrofluidistiset immunomääritykset - Laboratorioprosessien automatisointi helpokäyttöiselle testikasetille

Ohjaaja(t): Yliopistonlehtori Iida Martiskainen

Sivumäärä: 28 sivua

Päivämäärä: 29.4.2025

Perinteiset immunomääritykset vaativat hienostuneita laitteita ja kärsivät monimutkaisista prosesseista sekä pitkistä analyysiajoista, mikä rajoittaa niiden hyödyntämistä hoitohetkellä toteutettavaan diagnostiikkaan. Mikrofluidistiikan uskotaan tarjoavan ratkaisuja näihin ongelmiin, sillä se nähdään usein perinteisten laboratoriomenetelmien miniatyyriversiona, joka tarjoaa mahdollisuuden prosessin automatisointiin. Tämä työ on kirjallisuuskatsaus yleisimpiin ratkaisuihin mikrofluidististen immunomääritysten nesteenkuljetusmenetelmän, materiaalin, proteiinien immobilisointitekniikan sekä detektointimenetelmän kannalta.

Työssä huomattiin, että yleisiä aktiivisia nesteenkuljetusmenetelmiä ovat sähköiseen osmoosiin perustuva pumppu, sähköinen kostutus, mikropneumaattiset pumput, keskeiskiihtyvyys, magneetit sekä digitaaliset ratkaisut kun taas yleisiä passiivisia menetelmiä ovat kapillaarivoimat ja vakuumi. Mikrofluidistisissa immunomäärityksissä käytetään materiaalina yleensä lasia, piitä, paperia, termoplasteja, elastomeereja tai näiden yhdistelmiä. Nykyiset proteiinien immobilisointitekniikat perustuvat kovalenttisiin sidoksiin, adsorptioon, bioaffiniteettiin tai ionisidoksiin ja immobilisointia voidaan tehostaa pinnoittamalla laitteen kanavat immobilisointiin sopivalla materiaalilla. Analyytin määrää voidaan detektoida optisesti fluoresenssilla, luminesenssilla, pintaplasmoniresonanssilla (SPR), lämpölinssimikroskopiolla (TLM), aallonpituusohjatulla optisella tunnistuksella (WIOS), kolorimetrialla, fotoelektrokemialla (PEC) tai pintavahvistetulla Raman-sironnalla (SERS) tai vaihtoehtoisesti ei-optisesti sähkösensorilla, kvartsikiteen mikrotasapainolla (QCM), magneetielektronisella menetelmällä tai kaasuntuottoon pohjautuvalla ratkaisulla.

Työssä huomattiin, että mikrofluidistiset ratkaisut tarjoavat lähinnä pelkkää potentiaalia immunomääritysten ongelmien ratkaisuun, sillä toistaiseksi ne eivät vielä pysty kilpailemaan perinteisten immunomääritysten kanssa kustannuksissa tai herkkyydessä. Älylaitteiden uskotaan tarjoavan uusia mahdollisuuksia aktiivisten järjestelmien energiaratkaisuihin sekä tulosten detektointiin.

Avainsanat: Immunomääritykset, mikrofluidistiikka, mikrofluidistiset järjestelmät, lab on a chip, vieritestaus, potilaisläheinen diagnostiikka

Sisällysluettelo

1	Johdanto	4
2	Immunomääritykset	6
3	Mikrofluidistiikka	8
3.1	Aktiiviset järjestelmät	9
3.2	Passiiviset järjestelmät	11
3.3	Materiaalit	12
4	Mikrofluidistiikka immunomäärityksissä	16
4.1	Proteiinien immobilisaatio	16
4.2	Detektointimenetelmät	19
4.2.1	Optiset detektointimenetelmät	19
4.2.2	Ei-optiset detektointimenetelmät	22
4.3	Haasteet POC-sovelluksissa	24
5	Yhteenveto	25
	Lähteet	27

1 Johdanto

Immunomääritykset ovat yleisessä käytössä olevia testejä, joita voidaan soveltaa pienien molekyylien kuten metaboliittien ja lääkeaineiden (Lin ja muut, 2010), suurien proteiinien, nukleiinihappojen sekä kokonaisien solujen tunnistamiseen ja kvantifointiin spesifisesti ja herkästi antigeeni-vasta-ainereaktion avulla (Lin ja muut, 2010; Mou ja Jiang, 2017; Li ja muut, 2020). Monianalyyttimääritykset mahdollistavat useiden analyyttien tunnistamisen samasta näytteestä (Ng ja muut, 2010). Immunomäärityksiä hyödynnetään monella tieteenalalla kuten lääketieteellisessä diagnostiikassa, lääketutkimuksessa sekä ympäristö- ja elintarvikevalvonnassa nimenomaan määritysten spesifisyyden ja herkkyyden vuoksi (Lin ja muut, 2010). Niiden heikkoutena on kuitenkin monimutkaiset ja pitkät prosessit sekä kalliit laitekustannukset, minkä vuoksi ne harvoin soveltuvat sovellettaviksi paikoissa, joissa tarvittavat reagenssit ja laitteet eivät ole saatavilla (Ng ja muut, 2010; Mou ja Jiang, 2017; Shi ja muut, 2021).

Mikrofluidistiset järjestelmät, joita kutsutaan myös nimellä laboratorio sirulla (lab-on-a-chip, LOC) ovat pitkälle tutkittuja ja kehitettyjä laitteita, jotka perustuvat pienten nestemäärien tarkkaan kontrollointiin ja jotka mahdollistavat usean eri työvaiheen suorittamisen samalla alustalla ilman ihmistä vaativia välivaiheita (Mou ja Jiang, 2017). Ne nähdään usein erilaisten laboratorioprosessien pienoisversioina, sovelluskohteesta riippuen, ja ne tarjoavatkin mahdollisuuksia pienemmälle reagenssikulutukselle, määritysten automatisoinnille ja miniatyrisoinnille sekä analyysien nopeuttamiselle (Lin ja muut, 2010; Mou ja Jiang, 2017).

Mikrofluidistiset järjestelmät yhdistettynä immunomäärityksiin tarjoavat erilaisia mahdollisuuksia erilaisten biomarkkereiden spesifiseen ja herkkään tunnistamiseen jo hoitohetkellä (point-of-care, POC) (Shi ja muut, 2021; Salva ja muut, 2021). Niiden ollaan todettu olevan usein paitsi nopeampia ja kustannustehokkaampia kuin perinteiset määritykset, myös herkempiä, mikä osoittaa niiden potentiaalain laajempaa käyttöönottoa varten.

Tämän kandidaatintyön tarkoituksena on tutkia mikrofluidististen immunomääritysten eri osalueiden toteutustapojen peruseriaatteita ja mitä erityispiirteitä niihin liittyy. Työ on tehty kirjallisuuskatsauksena, jossa on käytetty laadukkaita tieteellisissä julkaisuissa julkaistuja artikkeleita ja tutkimuksia keskittyen vuosiin 2010-2024. Työssä käydään ensiksi läpi immunomääritysten perusteet, minkä jälkeen käsitellään mikrofluidististen järjestelmien peruspiirteitä ja toteutusmalleja. Tämän jälkeen työssä tarkastellaan, kuinka

immunomäärityksiä voidaan toteuttaa luotettavasti ja tehokkaasti mikrofluidistisilla alustoilla ja mitä haasteita näiden järjestelmien hyödyntämiseen liittyy POC-sovelluksissa. Lopulta yhteenvetoon on kerätty tämän tutkielman tärkeimmät löydökset sekä johtopäätökset.

2 Immunomääritykset

Vasta-aineet (antibodies, Ab) ovat ihmisten ja eläinten tuottamia proteiineja, joita tuotetaan vierasperäisiä aineita, antigeenejä (antigens, Ag), vastaan (Lin ja muut, 2010). Vasta-aineilla on uniikki rakenne, joka vastaa tietyn antigeenin rakennetta lukko-avainmekaniikalla. Immunomääritykset perustuvat näihin spesifisiin vasta-aine-antigeenivuorovaikutuksiin ja niillä voidaan tunnistaa joko vasta-aineita tai antigeenejä sovelluskohteesta riippuen, kunhan vuorovaikutuksen toinen osapuoli tunnetaan. Tästä syystä vasta-aineista ja antigeeneistä käytetään jatkossa termejä analyytin ja vastinmolekyylin.

Immunomäärityksissä hyödynnetään usein erilaisia leimamolekyylejä, joiden lähettämän signaalin voimakkuudesta voidaan päätellä analyytin pitoisuus (Li ja muut, 2020). Leimamolekyylin on konjugoituna analyytin tunnistavaan molekyylin ja sen lähettämä signaali on yleensä joko optinen tai sähkökemiallinen. Optiset leimat voivat olla esimerkiksi värillisiä, fluoresoivia tai emittoida kemiluminenssivaloa. Värilliset leimaratkaisut voidaan havaita paljaalla silmällä ja ne sopivat siksi nopeisiin, kvalitatiivisiin immunomäärityksiin, kun taas sähkökemiallisten ja optisten leimojen avulla voidaan tehdä herkkiä kvantitatiivisia mittauksia. Signaalin havaitsemisessa voidaan hyödyntää myös entsyymilinkattuja immunomäärityksiä, jotka tehostavat signaalin moninkertaiseksi (Olanrewaju ja muut, 2018). Leimaa hyödyntävät immunomääritykset voidaan jakaa heterogeenisiin ja homogeenisiin (Lin ja muut, 2010; Ng ja muut, 2010) sekä kilpaileviin ja ei-kilpaileviin määrityksiin (Lin ja muut, 2010).

Heterogeenisissä immunomäärityksissä antigeeni tai vasta-aine on immobilisoituna kiinteään alustaan, eli kiintokantajaan, kuten mikrotiiterilevyn kaivon pohjaan, magneettipartikkeliin, lasipintaan, PDMS- tai PMMA-alustaan, piialustaan tai mikrosiruun. (Lin ja muut, 2010; Ng ja muut, 2010). Tämä tarjoaa suuren pinta-ala-tilavuussuhteen ja parantaa määrityksen herkkyyttä (Lin ja muut, 2010). Heterogeeniset immunomääritykset mahdollistavat lisäksi kiintokantajan pesun, jolloin reaktiosta voidaan poistaa kaikki sitoutumattomat reagenssit, mikä helpottaa signaalinlukua.

Homogeenisissä määrityksissä reaktio tapahtuu liuoksessa, jossa sitoutuneita ja sitoutumattomia komponentteja voidaan erotella niiden fyysisten tai kemiallisten ominaisuuksien perusteella (Lin ja muut, 2010; Ng ja muut, 2010). Homogeeniset määritykset sisältävät usein vähemmän vaiheita kuin heterogeeniset määritykset, sillä alustaa ei tarvitse

pestä eri vaiheiden välissä. Ne voivat kuitenkin vaatia analyysin rikastamista prekonsentraation avulla ennen analyysin ajoa (Lin ja muut, 2010).

Kilpailevissa immunomäärityksissä signaalimolekyylillä merkitty proteiini kilpailee vastaavien merkitsemättömien analyyttimolekyylien kanssa sitoutumisesta tunnistajaproteiiniin (Lin ja muut, 2010; Li ja muut, 2020). Tällöin immunomäärityksestä mitattavan signaalin määrä on kääntäen verrannollinen analyysin määrän kanssa.

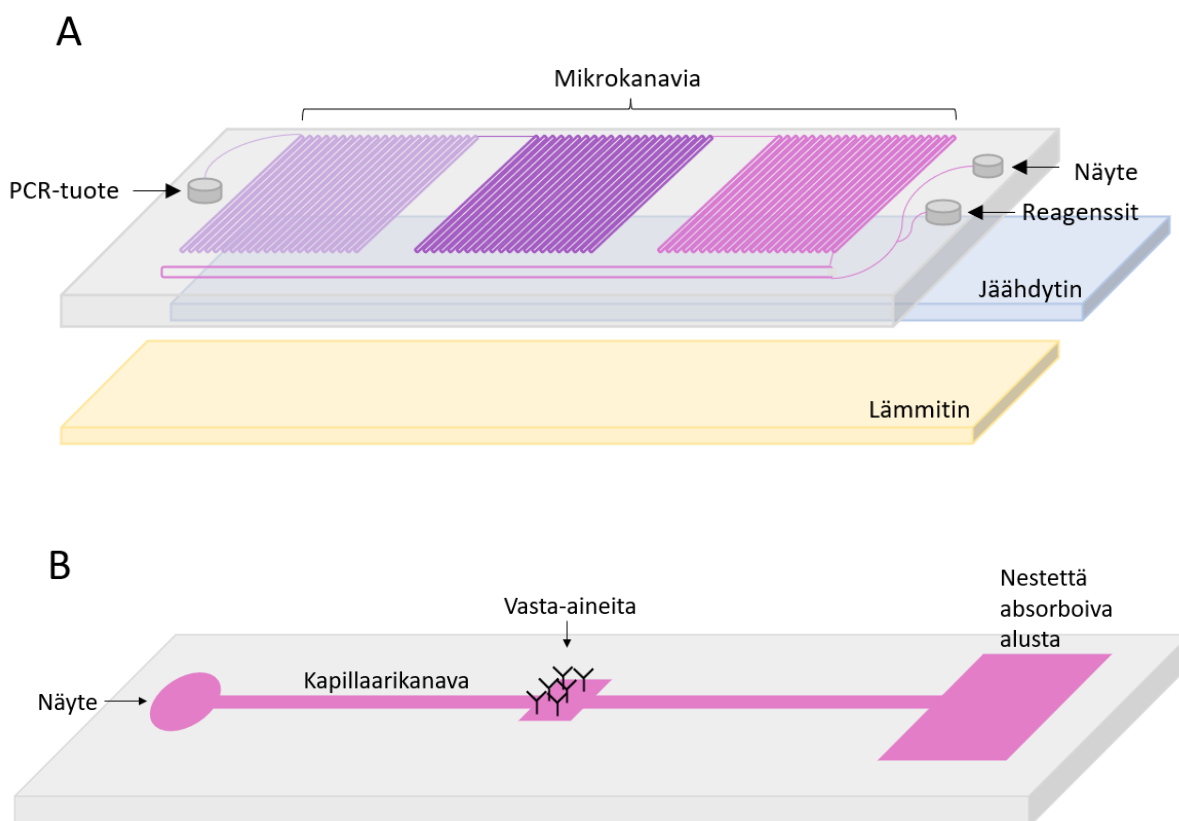
Ei-kilpailevissa immunomäärityksissä näytteen analyysi sitoutuu sen leimattuun vastinmolekyyliin, jolloin mitattava signaali on suoraan verrannollinen analyysin määrän kanssa (Lin ja muut, 2010). Yleinen ei-kilpaileva määrittäminen on immunometrinen immunomääritys (engl. sandwich immunoassay), joka hyödyntää heterogeenisen immunomäärityksen peruseräitä (Li ja muut, 2020). Siinä analyysi sitoutuu alustaan immobilisoituun vastinmolekyyliin, minkä jälkeen liuokseen lisätään toista, leimakonjugoitua vastinmolekyyliä, joka sitoutuu eri puolelle analyysiä. Mitatusta signaalista saadaan määritettyä analyysin määrä.

On olemassa myös leimattomia tunnistustekniikoita, kuten pintaplasmoniresonanssi (surface plasmon resonance, SPR), joissa ei tarvita erillistä molekyyliä signaalin lähettämiseen (Ng ja muut, 2010). Leimattomien menetelmien etuna on se, että osasta määrittäminen vaiheista ja reagensseista voidaan luopua kokonaan, mikä säästää sekä aikaa että kustannuksia. Osa leimattomista menetelmistä mahdollistaa myös reaaliaikaisen seurannan, jolloin saadaan tietoa reaktion kinetiikasta. Näiden syiden vuoksi leimattomien menetelmien ennustetaan yleistyvän tulevaisuudessa.

Immunomääritysten suurimpana haasteena on, että ne vaativat usein monia monimutkaisia työvaiheita sekä suuria ja kalliita laitteita analyysiä varten (Ng ja muut, 2010; Mou ja Jiang, 2017; Shi ja muut, 2021). Monimutkaisen prosessin vuoksi vain koulutetut ammattilaiset voivat suorittaa analyysiä ja silloinkin tulosten saaminen vaatii useita tunteja tai jopa päiviä (Ng ja muut, 2010; Mou ja Jiang, 2017). Lisäksi lähinnä vain lääketieteellisillä laboratorioilla sekä sairaaloilla on varaa hankkia immunomääritysten vaatimia laitteita, minkä vuoksi immunomääritykset eivät sovellu POC-sovelluksiin esimerkiksi terveyskeskuksissa.

3 Mikrofluidistiikka

Mikrofluidistiikalla tarkoitetaan nesteen ohjattua käsittelyä kanavissa, joiden halkaisija on usein kymmenien mikrometrien luokkaa (Mou ja Jiang, 2017). Mikrofluidistisia alustoja kutsutaan myös nimellä 'laboratorio sirulla' (lab-on-a-chip, LOC), sillä ne mahdollistavat erilaisten laboratorioprosessien miniatyrisoinnin ja integroinnin yhdelle alustalle (Lin ja muut, 2010). Näihin prosesseihin kuuluu muun muassa näytteen esivalmistelu, näytteen ja reagenssien kuljetus, sekoitus, reaktio, reaktion tuloksen havaitseminen sekä lopputuotteen kerääminen. Mikrofluidistiikkaa voidaan hyödyntää esimerkiksi polymeerasiketjureaktiossa (polymerase chain reaction, PCR) (kuva 1A) sekä immunomäärityksissä (kuva 1B) (Mou ja Jiang, 2017). Erilaisilla funktionaalisilla järjestelmillä kuten mikropumpuilla, -venttiileillä, -filttereillä, -reaktoreilla ja -erottimilla saadaan toteutettua täsmällisiä määrytyksiä (Lin ja muut 2010). Mikrofluidistisia järjestelmiä hyödynnetään erityisesti biotieteissä ja diagnostiikassa.



Kuva 1. Esimerkkejä mikrofluidistisista siruista. Kuvassa A on esitetty esimerkki PCR-reaktiossa käytettävästä mikrofluidistisesta järjestelmästä, joka on mukailtu lähteestä Yang ja muut (2022). Kuvassa B on esitetty esimerkki yksinkertaisesta mikrofluidistisesta immunomäärityksestä.

Mikrofluidististen järjestelmien merkittävimpiä etuja perinteisiin laboratoriomenetelmiin verrattuna on pienempi näyte- ja reagenssikulutus, lyhyempi analyysiaika sekä vähentynyt

kontaminaatoriski (Lin ja muut, 2010). Niissä on todettu olevan lisäksi hyvä herkkyys ja luotettavuus myös matalilla analyyttipitoisuuksilla (Kim ja Park, 2005; Lin ja muut, 2017; Zhou ja muut, 2018; Hemmig ja muut, 2020). Mikrofluidistisilla määrittäyksillä pystytään helposti automatisoimaan prosesseja, sillä koko reaktioketju voidaan suorittaa yhdellä alustalla (Lin ja muut, 2010). Tämän vuoksi ne sopivat usein kannettavaan muotoon ja niitä voidaan käyttää jo hoitokerran aikana. Kaikki edellä mainitut edut vaikuttavat myös järjestelmien hintaan, joka on usein vaihtoehtoisia menetelmiä halvempi.

Koska mikrofluidistiset järjestelmät määritellään ainoastaan nesteen ohjauksena mikrometrieni levyisissä kanavissa, niitä voidaan soveltaa monella eri tavalla. Yksi tapa jaotella mikrofluidistisia järjestelmiä on luokittelu sen mukaan, miten nestettä kuljetetaan kanavissa, jolloin järjestelmät voidaan jaotella aktiivisiin ja passiivisiin (Lin ja muut, 2010; Shi ja muut, 2021). Toinen tapa jaotella järjestelmät on niiden hyödyntämien materiaalien mukaan (Lin ja muut, 2010; Mou ja Jiang, 2017). Kaikista materiaalivaihtoehdoista on mahdollista rakentaa sekä aktiivisia että passiivisia järjestelmiä, mutta esimerkiksi paperiset järjestelmät hyödyntävät pääosin selluloosakuitujen mahdollistamaa passiivista kapillaari-ilmiötä, sillä se on yksi paperisten järjestelmien merkittävimmistä eduista (Mou ja Liang, 2017). Tämä kappale käy läpi tarkemmin erilaisia mikrofluidististen järjestelmien toteutustapoja sekä niiden etuja ja haasteita.

3.1 Aktiiviset järjestelmät

Aktiivisissa järjestelmissä nestettä ohjaa jokin ulkoinen voimanlähde kuten pumppu tai sentrifugilla aikaansaatua keskeiskiihtyvyyttä (Mou ja Liang, 2017). Aktiiviset järjestelmät tarvitsevatkin lisäksi sähköä vaativia laitteita, jotka rajoittavat järjestelmien kuljetettavuutta, kokoa ja sovellettavuutta POC tilanteissa syrjäisillä tai resurssiköyhillä alueilla. Voimanlähdettä voidaan käyttää myös liikkeen hienovaraisempaan hallintaan muun muassa venttiilien kautta (Lin ja muut, 2010). Vaikka aktiiviset järjestelmät tarjoavatkin tarkkaa virtauksenohjausta, ne voivat kuitenkin olla kalliita ja monimutkaisia käyttää (Lin ja muut, 2010; Olanrewaju ja muut, 2018). Yleisiin aktiivisiin nesteenkuljetusmenetelmiin lukeutuvat sähköiseen osmoosiin perustuva pumppu, sähköinen kostutus, mikropneumaattiset pumput, keskeiskiihtyvyyttä (Lin ja muut, 2010) sekä magneetit (Shi ja muut, 2017).

Sähköiseen osmoosiin perustuva pumppu perustuu sähköosmoottiseen virtaukseen (electro osmotic flow, EOF), jossa hyödynnetään sähköä nesteen kuljettamiseen (Lin ja muut, 2010). EOF:ssä kanavan seinämä on varautunut, usein negatiivisesti, jolloin nesteen sisältämän vastaionit vetäytyvät kohti seinämiä neutraloidakseen sähkövarauksen, jolloin syntyy

kaksoiskerros. Kun kanavaan ajetaan sähkövirta, kaksoiskerroksessa olevat vastaionit liikkuvat kohti katodia (tai anodia), mikä johtaa nesteen virtaukseen. Nesteen pH sekä ionien vahvuus vaikuttavat nesteen virtausnopeuteen. Sähköiseen osmoosiin perustuvat pumput mahdollistavat nesteiden tarkan ja tehokkaan siirron ilman liikkuvia mekaanisia osia ja sitä voidaan käyttää virtausten ohjaamiseen, vaihtamiseen ja pysäyttämiseen hallitsemalla sovellettua sähköistä kenttää. Niiden etuna on liikkuvien mekaanisten osien puute, mikä vähentää kulumista ja parantaa järjestelmän kestävyyttä, niiden helppo automatisoitavuus ja hallittavuus sekä sovellettavuus monimutkaisiin ja pienikokoisiin mikrofluidistisiin järjestelmiin.

Sähköinen kostutus (electrowetting) on menetelmä, jossa nestepisaroita manipuloidaan asettamalla ohjelmoidut jännitteet elektrodirivistöön (Lin ja muut, 2010). Tekniikassa hyödynnetään sähköjännitteen vaikutusta nesteen pintajännitteeseen alustalla, jolloin pisaroita voidaan siirtää, yhdistää, erottaa ja sekoittaa. Menetelmässä reagenssit ja näyte laitetaan alustalle erillisinä pisaroina, minkä jälkeen pisaroita manipuloidaan prosessille soveltuvalla tavalla. Se soveltuu erityisesti heterogeenisiin immunomäärityksiin, joissa yhdistellään magneettisia mikropartikkeleita sekä kemiluminesenssihavaintoja. Sen etuna on alhaiset kustannukset ja yksinkertainen laitteisto, automatisoitavuus ja nopeus sekä kyky suorittaa monivaiheisia prosesseja ilman monimutkaista laitteistoa.

Mikropneumaattiset pumput hyödyntävät paineistettua ilmaa nesteiden siirtämiseen kanavissa (Lin ja muut, 2010). Ne koostuvat nestevirtauskanavasta, joustavista polydimetyylisiloksaanikalvoista (PDMS-kalvot) ja ilmakammioista, joihin pumpattava paineistettu ilma mahdollistaa kanavan seinämien taivuttamisen ja täten nesteen liikkumisen. Järjestelmiin voidaan lisätä venttiileitä, jotka mahdollistavat korkeat pumppausnopeudet ja vähentävät nesteen takaisinvirtausta ja tästä johtuvaa kontaminaatoriskiä. Mikropneumaattisten pumppujen heikkoutena on, että ne sopivat vain joustaville materiaaleille.

Keskeiskiihtyvyyteen perustuvissa nesteen kuljetusmenetelmissä hyödynnetään alustan pyörimisestä aiheutuvaa keskeiskiihtyvyyttä, mikä saa nesteen liikkumaan kauemmas pyörimisakselista (Lin ja muut, 2010). Tästä aiheutuva voima ylittää kapillaarivoiman, mikä yleensä estää nestettä liikkumasta kammioista toiseen. Menetelmä mahdollistaa monimutkaisten laboratoriotointojen automatisoinnin kompaktiin muotoon, sillä sen avulla voidaan suorittaa näytteen ja reagenssien siirto, titraus ja laimennus, näytteen sekoitus, komponenttien erottelu sekä optinen havaitseminen. Keskeiskiihtyvyyttä hyödyntävien laitteiden haasteena on, että

ulkoiset voimanlähteet kuten kompressorit tai moottorit lisäävät järjestelmien monimutkaisuutta ja kustannuksia ja se vaatii usein liikkuvia osia tai tarkkaa sähköistä ohjausta.

Magneettiset mikrofluidistiset järjestelmät hyödyntävät magneettisia mikropartikkeleita ohjaamaan nestepisaroita ja biomolekyylejä mikrokanavissa ilman suoraa kosketusta (Shi ja muut, 2021). Sen etuna on, että se on vähemmän riippuvainen pinnan varauksesta, ionivahvuudesta ja pH:sta verrattuna sähköisiin mikrofluidistisiin menetelmiin. Lisäksi magneettiset nanopartikkelit mahdollistavat kiintokantajien käytön mikrokanavissa sekä auttavat analyysin eristämässä ja rikastamisessa.

Viimevuosien merkittävimpiin mikrofluidistisiin läpimurtoihin lukeutuu digitaaliset mikrofluidistiset ratkaisut (digital microfluidics, DMF), jotka hyödyntävät perinteisiä aktiivisen kuljetuksen menetelmiä, mutta nestemäärät ovat huomattavasti pienempiä ja prosessit ovat automatisoidumpia (Shi ja muut, 2021). DMF:ssä käsitellään nesteitä yksittäisinä pisaroina, joita voidaan siirtää, yhdistää ja jakaa mikrokanavissa sähköisten, optisten tai magneettisten kenttien avulla. Sen suurimpiin etuihin lukeutuu sen tarkka nestemäärien hallinta, mahdollisuus suorittaa reaktioita pienissä tilavuuksissa ilman haihtumisongelmia sekä mahdollisuus automaattiseen ja ohjelmoitavaan nestemanipulaatioon.

3.2 Passiiviset järjestelmät

Passiiviset järjestelmät eivät vaadi ulkoista voimanlähdettä, vaan ne hyödyntävät luonnollisia voimia, kuten kapillaarivoimia (Lin ja muut 2010). Passiivisten menetelmien etuna onkin niiden helppo kuljetettavuus ja soveltuvuus POC:hen sekä etäisille ja resurssiköyhille alueille (Lin ja muut, 2010; Olanrewaju ja muut, 2018). Passiiviset järjestelmät eivät kuitenkaan kykene yhtä hienovaraiseen nesteen hallintaan kuin aktiiviset järjestelmät. Yleensä passiiviseen nesteenkuljetukseen perustuvat mikrofluidistiset järjestelmät hyödyntävät kapillaarivoimaa tai vakuumia (Lin ja muu, 2010).

Kapillaarivoimaan perustuvassa mikrofluidistisissa järjestelmissä neste liikkuu oman pintajännityksensä ja alustan hydrofiilisyyden yhteisvaikutuksesta (Lin ja muut, 2010; Olanrewaju ja muut, 2018). Menetelmä on erityisen yleinen paperipohjaisissa ratkaisuissa, sillä paperin selluloosakuidut muodostavat luonnostaan nestettä kuljettavia kapillaareja kuitujen välille. Järjestelmät ovat hyvin automatisoituja ja tarjoavat käyttäjälleen helppokäyttöisyyttä, minkä vuoksi ne sopivatkin erityisesti POC-tilanteisiin. Kapillaarivoimia voidaan hyödyntää myös venttiileinä keskeiskiihtyvyyteen perustuvissa järjestelmissä, jolloin kapillaarivoimat

pysäyttävät nesteen virtauksen määritetyssä kohdassa ilman ulkoisia laitteita (Lin ja muut, 2010).

Vakuumia hyödyntävissä järjestelmissä mikrofluidistisiin kanaviin luodaan tyhjiö, mikä aiheuttaa nesteen kulkeutumisen eteenpäin paine-eron tasaamiseksi (Lin ja muut, 2010). Vakuumi voidaan tehdä laitteeseen jo valmistusvaiheessa, jolloin laitteen käyttäminen ei vaadi loppukäyttäjältä erillistä voimälähdettä. Vakuumi sopii parhaiten yksinkertaisiin analyysitapauksiin tai kertakäyttöisiin järjestelmiin.

3.3 Materiaalit

Mikrofluidistisen järjestelmän valmistusmateriaali vaikuttaa merkittävästi sen hintaan, optisiin, kemiallisiin ja fyysisiin ominaisuuksiin sekä järjestelmän tuotantoon ja kokoamiseen (Mou ja Jiang, 2017). Tuotanto ja kokoaminen puolestaan vaikuttavat omalta osaltaan järjestelmän edellä mainittuihin ominaisuuksiin. Mou ja Jiang (2017) mainitsevatkin viisi asiaa, jotka tulisi huomioida materiaalia valittaessa: materiaalin valmistusmenetelmät, materiaalin kyky tukea erilaisia mikrofluidistisia toimintoja, sen toiminnalliset ominaisuudet, muokattavuus sekä hinta. Tähän mennessä mikrofluidistisissa järjestelmissä on hyödynnetty piitä, lasia, polymeerejä ja paperia. Joissain määrityksissä ollaan käytetty myös metallia, puuvillaa, bambua ja sellofaania. Tässä kappaleessa käsitellään yleisimmät immunomäärityksissä käytettävät materiaalit, niiden haitat ja hyödyt, jotka ovat listattuna taulukkoon 1.

Pii on yksi ensimmäisistä mikrofluidistisissa laitteissa käytetyistä materiaaleista (Lin ja muut, 2010; Mou ja Jiang, 2017). Sillä on hyvä lämmönjohtavuuskyky ja se kestää korkeita lämpötiloja sekä vahvoja liuottimia, minkä vuoksi se sopii hyvin esimerkiksi PCR:ään ja bioreaktioihin (Lin ja muut, 2010). Pii on erinomainen materiaali kun reaktiot vaativat pisaranmuodostusta, kuten sähköisessä kostutuksessa, kapillaarista elektroforeesia ja liuottimen eristystä äärimmäisissä olosuhteissa (Mou ja Jiang, 2017). Piin merkittävimpiä haasteita ovat sen kalliit valmistuskustannukset (Lin ja muut, 2010; Mou ja Jiang, 2017), vaikea pinnan muotoiltavuus ja kokoaminen (Mou ja Jiang, 2017), läpinäkymättömyys sekä sähköjohtokyky (Lin ja muut, 2010). Materiaalin läpinäkymättömyys estää optisen detektion sirulta, jolloin tuloksen havainnointiin on käytettävä muita keinoja, kun taas sähköjohtavuus haittaa nesteen elektrokineettistä kuljetusta ja analyysin elektrokemiallista havainnointia. Lisäksi pii ei päästä kaasumolekyylejä lävitseen, minkä vuoksi sillä on rajoittuneet sovellusmahdollisuudet solujen tutkinnassa (Mou ja Jiang, 2017). Myös toimivien venttiilien liittäminen piipohjaisiin laitteisiin on osoittautunut hankalaksi.

Lasia on alettu hyödyntämään mikrofluidisistisissa järjestelmissä hieman myöhemmin kuin piitä ja sillä on samat edut määritysten kannalta kuin piilläkin (Lin ja muut, 2010). Toisin kuin pii, lasi ei johda sähköä, joten lasisilla alustoilla on mahdollista detektoida elektrokemiallisia reaktioita. Lisäksi lasin läpinäkyvyys mahdollistaa optisen detektion. Lasin haittapuolina piin tapaan on korkeat valmistuskulut, hankala pinnan muotoiltavuus ja kokoaminen, kaasun läpäisemättömyys sekä haasteet venttiilien integroinnissa (Lin ja muut, 2010, Mou ja Jiang, 2017).

Mikrofluidisistisissa järjestelmissä hyödynnettäviin polymeereihin lukeutuu pääosin termoplastit sekä elastomeerit (Mou ja Jiang, 2017). Yleisiin termoplasteihin lukeutuvat muun muassa polymetyylimetakrylaatti (PMMA), polykarbonaatti (PC), polyetylenitereftalaatti (PET) sekä polystyreeni (PS). Termoplastien merkittävänä etuna on, että niitä voidaan valmistaa perinteisillä muovin massatuotantomenetelmillä ja niistä on helppo rakentaa toiminnallisia siruja liittämällä osia yhteen liimalla ja lämpöä käyttämällä. Ne kestävät lisäksi erilaisia vahvoja liuottimia ja niihin saadaan helposti integroitua elektrodeja joustavien sähköpiirien luomiseksi. Toisin kuin piin ja lasin tapauksessa, termoplastien pintaa on helppo muokata käyttötarkoitukseen sopivaksi, mikä antaa niille laajemmat sovellusmahdollisuudet. Termoplastien haasteena on kuitenkin lasin ja piin tapaan venttiilien integroinnin hankaluus, kalliit valmistuskulut pienillä eräkoilla, kaasun läpäisemättömyys sekä vaikeus luoda pieniä kanavia materiaalin sisään.

Elastomeerit ovat nimensä mukaisesti elastisia polymeerejä (Mou ja Jiang, 2017). Ne ovat joustavia ja niitä on helppo muotoilla, minkä vuoksi niihin on helppo integroida venttiileitä ja muita nesteenhallintajärjestelmiä sekä muokata kanavien pinta-alan ja tilavuuden välistä suhdetta. Materiaali, jolla on korkea pinta-ala-tilavuussuhde, toimii erinomaisesti immunomäärityksissä käytettävien proteiinien immobilisoimiseen, sillä tällöin analyytillä on suurempi todennäköisyys kohdata ja sitoutua proteiiniin. Ne soveltuvat esimerkiksi mikropneumaattisia pumppuja hyödyntäviin järjestelmiin ja elastomeerien läpinäkyvyys mahdollistaa tulosten optisen detektoinnin. Yleisin mikrofluidistiikassa hyödynnetty elastomeeri on PDMS, jonka merkittävimpänä etuna on, että se päästää happea ja hiilidioksidia lävitseen ja on myrkytön soluille, minkä vuoksi sitä voidaan käyttää elävien solujen tutkimiseen. PDMS:n haasteena on kuitenkin sen yhteensopimattomuus orgaanisten liuottimien kanssa, epävakaa pintakemia, huono lämmönsietokyky, biomolekyylien adsorptio sekä veden ja ilman läpäisevyys. Lisäksi PDMS:n massatuotanto on vielä haastavaa (Mou ja Jiang, 2017) vaikka se onkin mahdollista (Lin ja muut, 2010). Jos laitteilla halutaan hyödyntää erilaisia

nesteenhallintajärjestelmiä, ne vaativat usein suuria ulkoisia laitteita nesteen hallintaan, jotka rajoittavat PDMS:n hyödyntämistä POC tarkoitukseen.

Paperi on yleinen mikrofluidistisissa laitteissa käytetty materiaali, sillä se on halpaa, helposti valmistettavaa eikä vaadi ulkoista voimanlähdettä, sillä neste liikkuu kanavissa selluloosan muodostamien kapillaarien ansiosta (Mou ja Jiang, 2017). Paperi sopiikin siis erinomaisesti kapillaarivirtausmäärittämiin ja helposti operoitavien kertakäyttöisten POC-ratkaisujen materiaaliksi. Sillä on myös suuri pinta-ala-tilavuussuhde, mikä tarjoaa suuren pinta-alan proteiinien immobilisoinnille. Paperin suurimpana heikkoutena on sen rajoitetut sovelluskohteet, jotka johtuvat huonosta herkkydestä ja rajatuista virtausreittivaihtoehdoista. Paperilla ei myöskään ole mahdollista toteuttaa monimutkaisia määrittämiä, jotka vaativat useita eri reaktioreittejä.

Taulukko 1. Mikrofluidistisissa järjestelmissä hyödynnettävät materiaalit, niiden haitat hyödyt sekä sovelluskohteet. Mukailtu lähteestä Mou ja Jiang (2017).

Materiaali	Hyödyt	Haitat	Sovelluskohteet
Pii	Hyvä lämmönjohtavuus ja lämmön sietokyky Kestää vahvoja liuottimia Sopii vaativiin ja tarkkoihin määrittäisiin	Kallis Rajoittunut pinnan muotoiltavuus Kallis ja hankala kokoaminen Kaasun läpäisemättömyys Yhteensopimattomuus venttiilien kanssa Läpinäkyvätön Johtaa sähköä	Sähköinen kostutus Kapillaarinen elektroforeesi Liuottimen eristys Monimutkaiset määrittäykset PCR
Lasi	Hyvä lämmönjohtavuus ja lämmön sietokyky Kestää vahvoja liuottimia Sopii vaativiin ja tarkkoihin määrittäisiin Eristää sähköä Läpinäkyvä (optinen detektio) Eristää sähköä (sopii elektrokemialliseen detektioon)	Kallis Rajoittunut pinnan muotoiltavuus Kallis ja hankala kokoaminen Kaasun läpäisemättömyys Yhteensopimattomuus venttiilien kanssa	Sähköinen kostutus Kapillaarinen elektroforeesi Liuottimen eristys Monimutkaiset määrittäykset Optinen ja elektrokemiallinen detektio PCR Elektrokineettinen kuljetus
Termoplastit	Sopii massatuotantoon Kestää vahvoja liuottimia Helppo koota Sopii joustaviin sähköverkkoihin Helppo pinnan muokattavuus	Kaasun läpäisemättömyys Yhteensopimattomuus venttiilien kanssa Kallista pienillä eräkoilla Pienten kanavien luominen haastavaa	Keskeiskiihtyvyyteen perustuvat järjestelmät
Elastomeerit/PDMS	Joustavuus ja helppo muotoiltavuus Nestehallintajärjestelmien integroitavuus Läpinäkyvä (optinen detektio) Kaasun läpäisevyys ja myrkyttömyys Helppo ja halpa valmistaa	Yhteensopimattomuus orgaanisten liuottimien kanssa Epävakaat pintakemia Biomolekyylien adsorptio Veden ja ilman läpäisevyys Huono lämmönsieto- ja johtamiskyky Vaativat usein suuria ulkoisia laitteita	Mikropneumaattiset pumput Solumäärittäykset Sähköiseen osmoosiin perustuvat pumput
Paperi	Halpa Helposti valmistettava Ei tarvitse ulkoista voimanlähdettä Sopii kertakäyttöisiin järjestelmiin	Matala herkkyys Puolikvantitatiivinen mittaus Rajalliset virtausreitit Sopii vain yksinkertaisiin määrittäisiin	Kapillaarivirtausmäärittäykset Kertakäyttöiset laitteet

4 Mikrofluidistiikka immunomäärityksissä

Mikrofluidistiikan avulla pystytään ratkaisemaan immunomääritysten perinteisiä ongelmia, sillä se mahdollistaa automatisoidut työvaiheet, nopeat analyysiajat sekä pienet näytemäärät (Lin ja muut, 2010; Ng ja muut, 2010; Mou ja Jiang, 2017). Lisäksi mikrofluidistiset järjestelmät alentavat usein immunomääritysten muita kustannuksia vähentämällä tarvittavien reagenssien määrää sekä työvaiheisiin kuluva energiaa. Mikrofluidistiset immunomääritykset ovat lisäksi perinteisiä immunomäärityksiä herkempiä ja niiden toistotarkkuus on parempi automatisoinnin vuoksi (Lin ja muut, 2010; Ng ja muut, 2010). Mikrofluidistisia immunomäärityksiä hyödynnetäänkin niiden luotettavuuden, nopeuden sekä helppouden vuoksi erilaisilla tieteenaloilla kuten elintarviketeollisuudessa, ympäristötutkimuksessa, lääketieteen diagnostiikassa sekä erilaisissa tutkimussovelluksissa kuten proteomiikassa (Ng ja muut, 2010; Mou ja Jiang, 2017; Shi ja muut, 2021).

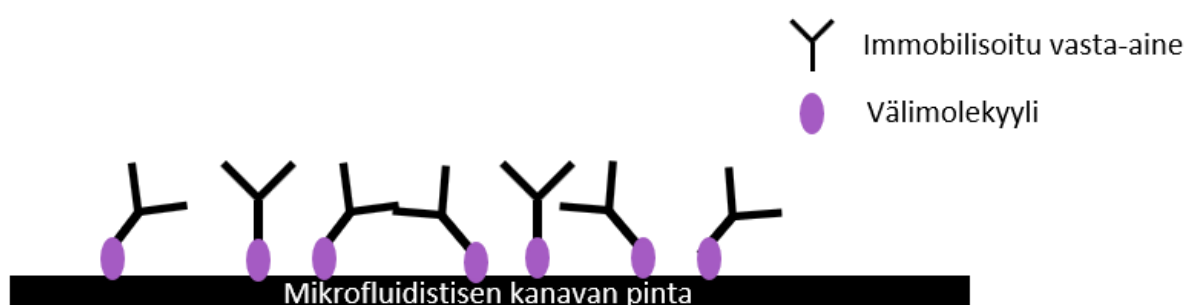
Mikrofluidistisiin laitteisiin pystytään integroimaan kaikkia immunomääritystyyppisiä ja immunomäärityksiä pystytään suorittamaan kaikilla mikrofluidistisissa järjestelmissä käytettävillä menetelmillä ja materiaaleilla. Mikrofluidististen immunomääritysten kehittämiseen ja valmistamiseen liittyy kuitenkin erityisiä piirteitä, jotka on otettava huomioon. Yksi huomioon otettava seikka on proteiinien immobilisointimenetelmä, joka vaikuttaa suoraan immunomäärityksen herkkyyteen, tarkkuuteen ja toistettavuuteen (Lin ja muut, 2010; Kim ja Herr, 2013; Salva ja muut, 2021). Toinen huomioitava piirre on signaalin detektointimenetelmä, mikä vaikuttaa tuloksen lukemiseen sekä tulkintaan (Lin ja muut, 2010). Lisäksi määritysratkaisuihin liittyy rajoitteita, jotka toistaiseksi heikentävät niiden hyödyntämistä POC sovelluksiin (Lin ja muut, 2010; Mou ja Jiang, 2017).

4.1 Proteiinien immobilisaatio

Proteiinien immobilisoinnin tarkoituksena on kiinnittää reaktiossa tarvittavat biomolekyylit kuten vasta-aineet, antigeenit tai entsyymit mikrofluidistisen laitteen pintaan siten, että proteiinien aktiivisuus säilyy (Kim ja Herr, 2013; Salva ja muut, 2021). Proteiinien immobilisoinnin avulla voidaan muun muassa kohdistaa signaalin mittaus tietylle alueelle, mikä helpottaa tulosten lukemista ja parantaa määrityksen herkkyyttä ja toistettavuutta (Kim ja Herr, 2013). Tämä mahdollistaa lisäksi useamman määrityksen suorittamisen samanaikaisesti, sillä eri reaktioiden tulokset voidaan lukea eri puolilta alustaa (Kim ja Herr, 2013; Salva ja muut, 2021). Yleisimmät kiinnitysmenetelmät perustuvat kovalenttisiin sidoksiin, fysikaaliseen

adsorptioon tai bioaffinitettiin, mutta myös pinnan ja proteiinin välisiä ionisidoksia voidaan hyödyntää (Kim ja Herr, 2013).

Kovalenttisissä immobilisointimenetelmissä proteiinit kiinnitetään alustan pintaan funktionaalisten ryhmien, kuten amino-, karboksyyli- tai tioliryhmien, avulla (Kim ja Herr, 2013; Salva ja muut, 2021). Ne tarjoavat vahvaa ja pysyvää kiinnitystä, mutta voi vaikuttaa proteiinin konformaatioon tai aktiivisuuteen negatiivisesti. Pinnan ja proteiinin väliin voidaan kuitenkin lisätä välimolekyyli (spacer), joka sitoutuu toisella päällään pintaan ja toisella päällä proteiiniin, mikä antaa enemmän kontrollia kiinnitettävän proteiinin suuntautumisesta (kuva 2).



Kuva 2. Vasta-aineen immobilisointi mikrofluidistisen kanavan pintaan välimolekyylillä. Kuvassa havainnollistettu, kuinka välimolekyylin avulla voidaan vaikuttaa immobilisoitujen vasta-aineiden orientaatioon mikrofluidistisen kanavan pinnalla.

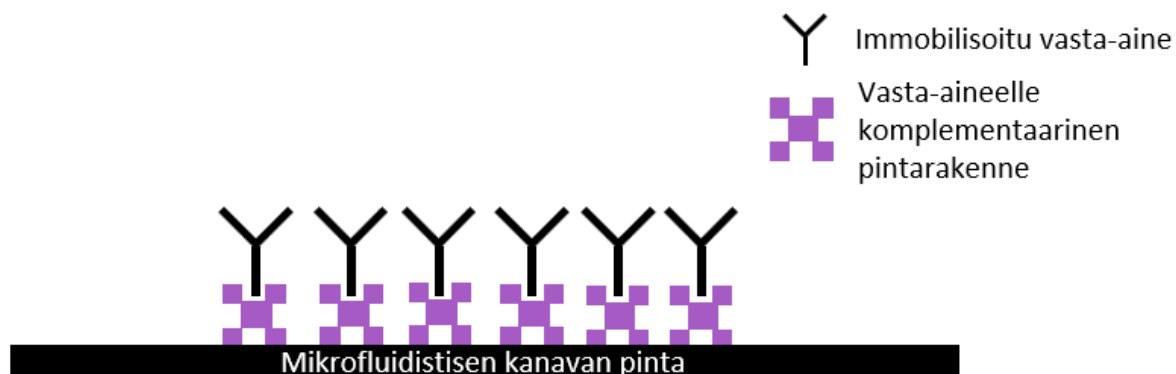
Fysikaalinen adsorptio perustuu heikkoihin vuorovaikutuksiin, kuten Van der Waalsin voimiin sekä hydrofobisiin vuorovaikutuksiin, proteiinin ja alustan pinnan välillä (Kim ja Herr, 2013; Salva ja muut, 2021). Se on menetelmänä helppo ja halpa, sillä se ei vaadi kemiallista muokkausta, mutta kiinnittyminen on heikkoa ja epävakaata ja voi silti johtaa proteiinin aktiivisuuden menettämiseen (kuva 3).



Kuva 3. Vasta-aineen immobilisointi adsorptiolla. Adsorptiolla immobilisoidut vasta-aineet kiinnittyvät mikrofluidistisen kanavan pintaan heikoilla vuorovaikutuksilla. Tämän vuoksi ne voivat sitoutua pintaan huonossa orientaatioissa, mikä voi johtaa aktiivisuuden menettämiseen.

Bioaffiniteettiin perustuvassa immobilisoinnissa hyödynnetään spesifisiä vuorovaikutuksia alustan ja proteiinin välillä (kuva 4) (Kim ja Herr, 2013; Salva ja muut, 2021). Tämä menetelmä säilyttää hyvin proteiinien aktiivisuuden, sillä se ei muuta proteiinin rakennetta tai peitä sen

määrityksen kannalta aktiivista pintaa, ja sitoo pintaansa vain haluttuja proteiineja, mikä parantaa laitteen herkkyyttä. Bioaffiniteettiin perustuvat menetelmät ovat kuitenkin kalliita ja monimutkaisia toteuttaa (Kim ja Herr, 2013).



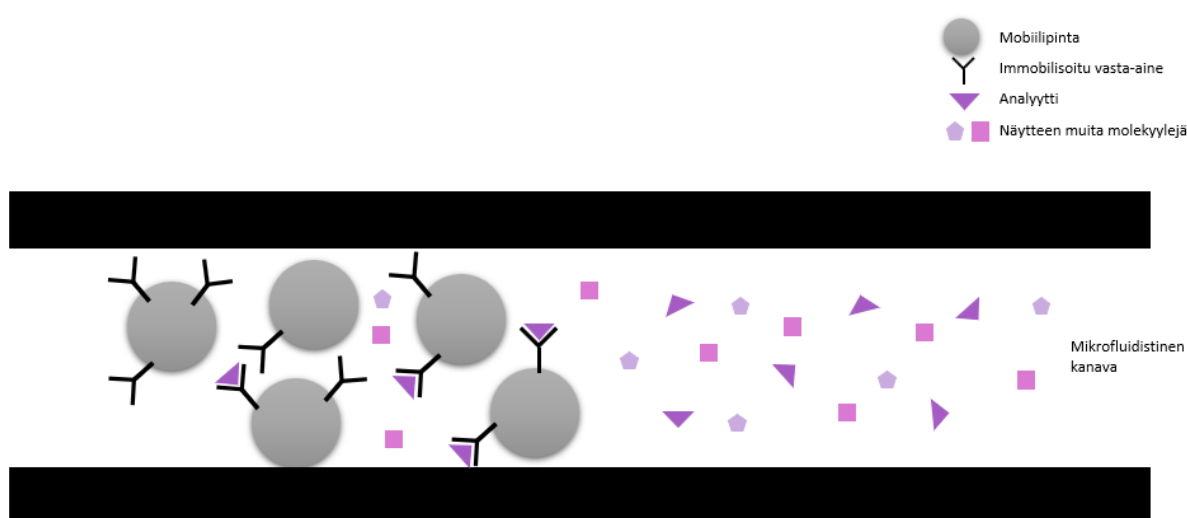
Kuva 4. Spesifisiin vuorovaikutuksiin perustuva vasta-aineen immobilisaatio. Kuvassa mikrofluidistisen kanavan pinnassa on vasta-aineelle spesifisiä pintarakenteita, jolloin vain haluttu vasta-aine kiinnittyy pintaan ja sen aktiivisuus saadaan säilytettyä.

Valittavaan immobilisointimenetelmään vaikuttaa suuresti järjestelmän materiaali sekä sen pintarakenne (Salva ja muut, 2021). Lasi- ja piiratkaissuissa materiaalin pinta on tasainen, mikä mahdollistaa yksinkertaisen proteiinin immobilisoinnin, mutta materiaalin 2D-rakenne rajoittaa immobilisoitavien proteiinien määrää sekä niiden tiheyttä. Suuressa osassa polymeeripohjaisista järjestelmistä materiaali ei mahdollista proteiinien suoraa kiinnitystä laitteen pintaan, jolloin pintaa tulee muuttaa kemiallisesti tai lisätä siihen esimerkiksi metallipinnoite.

Kolmiulotteiset materiaalit tarjoavat suuremman pinta-ala-tilavuussuhteen, mikä tarjoaa proteiineille enemmän sitoutumispaikkoja ja lyhentää diffuusiomatkaa, nopeuttaa reaktiota sekä lisää määrityksen tarkkuutta (Salva ja muut, 2021). Huokoiset materiaalit, kuten paperi ja nitroselluloosa, tarjoavat luonnostaan paljon sitoutumispaikkoja proteiineille, mutta niiden immobilisointi perustuu pääosin adsorptioon. Tällöin proteiinit voidaan lisätä laitteeseen vasta kokoamisen jälkeen. Eri materiaaleihin pystytään kuitenkin lisäämään hydrogeelistä tai muista polymeereistä tehtyjä kalvoja, mikro- ja nanopartikkeleita, helmiä tai grafeenia ennen laitteen kokoamista, mikä lisää proteiinien immobilisointimahdollisuuksia tekemällä pinnasta 3D-rakenteisen sekä luomalla uusia vuorovaikutuksia pinnan ja proteiinin välille.

Proteiinin immobilisoiminen staattiselle alueelle on yleistä ja käyttäjystävällistä, sillä se mahdollistaa signaalin luvun määrättyltä alueelta, mutta sen heikkoutena on, että näytteen pienipitoisten molekyylien havaitseminen voi silti vaatia suuria määriä näytettä (Salva ja muut,

2021). Ongelma voidaan ratkaista kanavan sisään asennettavilla liikutettavilla kiintokantajilla eli mobiilipinnoilla, kuten mikro- tai nanopartikkeleilla, joihin on immobilisoitu analyytin vastinmolekyylejä (kuva 5). Mobiilipinnat lisäävät analyytin ja sen vastinmolekyylin kohtaamistodennäköisyyttä, mikä lisää menetelmän herkkyyttä. Mobiilipinnoissa voidaan hyödyntää esimerkiksi magneettisia vuorovaikutuksia, jolloin magneettisia partikkeleita liikutetaan ulkoisen magneetin avulla, tai mobiilipartikkelien liikettä voidaan hallita nestevirtauksen avulla. Etenkin proteiinien immobilisoimiseen liikkuvien partikkelien pinnoille voidaan käyttää samoja tekniikoita kuin staattisten pintojen tapauksessa riippuen mobiilipartikkelien materiaalista.



Kuva 5. Mobiilipinnat mikrofluidistisissa järjestelmissä. Kuvassa mobiilipintaan on immobilisoitu analyytin vasta-aineita. Mobiilipintoja voidaan liikuttaa mm. magneetin avulla, mikä lisää analyytin ja vasta-aineen kohtaamistodennäköisyyttä sekä mahdollistaa niiden erottelun muusta näytemateriaalista.

4.2 Detektointimenetelmät

Detektiomenetelmä viittaa menetelmään, jolla spesifinen antigeenin tunnistus muunnetaan luettavaksi signaaliksi. Mikrofluidistisissa järjestelmissä hyödynnetään sekä kilpailevia että ei-kilpailevia immunomäärityksiä signaalin mittaamiseen (Shi ja muut, 2021), joten signaalin tulkinnassa pitää ottaa huomioon käytetty menetelmä. Yleisesti detektiomenetelmät voidaan jakaa optisiin sekä ei-optisiin detektiomenetelmiin (Lin ja muut, 2010).

4.2.1 Optiset detektointimenetelmät

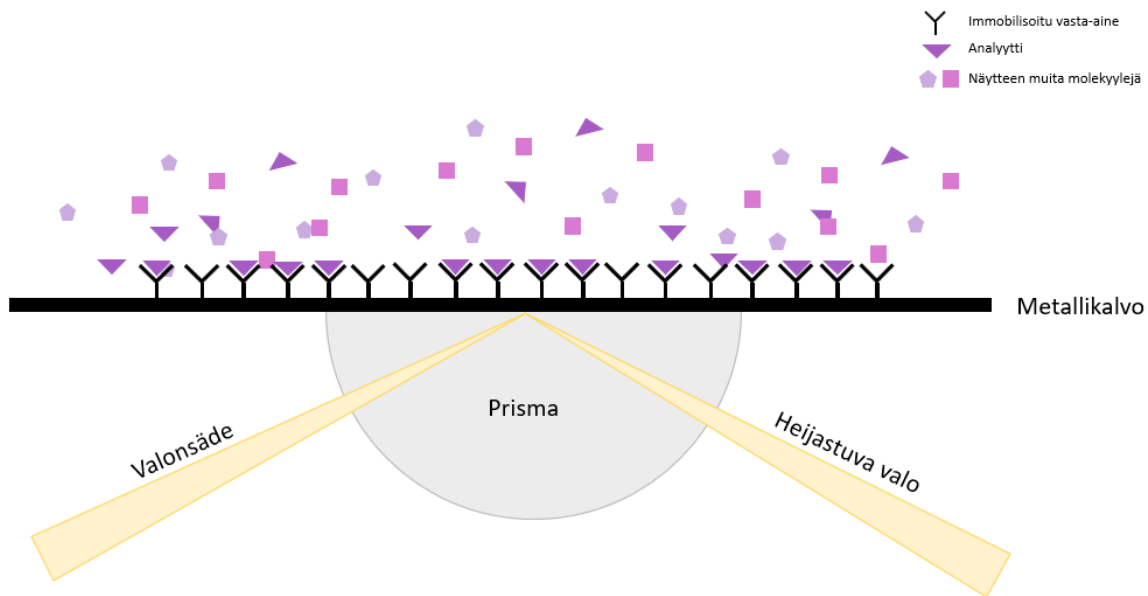
Optisiin detektiomenetelmiin lukeutuvat fluoresenssi, luminesenssi, pintaplasmoniresonanssi (SPR), lämpölinssimikroskopia (thermal lens microscope, TLM), Aallonpituusohjattu optinen tunnistus (Wavelength Interrogated Optical Sensing, WIOS), kolorimetria sekä

fotoelektrokemia (photoelectrochemistry, PEC), pintavahvistettu Raman-sironta (Surface-enhanced Raman scattering, SERS) (Lin ja muut, 2010; Shi ja muut, 2021; Su ja muut, 2024). Näistä fluoresenssi, luminesenssi ja kolorimetria hyödyntävät erillisiä leima-aineita kun taas SPR, TLM, WIOS, PEC ja SERS perustuvat immuunikompleksien luontaisiin ominaisuuksiin (Lin ja muut, 2010; Su ja muut, 2024). Optisissa detektiomenetelmissä pitää kuitenkin huomioida, etteivät kaikki mikrofluidististen alustojen materiaalit sovi optiseen lukuun niiden läpinäkymättömyyden vuoksi, ellei alustaan tehdä reikää tulosten lukemiseksi.

Fluoresenssi ja luminesenssi ovat yleisiä mikrofluidistisissa immunomäärityksissä käytettäviä detektointimenetelmiä niiden herkkyyden vuoksi (Lin ja muut, 2010). Su ja muut (2024) jaottelevat luminesenssin vielä erikseen suoraksi luminesenssiksi sekä entsymaattiseksi luminesenssiksi. Suorassa luminesenssissa käytetään kemiallisia leimayhdisteitä, kuten luminolia, jotka emittoivat valoa hapettumisreaktiossa ja joiden emittoiman valon intensiteetti pystytään mittaamaan ja sitä kautta tunnistamaan analyytin määrä. Suora luminesenssi on menetelmänä helppo käyttää ja sillä on nopea vasteaika, mutta vaati usein signaalin vahvistusmenetelmiä lisäksi eikä se sovellu eri analyyttien tunnistamiseen samasta näytteestä. Entsymaattinen luminesenssi hyödyntää vasta-aineeseen liitettyä entsyymiä, joka muuttaa substraattia luminesenssia tuottavaksi aineeksi. Sillä on suoraa luminesenssia parempi herkkyys ja suuri detektioalue, mutta entsyymit vaativat toimiakseen tiukat reaktio-olosuhteet eivätkä myöskään sovi multiplex-sovelluksiin. Fluoresenssin haasteena puolestaan on fluoroforien leimaamisen työläys (Lin ja muut, 2010).

Kolorimetriset määritykset perustuvat tiettyjen yhdisteiden taipumukseen absorboida valoa tietyllä näkyvällä aallonpituudella, jolloin alustalla voidaan nähdä selkeä värin muutos (Lin ja muut, 2010; Su ja muut, 2024). Esimerkiksi kultapartikkelien valon sironta muuttuu, kun vasta-aine sitoutuu antigeeniin muuttaen sen konformaatiota, mikä saa aikaan värin muutoksen alustalla. Tällaisissa määrityksissä tulosten kvantifiointi on kuitenkin hankalaa. Luminesenssimääritysten tapaan, myös kolorimetrisessä detektiossa voidaan hyödyntää entsyymejä, kuten alkalista fosfataasia tai piparjuuriperoksidaasia, reaktion aikaansaamiseksi, jolloin signaalista saadaan vahva myös alhaisissa analyyttipitoisuuksissa. Kolorimetriset mittaukset ovat helppokäyttöisiä ja mahdollistavat kvalitatiivisen analyysin myös silmämääräisesti, mutta kvantitatiivinen määritys täytyy tehdä absorbanssimittausten avulla, mikä tarvitsee fluoresenssi- ja luminesenssimääritysten tavoin ulkoisia laitteita. Uudemmissa järjestelmissä tuloksia on onnistuttu kvantitoimaan jopa älypuhelimien avustuksella (Man ja muut, 2017; Wu ja muut, 2017; Shang ja muut, 2019; Zheng ja muut, 2019).

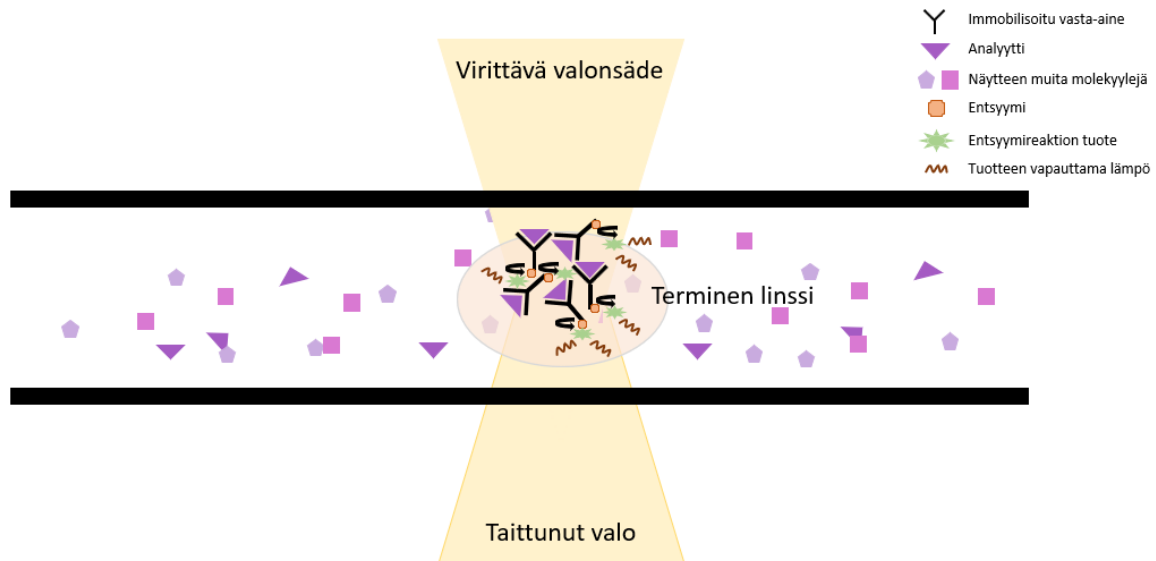
SPR perustuu haihtuvien valoaaltojen aiheuttamaan plasmoniresonanssiin kahden eri materiaalin rajapinnassa eikä siksi vaadi erillistä leima-ainetta (kuva 6) (Lin ja muut, 2010; Su ja muut, 2024). Sillä on nopea vasteaika ja sopii siksi reaaliaikaiseen seurantaan, minkä vuoksi sitä käytetäänkin immuunikompleksien muodostumisen havainnointiin. Sen haasteena mikrofluidististen immunomääritysten kannalta on kuitenkin korkea tekninen kynnyksensä sekä kalliit laitekustannukset (Su ja muut, 2024).



Kuva 6. Pintaplasmoniresonanssin mekanismi. Analyytin sitoutuminen vasta-aineeseen metallikalvon pinnalla aiheuttaa muutoksen metallikalvon ja prisman välisen rajapinnan plasmoniresonanssiin, mikä puolestaan aiheuttaa muutoksia heijastuvan valonsäteen kulmaan ja intensiteettiin.

SERS hyödyntää ilmiötä, jossa metallinanorakenteeseen adsorboidun molekyylin Raman-sironta vahvistuu, kun siihen ohjataan lasersäde (Su ja muut, 2024). Se on erittäin herkkä leimavapaa detektointimenetelmä, sillä se samaan aikaan vahvistaa sähkökenttiä plasmonisen vaikutuksen avulla ja tehostaa analyyttien Raman-sirontaa (Su ja muut, 2024). Sen avulla voidaan myös tunnistaa useampia biomolekyyliä samasta näytteestä, mikä lisää sen käyttömahdollisuuksia monimutkaisissa analyyseissä. Sen heikkoutena on kuitenkin huono signaali-taustamelusuhde sekä pitkät signaalinlukuajat.

TLM:ssä näytteeseen ohjataan lasersäde, mikä virittää näytemolekyylit, minkä jälkeen ne vapauttavat lämpöä ja täten muuttavat paikallisen taitekertoimen arvoa (Lin ja muut, 2010). Tämä reaktio muodostaa ”termisen linssin”, joka voidaan mitata ja analyytin määrä määrittää. TLM sopii erittäin pienten analyyttimäärien kvantifiointiin. TLM voidaan yhdistää ELISA-määritysten kanssa (kuva 7) ja niiden yhdistelmällä uskotaankin olevan käyttökohteita lähitulevaisuudessa.



Kuva 7. Lämpölinssimikroskopian toimintamekanismi ELISA-määrittämisessä. Analyytin sitoutuminen vasta-aineeseen johtaa vasta-aineeseen kiinnitetyn entsyymin aktivoitumiseen. Aktivoitunut entsyymi muuttaa näytteenesteeseen lisätyn substraatin tuotteeksi, joka voidaan virittää lasersäteellä. Virittynyt tuote vapauttaa lämpöä, mikä johtaa termisen linssin muodostumiseen. Termisen linssi muuttaa valon taitekerrointa ja muutos voidaan mitata detektorilla.

WIOS hyödyntää aallonpituudeltaan säädettävää valonlähdettä ja dielektristä aallonohjainta, joiden yhdistelmän avulla saadaan näytteestä resonanssiipiikki, joka on suoraan verrannollinen adsorboituneen analyytin määrään (Lin ja muut, 2010). WIOS:issa nähdään potentiaalia päivittäisiin, nopeisiin ja automatisoituihin määrittäksiin laboratorioden ulkopuolella.

PEC viittaa fotoelektriseen konversioon, joka tapahtuu, kun materiaaliin ohjattu valo virittää ja siirtää materiaalin sähkövarauksia (Zhao ja muut, 2017). Se voidaan jakaa potentiometriseen ja amperometriseen detektioon. PEC:t ovat uudenlaisia detektointimenetelmiä mikrofluidistisissa immunomäärittämissä, mutta niiden hyödyntäminen on silti rajoittunutta, sillä käytettävän sensorin fotoaktiivisuus on riippuvainen fotoaktiivisesta puolijohtimesta (Shi ja muut, 2021).

4.2.2 Ei-optiset detektointimenetelmät

Ei-optiset detektointimenetelmät eivät hyödynnä valoa biomolekyylien tunnistamiseen ja sopii siksi myös läpinäkymättömille materiaaleille. Tällaisiin detektointimenetelmiin lukeutuvat erilaiset sähköön perustuvat ratkaisut (Lin ja muut, 2010; Su ja muut, 2024), kvartsikiteen mikrotasapaino (Quartz Crystal Microbalance, QCM), magneetoelektroniset menetelmät (Lin ja muut, 2010), sekä kaasuntuottoon pohjautuvat ratkaisut (Yu ja muut, 2024).

Sähköön perustuvat biosensorit voidaan jakaa yleisesti kolmeen kategoriaan riippuen siitä, kuinka sähköinen signaali mitataan: sähkökemialliset biosensorit, kenttävaikutustransistori

(field effect transistor, FET) biosensorit sekä impedanssi biosensorit (Su ja muut, 2024). Elektrokemialliset sensorit tunnistavat elektrodilla tapahtuvat, hapetus-pelkistysreaktioista johtuvat, elektroninsiirrot, jotka korreloivat analyytin määrään kanssa, kun taas FET-sensorit määrittävät analyytin määrän mittaamalla sähkövirtaa tai potentiaalia puolijohtimella. Impedanssiin perustuvat biosensorit puolestaan mittaavat rajapinnan impedanssia, mikä voidaan yhdistää analyytin määrään näytteessä. Sähköensensoreilla on yleisesti hyvä herkkyys ja spesifisyys, minkä ansiosta niillä voidaan detektoida useita parametreja. Etenkin sähkökemialliset sensorit ovat fluoresenssi- ja kemiluminesenssileimojen tavoin yleisiä, sillä ne sopivat hyvin miniatyrisointiin (Lin ja muut, 2010). Sähköön perustuvat sensorit sopivat SPR:n tavoin reaaliaikaiseen seurantaan, mutta niiden heikkoutena on, että ne vaativat spesifisiä elektrodeja, joita ei voida uusiokäyttää (Su ja muut, 2024).

QCM mittaa analyytin sitoutumisesta johtuvaa massan muutosta kvartsikiteen pinnalla, mikä aiheuttaa kiteen värähtelytaajuuden muutoksen (Lin ja muut, 2010). Analyytin määrä voidaan määrittää mitatun muutoksen perusteella. Toisin kuin sähkökemian perustuvat sensorit, QCM:tä hyödyntävät laitteet voidaan pestä ja käyttää uudestaan.

Magnetoelektroniset menetelmät hyödyntävät leima-aineena mikromagneettisia helmiä, jolloin analyytin tunnistaneet immuunikompleksit voidaan erottaa muusta näytemateriaalista magneettisen sensorin avulla (Lin ja muut, 2010). Yhdistettynä kannettavaan magneettisensoriin, menetelmä on paitsi luotettava, myös helppo ratkaisu mikrofluidistisiin immunomäärityksiin.

Kaasua tuottavat mikrofluidistiset järjestelmät ovat lähiaikoina kehitetty innovaatio, joka perustuu analyytin tunnistuksesta syntyvien kaasujen detektoimiseen (Yu ja muut, 2024). Menetelmissä käytettävät leima-aineet tuottavat kaasua, jonka syntyminen voidaan tunnistaa etäisyyden, paine-eron, lämmön tai visuaalisen signaalin perusteella. Kaasuntuottoon perustuvat detektointijärjestelmät ovat nopeita, helppokäyttöisiä, halpoja sekä mahdollistavat suoran tuloksen lukemisen. Niiden haasteena on kuitenkin reaktioissa hyödynnettävien platinananopartikkelien (PtNP) korkea hinta, epästabiilius normaaleissa työolosuhteissa sekä huono aktiivisuus pintamodifikaatioiden johdosta. Lisäksi kaasua tuottavat detektiomenetelmät perustuvat usein ei-kilpaileviin immunomäärityksiin, joka vaatii useaa erilaista vasta-ainetta.

4.3 Haasteet POC-sovelluksissa

Vaikka mikrofluidistisissa immunomäärityksissä nähdään paljon potentiaalia nopeaan ja tarkkaan biomolekyylien tunnistamiseen, niiden käytännön sovelluksiin ja laajempaan käyttöönottoon liittyy vielä ongelmia (Lin ja muut, 2010; Mou ja Jiang, 2017; Shi ja muut, 2021). Ensimmäinen ongelma on, että resurssiköyhille alueille ja POC-sovelluksiin hyvin soveltuvat passiiviset laitteet harvoin pystyvät yhtä tarkkaan detektointiin kuin aktiiviset järjestelmät (Shi ja muut, 2021). Passiiviset järjestelmät eivät kuitenkaan vaadi ulkoisia laitteita, joten kaikki määrittäykseen tarvittava teknologia saadaan integroitua suoraan alustalle. Näiden ominaisuuksien vuoksi ne soveltuvat hyvin käyttötarkoituksiin, joissa ei tarvita herkkää kvantitatiivista analyysiä. Tällaisiin lukeutuvat muun muassa raskaustestit sekä COVID19-vasta-ainekotitestit.

Toisena haasteena nähdään, että tarkkaan ja spesifiseen analyysiin soveltuvat aktiiviset mikrofluidistiset immunomääritykset vaativat ulkoista voimanlähdettä nesteen kuljetukseen ja toisinaan myös tulosten lukemiseen, mikä rajoittaa niiden soveltuvuutta alueilla, joilla on heikko sähköverkosto (Mou ja Jiang, 2017; Shi ja muut, 2021). Yhtenä ratkaisuna ongelmaan Lapins ja muut (2024) ovat kehittäneet mikrofluidistiselle alustalleen sentrifuugin, jota pystytään käyttämään älypuhelimesta saatavan sähkövoiman avulla. Tämän kaltaiset miniatyyriratkaisut voisivat toimia myös pumppuja tai muita sähköisiä nesteenkuljetusmenetelmiä hyödyntäville ratkaisuille, jolloin ne sopisivat paremmin kuljetettaviin mikrofluidistisiin ratkaisuihin ja lisäisivät alustojen levinneisyyttä.

Kolmas haaste mikrofluidististen immunomääritysten hyödyntämisen kannalta on, että samalla kun tutkijat keskittyvät laitteiden miniatyrisointiin ja kustannusten vähentämiseen, laitteiden toiminnallisuus ja herkkyys yleensä kärsivät (Shi ja muut, 2021). Tähän ongelmaan uskotaan tulevaisuudessa löytyvän apua tekoälystä, älypuhelimista, 5G teknologiasta sekä data-analytiikasta, jotka mahdollistavat uudenlaisia ratkaisuja mikrofluidististen immunomääritysten toteuttamiseen. Tämän nähdään parantavan laitteiden soveltuvuutta POC-sovelluksiin myös resursseiltaan rajoittuneilla alueilla.

Edellä mainituista syistä johtuen mikrofluidististen laitteiden ei nähdä vetävän vertoja vielä perinteisille laboratoriosseille kustannusten ja suorituksen osalta (Mou ja Jiang, 2017). On kuitenkin selvää, että jo nykyisillä teknologioilla mikrofluidistiset järjestelmät soveltuvat hyvin analyyseihin, joita ei ole mahdollista tai järkevää suorittaa hyvin varustellussa laboratoriossa johtuen joko ajan tai tarvittavien resurssien puutteesta.

5 Yhteenveto

Mikrofluidistiset immunomääritykset ovat osoittaneet suurta potentiaalia ratkaisemaan perinteisten, laboratoriossa suoritettavien immunomääritysten ongelmia. Ne tarjoavat mahdollisuuksia muun muassa pienempään reagenssien ja energian kulutukseen, prosessien automatisointiin sekä nopeampaan ja tarkempaan analyysiin. Mikrofluidistiikka on kuitenkin kattotermi monille eri järjestelmille, jotka perustuvat pienien nestemäärien hallintaan alustalla, joten on tärkeää kartoittaa, mitä eri tekijöitä on otettava huomioon mikrofluidistisia immunomäärityksiä suunniteltaessa.

Tämä kandidaatintyö kävi läpi eri nesteenhallintatapoja, materiaaleja, proteiinien immobilisointimenetelmiä sekä analyysin detektointitekniikoita, joita hyödynnetään mikrofluidistisissa immunomäärityksissä. Nesteen kuljetuksessa voi hyödyntää ulkoista energiaa vaativia aktiivisia järjestelmiä, joihin lukeutuvat sähköiseen osmoosiin perustuva pumppu, sähköinen kostutus, mikropneumaattiset pumput, keskeiskiihtyvyys, magneetit sekä digitaaliset ratkaisut. Niiden ongelmana on kuitenkin niiden rajoittunut soveltuvuus POC-käyttökohteisiin, joihin soveltuu paremmin passiiviset menetelmät kuten kapillaarivoima sekä vakuumi. Passiiviset järjestelmät eivät kuitenkaan tarjoa yhtä tarkkaa nestevirran kontrollia kuin aktiiviset vaihtoehdot. Menetelmää valittaessa tuleekin siis huomioida järjestelmän käyttötarkoitus sekä -ympäristö; onko tärkeämpää saada tarkkoja tuloksia ulkoisten laitteiden avulla vai saada suurpiirteisiä tuloksia missä tahansa ympäristössä.

Mikrofluidistisen immunomääritysalustan materiaali vaikuttaa oleellisesti järjestelmän hintaan, optisiin, kemiallisiin ja fyysisiin ominaisuuksiin sekä järjestelmän tuotantoon ja kokoamiseen. Ensimmäiset mikrofluidistiset immunomääritykset on valmistettu lasista ja piistä, mutta termoplastit ja elastomeerit ovat viimeaikoina osoittaneet parempia kemiallisia ja fyysisiä ominaisuuksia mikrofluidististen immunomääritysten toiminnan kannalta halvemmalla hinnalla. Paperipohjaiset ratkaisut ovat halpoja ja yksinkertaisia operoida eivätkä ne usein vaadi ulkoista nesteenkuljetuslaitetta, mutta ne soveltuvat harvoin tarkkoihin tai monimutkaisiin mittauksiin. Materiaalia valitessa tulee kuljetusmenetelmän tavoin huomioida järjestelmän käyttötarkoitus sekä -ympäristö, mutta myös käytettävä proteiinien immobilisointi- sekä analyysin detektiotekniikka.

Proteiinien immobilisointitekniikka vaikuttaa suoraan analyysin herkkyYTEEN, tarkkuuteen sekä toistettavuuteen. Yleensä proteiinit kiinnitetään alustan pintaan kovalenttisilla sidoksilla,

adsorptiolla tai bioaffinitetin avulla, mutta joskus myös pinnan ja proteiinin välisillä ionisidoksilla. Immobilisointimenetelmään vaikuttaa materiaalin pintakemia sekä fyysinen rakenne, mutta materiaalin pinta voidaan myös pinnoittaa toisella materiaalilla immobilisointimahdollisuuksien parantamiseksi.

Analyysin detektointimenetelmät jaetaan yleisesti optisiin sekä ei optisiin menetelmiin, joista optiset menetelmät sopivat lähinnä vain läpinäkyville materiaaleille. Optisiin tekniikoihin lukeutuvat fluoresenssi, luminesenssi, pintaplasmoniresonanssi (SPR), lämpölinssimikroskopia (thermal lens microscope, TLM), aallonpituusohjattu optinen tunnistus (Wavelength Interrogated Optical Sensing, WIOS), kolorimetria, fotoelektrokemia (photoelectrochemistry, PEC) sekä pintavahvistettu Raman-sirona (Surface-enhanced Raman scattering, SERS). Ei optisiin menetelmiin lukeutuvat sähköön perustuvat ratkaisut, kvartsikiteen mikrotasapaino (Quartz Crystal Microbalance, QCM), magnetoelektroniset menetelmät sekä kaasuntuottoon pohjautuvat ratkaisut. Näistä fluoresenssi, luminesenssi, kolorimetria, magnetoelektroniset sekä kaasua tuottavat menetelmät hyödyntävät erillisiä leima-aineita kun taas SPR, TLM, WIOS, PEC, SERS, QCM sekä sähköbiosensorit perustuvat immuunikompleksien luontaisiin ominaisuuksiin. Detektointimenetelmää valittaessa tulee huomioida alustan materiaalin ominaisuudet, reaktion vaatimat olosuhteet sekä mahdollisen leima-aineen vaikutukset immuunikompleksien stabiiliuteen.

Mikrofluidistisiin immunomäärityksiin liittyy vielä paljon haasteita niiden laajan käyttöönoton kannalta. Toistaiseksi ne eivät vielä pysty kilpailemaan perinteisten immunomääritysten kanssa kustannuksissa tai herkkyydessä ja aktiivisten järjestelmien vaatimat ulkoiset voimanlähteet hankaloittavat niiden sovellusta POC-sovelluksiin resurssirajoitteisilla alueilla. Näihin sovelluksiin sopivat passiiviset järjestelmät kärsivät puolestaan huonosta tarkkuudesta eivätkä kykene monimutkaisiin määrityksiin. Älypuhelimien uskotaan tulevaisuudessa tarjoavan uusia mahdollisuuksia nesteen kuljetuksen sekä tulosten detektoinnin kannalta.

Vaikka tämä kandidaatintyö kävi läpi yleisimmät ratkaisut mikrofluidististen immunomääritysten eri osa-alueiden toteuttamiseen, se ei tutkinut, kuinka rakentaa toimiva järjestelmä yhdistelemällä sopivat menetelmät ja käytettävät vasta-aineet toisiinsa. Työ ei myöskään käynyt läpi harvinaisia tai tulevaisuudessa potentiaalisia menetelmiä, joiden tutkimus voisi tarjota ratkaisuja mikrofluidististen immunomääritysten nykyisiin haasteisiin ja rajoitteisiin. Nämä tarjoavatkin näkökulmaa tulevaisuuden tutkimuksia ja kirjallisuuskatsauksia varten.

Lähteet

- Hemmig, E., Temiz, Y., Gökçe, O., Lovchik, R. D. & Delamarche, E. (2020). Transposing lateral flow immunoassays to capillary-driven microfluidics using self-coalescence modules and capillary-assembled receptor carriers. *Analytical Chemistry*. Vol. 92(1)
- Kim, D. & Herr, A. (2013). Protein immobilization techniques for microfluidic assays. *Biomicrofluidics*. Vol. 7
- Kim, K. S. & Park, J.-K. (2005). Magnetic force-based multiplexed immunoassay using superparamagnetic nanoparticles in microfluidic channel. *Lab on a Chip*. Vol. 5(6)
- Lapins, N., Akhtar, A., Banerjee, I., Kazemzadeh, A., Pinto, I. & Russom, A. (2024). Smartphone-driven centrifugal microfluidics for diagnostics in resource limited settings. *Biomedical Microdevices*. Vol. 26.
- Li, F., You, M., Li, S., Hu, J., Liu, C., Gong, Y., Yang, H., & Xu, F. (2020). Paper-based point-of-care immunoassays: Recent advances and emerging trends. *Biotechnology Advances*. Vol. 39
- Lin, C.-C., Wang, J.-H., Wu, H.-W. & Lee, G.-B. (2010). Microfluidic Immunoassays. *Journal of the Association for Laboratory Automation*. Vol. 15(3)
- Lin, Y., Zhou, Q., Tang, D., Niessner, R. & Knopp, D. (2017). Signal-on photoelectrochemical immunoassay for aflatoxin B1 based on enzymatic product-etching MnO₂ nanosheets for dissociation of carbon dots. *Analytical Chemistry*. Vol. 89(10)
- Man, Y., Li, A., Li, B., Liu, J. & Pan, L. (2019). A microfluidic colorimetric immunoassay for sensitive detection of altenariol monomethylether by UV spectroscopy and smart phone imaging. *Analytica Chimica Acta*. Vol. 1092
- Mou, L. ja Jiang X. (2017). Materials for Microfluidic Immunoassays: A Review. *Advanced Healthcare Materials*. Vol. 6
- Ng, A., Uddayasankar, U. & Wheeler, A. (2010). Immunoassays in microfluidic systems. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. Vol. 397
- Olanrewaju, A., Maïwenn Beaugrand, M., Yafia, M. & Juncker, D. (2018). Capillary microfluidics in microchannels: from microfluidic networks to capillarie circuits. *Lab on a Chip*. Issue 16.

- Salva, M., Marco Rocca, M., Niemeyer, C. & Delamarche, E. (2021). Methods for immobilizing receptors in microfluidic devices: A review. *Micro and Nano Engineering*. Vol. 11
- Shang, Q., Zhang, P., Li, H., Liu, R. & Zhang, C. (2019). A flow chemiluminescence paper-based microfluidic device for detection of chromium (III) in water. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*. Vol. 12(6)
- Shi, Y. Ye, P., Yang, K., Meng, J., Guo, J., Pan, Z., Bayin, Q. & Zhao, W. (2021). Application of Microfluidics in Immunoassay: Recent Advancements. *Journal of Healthcare Engineering*. Vol. 2021
- Su, K., Li, J., Liu, H. & Yuan Zou, Y. (2024). Emerging Trends in Integrated Digital Microfluidic Platforms for Next-Generation Immunoassays. *Micromachines*. Vol. 15(11)
- Wu, D., Zhang, J., Xu F., Wen, X., Li, P., Zhang, X., Qiao, S., Ge, S., Xia, N., Qian, S. & Qiu, X. (2017). A paper-based microfluidic Dot-ELISA system with smartphone for the detection of influenza A. *Microfluidics and Nanofluidics*. Vol. 21(3)
- Yang, B., Wang, P., Tao, C., You, Q., Sekine, S., Zhuang, S., Zhang, D. & Yamaguchi, Y. (2022). A continuous flow PCR array microfluidic chip applied for simultaneous amplification of target genes of periodontal pathogens. *Lab on a Chip*. Vol. 22(4)
- Yu, Z.-J., Deng, D.-H., Liang, S.-R., Huang, Y.-L. & Xin-Yao Yi, X.-Y. (2024). Overview of Gas-Generating-Reaction-Based Immunoassays. *Biosensors*. Vol. 14(12)
- Zhao, W.-W., Xu, J.-J. & Chen, H.-J. (2017). Photoelectrochemical Immunoassays. *Analytical Chemistry*. Vol. 90(1)
- Zheng, L., Cai, G., Wang, S., Liao, M., Li, Y. & Lin, J. (2019). A microfluidic colorimetric biosensor for rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 using gold nanoparticle aggregation and smart phone imaging. *Biosensors and Bioelectronics*. Vol. 124-125
- Zhou, Q., Lin, Y., Zhang, K., Li, M. & Tang, D. (2018). Reduced graphene oxide/BiFeO₃ nanohybrids-based signal-on photoelectrochemical sensing system for prostate-specific antigen detection coupling with magnetic microfluidic device. *Biosensors and Bioelectronics*. Vol. 101