

Proyecto: estudio de la expresión génica en biopelículas de E. coli a partir de microscopía de hoja de luz

Protocolo para la fabricación de chips con canal de microfluídos para crecimiento de biopelículas.

Materiales

- * Laminillas de 22 × 11 mm (cortar a la mitad una de 22 × 22 mm) para microscopio SPIM, o 22 × 36mm para microscopios confocal y Nikon.
- * PDMS & *curing agent*
- * Conectores de jeringa para sonda: *probe needles* M921 LLTW.
- * Perforador para PDMS (diseñado y ensamblado en taller de micromecánica).
- * Máster para chips PDMS¹ (3 cubreobjetos)
- * Manguera para microfluídos
- * Recipiente y guantes de protección para KOH
- * KOH
- * Isopropanol
- * Lápiz con punta de diamante para cortar vidrio
- * Hoja de bisturí
- * Campana de vacío
- * Soporte para ensamble de chips en plasma cleaner
- * Alicata o pinza
- * Resina epoxi (de dos componentes)
- * Jeringa de 5 o 10 mL

Equipos

- * Sonicador
- * Plasma cleaner
- * Horno a 65°C
- * Plancha de calentamiento

Procedimiento

Día 1 (tiempo ~ 8 horas)

1. Fabricación PDMS:
 - a) Usando la caja de láminas cubreobjetos como molde hacer un recipiente en papel aluminio, y sobre éste distribuir los 3 cubreobjetos máster. Este recipiente es desechable y facilitará el desmolde del PDMS.

¹ Cortar rectángulos de 10 × 2 mm a partir de laminilla de microscopio y fijarlos con pegante UV sobre lámina portaobjetos para microscopio.

- b) Mezclar en un vaso desechable 30g de PDMS y 3g de Curing Agent
 - c) Revolver con tenedor de plástico durante 5 minutos (o hasta asegurarse que la mezcla es homogénea)
 - d) Depositar mezcla sobre el máster en la caja de papel aluminio.
 - e) Dejar en campana de vacío durante ~2 horas, para retirar las burbujas de aire de la mezcla.
 - f) Dejar durante al menos 3 horas en horno a 65°C, o que el PDMS endurezca.
2. Desmoldar PDMS y usar la hoja de bisturí para cortar chips de un tamaño aproximado de 8 × 16mm, con el canal en el centro. ▲ *Realizar el corte desde la superficie del PDMS que tiene el canal.*
 3. Usar el perforador para hacer los canales de entrada y salida:
 - a) Poner PDMS en posición horizontal con el canal hacia arriba
 - b) Perforar en ambos extremos a lo largo del eje más largo del canal. ⚠ **Paso crítico:** asegurarse que los orificios queden **verticales**, y **centrados** dentro del canal.
 - c) ⚠ **Paso crítico:** asegurarse de **retirar el PDMS residuo** de la perforación, ya que puede obstruir los canales.
 4. Limpieza de los chips de PDMS:
 - a) Sonicar durante 40 minutos en isopropanol.
 - b) Secar con aire a presión y dejar en el horno a 65°C durante la noche para evaporar cualquier residuo de isopropanol. ▲ *Utilizar adaptador para pistola de aire con filtro.*
 5. Limpieza de las laminillas ⚠ **Usar guantes para manipulación de KOH:**
 - a) En el recipiente para lavado de laminillas en KOH (o en un recipiente de plástico resistente) depositar las laminillas, asegurándose que queden separadas entre ellas (si no se cuenta con un separador deberán ponerse cada una en un recipiente).
 - b) Sonicar durante 30 minutos.
 - c) Enjuagar 5 veces con dH₂O. ⚠ **El KOH y el agua del primer lavado deberán depositarse en contenedor para residuos de KOH.**
 - d) Secar con aire a presión (▲ *Utilizar adaptador para pistola de aire con filtro*) y dejar en el horno a 65°C durante la noche.

Día 2 (tiempo ~ 1 hora)

1. Ensamble de los chips:
 - a) Precalentar la plancha calefactora a 150°C.
 - b) Poner en el soporte diseñado para el plasma cleaner los chips PDMS en posición horizontal con el canal hacia arriba y las laminillas recortadas.
 - c) Exponer al plasma durante 1 minuto.
 - d) ⚠ **Paso crítico:** Inmediatamente ayudándose de una pinza tomar la laminilla y poner la cara expuesta al plasma sobre el PDMS. En la dirección **a lo largo del canal deberá dejarse un espacio de la laminilla de al menos 4mm en uno de los lados** (el otro extremo quedará casi al borde). En la otra dirección el PDMS deberá posicionarse **simétricamente** respecto a la laminilla.
 - e) Presionar la laminilla contra el PDMS, teniendo cuidado de no quebrarla.

- f) Poner los chips ensamblados en la plancha durante 5 minutos, con la laminilla en contacto con la superficie caliente.
2. Retirar y dejar estabilizar los enlaces durante la noche (puede dejarse también en el horno a 65°C).

Día 3 (tiempo ~ 2 horas)

1. Retirar plástico de conectores de jeringa y doblarlos ayudándose de un alicate en un ángulo mayor a 90°, teniendo cuidado que los conectores no se obstruyan ni se rompan.
2. Recortar manguera de entrada 13 cm de longitud, y manguera de salida de aproximadamente 20 cm de longitud.
3. Insertar 2 conectores sin plástico en uno de los extremos de cada manguera.
▲ Sugerencia: insertar y retirar un conector en todos los extremos de mangueras donde posteriormente se ubicarán conectores, para facilitar el acople durante el experimento.
4. **⚠ Paso crítico:** Insertar los conectores doblados en la entrada y salida del canal, asegurándose de que **el conector no rasgue el PDMS y coincida con el orificio** hecho con el perforador. Para el microscopio SPIM: la manguera de **entrada** deberá ir en el canal cerca al **borde con mayor superficie de laminilla**. La parte doblada de los conectores deberá ir orientada hacia dicho borde.
5. En un vaso desechable mezclar la resina epoxy, y con una punta de micropipeta aplicar rápidamente sobre la unión entre los conectores y el PDMS. Dejar secar.

Día 4 (tiempo ~ 1 hora)

1. Cargar jeringa con agua filtrada y pasar por chips para descartar presencia de fugas u obstrucción de canales. *▲ Se recomienda hacer esta verificación 1 día antes del experimento con bacterias, y antes de adherir bacterias pasar medio para limpiar cualquier residuo de agua dentro del chip.*