

На правах рукописи

ПОСМИТНАЯ Яна Станиславовна

РАЗРАБОТКА МИКРОФЛЮИДНЫХ УСТРОЙСТВ ИЗ ПОЛИМЕРНЫХ
МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ И РАЗДЕЛЕНИЯ
НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Специальность:

01.04.01 – Приборы и методы экспериментальной физики

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата технических наук

Санкт-Петербург – 2017

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Санкт-Петербургском национальном исследовательском университете информационных технологий, механики и оптики

Научный руководитель:

доктор технических наук, профессор, заведующий лабораторией «Информационно-измерительных био- и хемосенсорных микросистем» Института аналитического приборостроения РАН (ИАП РАН)

Евстрапов
Анатолий
Александрович

Официальные оппоненты:

доктор технических наук, профессор, заведующий кафедрой Оптимизации химической и биотехнологической аппаратуры Государственного технологического института (технического университета)

Абиев
Руфат Шовкетович

доктор технических наук, профессор кафедры «Вакуумные и компрессорные машины» Московского государственного технического университета им. Н.Э. Баумана

Чернышев Андрей
Владимирович

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», физический факультет.

Защита состоится 25 декабря 2017 г. в 14.00 на заседании диссертационного совета Д002.034.01 на базе ИАП РАН по адресу: 198095, г. Санкт-Петербург, ул. Ивана Черных, д. 31-33, лит. А.

С диссертацией можно ознакомиться в научно-технической библиотеке ИАП РАН по тому же адресу и на сайте www.iairas.ru и www.iai.rssi.ru. Отзывы на диссертацию и автореферат направлять по адресу: 198095, г. Санкт-Петербург, ул. Ивана Черных, д. 31-33, лит. А.

Автореферат разослан

«___» _____ 2017 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор физико-математических наук



А.Л. Буляница

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Методы амплификации и разделения нуклеиновых кислот являются важным инструментом в биологических и медицинских исследованиях. Реализация этих методов в микрофлюидных устройствах представляет собой перспективный подход к разработке компактных, относительно недорогих, чувствительных и эффективных диагностических средств для клинической практики, контроля безопасности пищевых продуктов и мониторинга окружающей среды. Развитие микро- и нанотехнологий, методов модификации материалов, детектирующих систем, прогресс в биотехнологиях привели к появлению новых методов анализа, в том числе основанных на изотермических и «цифровых» методах амплификации нуклеиновых кислот.

Методы изотермической амплификации нуклеиновых кислот позволяют создавать простые, надежные и высокочувствительные приборы, которые подходят для использования в условиях ограниченных ресурсов для экспресс-диагностики биологических образцов (системы point-of-care). Новые методы молекулярного анализа основаны на современных подходах к исследованию биологических проб. При этом в исследовательских лабораториях для отработки методик анализа и проверки состоятельности разработанных подходов используются методы оперативного (быстрого) изготовления прототипов микрофлюидных чипов (МФЧ), позволяющие сократить сроки и уменьшить стоимость исследований. Широко применяемым и доступным на настоящий момент времени является метод «мягкой» литографии, разработанный Дж. Вайтсайдом (G. Whitesides) для полидиметилсилоксана (ПДМС) [1]. Метод предусматривает использование мастер-форм (шаблонов), получаемых с применением фотолитографии на фоторезистах и кремнии в условиях чистых помещений, что влияет на стоимость устройств и, следовательно, на стоимость исследований. От одной мастер-формы может быть получено ограниченное число реплик, а зачастую при создании новой методики анализа требуется значительное число МФЧ, что приводит к необходимости разработки процедур, увеличивающих срок службы мастер-формы или уменьшающих время изготовления новых.

Существуют подходы, позволяющие повысить ресурс мастер-форм за счет нанесения различного рода упрочняющих покрытий. К альтернативным методам изготовления мастер-форм и МФЧ относят варианты: прецизионной микрообработки (в том числе и лазерной); литья в форму; горячего тиснения; аддитивные технологии, 3D принтинг; комбинированные методы (например, сочетание методов механической обработки и «мягкой» литографии) и др. [2]. Они требуют дополнительного оборудования и квалифицированного обслуживающего персонала. Поэтому по-прежнему привлекательным для исследовательских лабораторий является метод «мягкой» литографии.

Применяемый в методе «мягкой» литографии ПДМС обладает паропроницаемостью, что ограничивает длительное использование МФЧ в режиме повышенных температур; гидрофобность полимера приводит к необходимости его модификации при создании функциональных групп на поверхности; эластичность ПДМС ограничивает его применение в устройствах, предназначенных для манипуляций с жидкостью при высоких давлениях. Все это является мотивацией для поиска альтернативных полимерных материалов, для которых можно было бы использовать метод «мягкой» литографии [3].

Таким образом, актуальным является развитие и совершенствование метода «мягкой» литографии для изготовления полимерных МФЧ, применимого в условиях исследовательской лаборатории, позволяющего снизить стоимость и сократить длительность исследований при разработке новых методов анализа. Для этого необходимо проведение комплексных

исследований, в том числе: а) поиска и выбора альтернативных эластичных и твердых материалов как для мастер-форм, так и для самих МФЧ, б) исследований их свойств (модуля упругости, смачивания поверхности, оптических свойств); в) модификации метода «мягкой» литографии; г) определения способов физико-химической обработки поверхности полимеров с целью придания необходимых свойств; д) отработки методик репликации микроструктур в полимерных материалах с применением новых мастер-форм; е) изготовления экспериментальных образцов МФЧ из выбранных материалов и их апробации на тестовых системах.

Цель работы

Разработка и апробация способов оперативного изготовления микрофлюидных устройств из полимерных материалов для методов молекулярной диагностики (амплификации и разделения нуклеиновых кислот)

Для достижения цели решались следующие задачи:

- Определение основных требований к материалам, способам изготовления и модификации рабочих поверхностей МФЧ, доступных в условиях исследовательских лабораторий.
- Выбор и обоснование базовой технологии (способа) оперативного изготовления МФЧ.
- Сравнительный анализ и исследования полимерных материалов (в том числе и отечественных), подходящих для выбранного способа изготовления и удовлетворяющих требованиям, предъявляемым к методам молекулярной диагностики.
- Разработка / адаптация способов оперативного изготовления функциональных микроструктур в полимерных материалах.
- Разработка способов модификации рабочих поверхностей, методов герметизации и контроля герметичности МФЧ.
- Создание макетных образцов МФЧ и экспериментальные исследования на тестовых (модельных) системах.

Научная новизна

1. Впервые проведенный комплекс исследований оптических и физико-механических свойств материалов (светопропускание, флуоресценция, смачивание поверхности, модуль упругости) позволил выбрать и обосновать перспективность применения эпоксидных компаундов (ПЭО-221К, ПЭО-510КЭ-20/0, СПбГТИ (ТУ), Россия) и эластичных материалов (Lasil T-4, Dow Corning, Германия) в методах оперативного изготовления микрофлюидных устройств.
2. На основе проведенных оценок величин светопропускания и флуоресценции материалов, а также конструкций с интегрированными полимерными пленками для микрофлюидных чипов впервые выработаны рекомендации по применению полимерных материалов в устройствах для обнаружения нуклеиновых кислот с флуоресцентным детектированием.
3. Предложены и обоснованы новые подходы при создании прототипов микрофлюидных чипов, представляющие собой модификацию метода «мягкой» литографии (использование мастер-форм из эластичных и эпоксидных материалов при дополнительной репликации или металлических мастер-форм, изготовленных методом лазерной микрообработки с электролитно-плазменной полировкой). При этом расширяются возможности метода и снижаются затраты.
4. На примере регистрации результатов изотермической амплификации участка гена GAPDH впервые показана возможность детектирования флуоресценции от отдельных макроэмульсий в транспортном потоке на микрофлюидном чипе, что обеспечивает высокопроизводительный анализ нуклеиновых кислот.

Практическая значимость работы

- Предложен подход, позволяющий усовершенствовать метод «мягкой» литографии и заключающийся в использовании шаблонов (мастер-форм) из металлических сплавов (дюраль, латунь, сталь), полученных методами лазерной микрообработки, что обеспечивает возможность многократной воспроизводимой репликации микроструктур при снижении времени и затрат на изготовление шаблона.
- Разработаны и изготовлены микрофлюидные чипы, предназначенные для амплификации нуклеиновых кислот, из ПДМС Sylgard[®] 184 (Dow Corning, США) с интегрированной полиолефиновой пленкой (Sarstedt AG & Co., Германия) и пленкой циклоолефинового сополимера (ZEONEX[®], ZEON EUROPE GmbH, Германия). Встраивание пленок уменьшает испарение реакционной смеси из рабочей камеры микрочипа при ее нагреве и охлаждении до уровня, обеспечивающего проведение полимеразной цепной реакции (ПЦР) (40-50 циклов термоциклирования).
- Впервые предложен способ изготовления мастер-форм и микрофлюидных чипов для экспериментальных исследований (на примере реализации метода амплификации нуклеиновых кислот) из эпоксидных компаундов отечественного производства (ПЭО-221К, ПЭО-510КЭ-20/0, СПБГТИ (ТУ), Россия), позволивший осуществить прототипирование чипов в условиях исследовательской лаборатории.
- Результаты работы, связанные с созданием микрофлюидных чипов с генератором капель для методов амплификации нуклеиновых кислот, использованы при выполнении проекта «Микроустройства на основе принципов «капельной» микрофлюидики для химического и биологического анализа» Программы фундаментальных исследований президиума РАН № 8 «Химический анализ и исследование структуры веществ: фундаментальные основы и новые методы».

Методология и методы исследования

Использовались экспериментальные методы исследований, в том числе: методы спектрометрии; флуоресцентной спектроскопии; микроскопические и макроскопические тесты при измерении модуля упругости; методы сканирующей ближнепольной, атомно-силовой и конфокальной лазерной микроскопии; оптической микроскопии; методы репликации микроструктур с применением шаблонов; методы капиллярного электрофореза и амплификации нуклеиновых кислот. Полученные при исследованиях данные обрабатывались методами статистической обработки результатов.

Положения, выносимые на защиту

1. Силиконовые эластичные материалы, из которых изготавливаются мастер-формы, позволяют сформировать твердые оптически прозрачные реплики микроструктур в эпоксидных материалах (например, ПЭО-221К). Это обеспечивает создание конструкций чипов для экспериментальных исследований в области микрофлюидики, а также прототипов устройств для биологических и медицинских исследований, что расширяет возможности метода «мягкой» литографии.
2. Мастер-формы из эпоксидных компаундов, обладающие высокой прочностью и изготовленные по эластомерным репликам, полученным по мастер-форме из кремния и фоторезиста, позволяют увеличить число реплицируемых изделий (реплик микроструктур) более чем в 4 раза.
3. Методы лазерной микрообработки металлов (например, алюминиевого сплава АМг-6, латуни ЛС59-1, стали марки 40Х13) позволяют оперативно изготовить мастер-формы

для получения реплик микрофлюидных чипов с размерами микроструктур свыше 50 мкм за время не более 1 часа, что значительно (в 6-8 раз) быстрее, чем при традиционном методе фотолитографии.

4. Применение силиконовых прозрачных материалов (например, Lasil T-4) и эпоксидных компаундов (например, ПЭО-221К), а также интеграция в ПДМС Sylgard® 184 тонких пленок (из полиолефинового полимера или циклоолефинового сополимера) позволяет уменьшить испарение пробы в конструкции микрофлюидного чипа для амплификации нуклеиновых кислот без существенного изменения фоновой флуоресценции и светопропускания, что обеспечивает возможность обнаружения целевой ДНК.
5. Эластомерные материалы (например, ПДМС Sylgard® 184) после обработки высокочастотной плазмой в среде кислорода или аргона приобретают гидрофильные свойства, которые изменяются со временем, что приводит к нестабильности характеристик микрофлюидных чипов при их дальнейшем использовании. Выдерживание чипов при температуре 200 °С в течение 1 часа или при 80 °С в течение 4 часов приводит к восстановлению гидрофобных свойств в каналах и реакционных камерах.

Апробация работы:

Основные результаты диссертации были представлены на международных и российских научных конференциях: 4th International School and Conference «Saint Petersburg OPEN 2017» (г. Санкт-Петербург), Первая и Вторая российская конференция с международным участием «Физика – наукам о жизни», 2016 г., 2017 г. (г. Санкт-Петербург), Les Rencontres Scientifiques d'IFP Energies nouvelles. Microfluidics: from laboratory tools to process development, 2015 г. (г. Рюэй-Мальмезон, Франция), ICMN 2015: XIII International Conference on Microfluidics and Nanofluidics (г. Прага, Чешская Республика), Седьмая международная научно-практическая конференция «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине», 2014 г. (г. Санкт-Петербург), II Международная научно-практическая конференция «Sensorica - 2014» (г. Санкт-Петербург), Международная конференция по микрофлюидике EMBL Microfluidics Conference, 2014 г., (г. Гейдельберг, Германия), Форум молодых ученых России и Китая, Китайско-российский двусторонний симпозиум новых материалов и технологий, 2014 г. (г. Циндао, Китай).

Поддержка работы грантами и научными программами

1. Программа фундаментальных исследований РАН по Программе Президиума РАН №8 «Химический анализ и исследования структуры веществ: фундаментальные основы и новые методы» на 2015-2017 гг., проект «Микроустройства на основе принципов «капельной» микрофлюидики для химического и биологического анализа».
2. Комитет по науке и высшей школе, грант 2014 года для студентов вузов, расположенных на территории Санкт-Петербурга, аспирантов вузов, отраслевых и академических институтов, расположенных на территории Санкт-Петербурга, проект «Разработка стекляннопolyмерного микрофлюидного чипа для экспресс-анализа фрагментов ДНК методом электрофореза», 2014 г.
3. Фонд содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере, персональный грант «УМНИК», проект «Разработка микроаналитического устройства для цифровой полимеразной цепной реакции на основе принципов «капельной» микрофлюидики», 2014 г.

Публикации: Основные результаты по теме диссертации изложены в 16 печатных работах, 6 из которых изданы в журналах, рекомендованных ВАК РФ и 10 – в сборниках трудов конференций и тезисов докладов.

Личный вклад автора:

Автор участвовал в постановке цели и задач исследований, анализе литературных источников по теме диссертации, организации и проведении экспериментальных исследований (спектрофотометрические и флуориметрические измерения; способы обработки материалов; измерение модуля упругости; определение смачивания поверхностей; исследование рельефа поверхностей методами сканирующей ближнепольной микроскопии и конфокальной лазерной микроскопии; изготовление и измерение микроструктур мастер-форм и реплик; изготовление и испытание МФЧ на тестовых системах), обработке и анализе экспериментальных данных, подготовке научных публикаций по тематике исследований, вклад в которые соизмерим с вкладом соавторов, представлении результатов работы на конференциях. Основные экспериментальные результаты, представленные в диссертации, получены автором лично.

Структура диссертации: диссертация состоит из введения, четырех глав, заключения, списка литературы из 163 наименований, приложений. Текст диссертации изложен на 177 страницах, содержит 60 Рисунков, 47 Таблиц, 3 Приложения.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы диссертации, сформулированы цель и задачи исследования, научная новизна и практическая значимость результатов выполненной работы, перечислены научные положения, выносимые на защиту.

Первая глава (литературный обзор) диссертации состоит из 7 разделов. В первом разделе приведен краткий обзор исследований в области создания микрофлюидных устройств для молекулярной диагностики. Отмечены перспективные направления развития систем для амплификации нуклеиновых кислот. Второй раздел посвящен принципам и особенностям «капельной» микрофлюидики – технологии, позволяющей реализовать большинство методов, используемых в биологических исследованиях. Рассмотрены варианты конфигураций (топологий) генераторов капель. Отмечено, что в топологии с фокусировкой потока могут быть реализованы основные режимы генерации капель, при этом размеры капель могут контролироваться в широком диапазоне значений. В третьем разделе обсуждаются способы создания макроэмульсий в МФЧ для исследований биологических образцов. Четвертый раздел содержит информацию о материалах, используемых для изготовления МФЧ. Особое внимание уделяется полимерам, в частности – ПДМС, как наиболее распространенному в микрофлюидике материалу для создания прототипов устройств. Пятый раздел посвящен анализу методов и способов изготовления МФЧ. Рассматривается метод «мягкой» литографии и пути его развития. В шестом разделе обсуждаются методы целевой модификации поверхности полимерных материалов, используемые при создании неразъемных герметичных соединений и при локальном изменении смачивания поверхности в устройствах для «капельной» микрофлюидики. Седьмой раздел содержит сведения о методах контроля характеристик материалов чипов при их модификации: спектрофотометрии и методе лежащей капли.

На основании литературного обзора сформулированы основные задачи диссертационного исследования.

Вторая глава посвящена экспериментальным исследованиям материалов для МФЧ и состоит из 4 разделов. Кроме базового материала для прототипирования в микрофлюидике –

ПДМС Sylgard® 184 (Dow Corning, США) изучались альтернативные эластичные материалы: Пентэласт®-712 марки А (ООО «Силиконовые Материалы», Россия), Lasil T-4 (Dow Corning, Германия), КРЕОЛ (ООО «СУРЭЛ», Россия), СКТН марки А (ООО «Силиконовые Материалы», Россия), а также эпоксидные материалы: Resine Epoxy R123 (SOLOPLAST VOSSCHEMIE, Франция), ПЭО-221К и ПЭО-510КЭ-20/0 (СПБГТИ(ТУ), Россия).

В разделе 2.1 приведены результаты исследований свойств полимерных материалов – оценки модуля упругости и смачивания поверхности. Оценки модуля упругости эластичных материалов микроскопическим тестом (по данным атомно-силовой микроскопии) отличаются от оценок, полученных макроскопическим методом. При конструировании функциональных элементов микрометровых размеров более адекватной является оценка, полученная при использовании макроскопических тестов (Таблица 1).

Оценку смачивания поверхности проводили методом лежащей капли (объем капли воды 20 мкл). Из данных Таблицы 1 следует, что эластичные материалы (Lasil T-4, Пентэласт®-712) обладают гидрофобными, схожими с ПДМС Sylgard® 184, свойствами. У эпоксидных материалов наблюдали следующие краевые углы: для необработанного образца ПЭО-221К угол смачивания $\theta = 85^{\circ} \pm 1^{\circ}$ (n=8), для ПЭО-510КЭ-20/0 – $\theta = 79^{\circ} \pm 2^{\circ}$ (n=10), Resine Epoxy R123 – $\theta = 78^{\circ} \pm 2^{\circ}$ (n=10). Так как в случае использования материала в МФЧ для формирования эмульсии «вода-в-масле» величина краевого угла должна превышать значение 92° , необходимо проводить модификацию каналов чипа. Обработка поверхности компаундов (ПЭО-221К, ПЭО-510КЭ, Resine R123) водоотталкивающим агентом Aquapel (PPG Industries, США) позволяет достигнуть значений краевых углов $106^{\circ} \pm 1^{\circ}$ (n=9), $104^{\circ} \pm 3^{\circ}$ (n=7) и $105^{\circ} \pm 2^{\circ}$ (n=9) соответственно.

Таблица 1 – Оценки модуля упругости и угла смачивания образцов эластичных материалов

Материал	Соотношение основа : отвердитель (условия отверждения)	Модуль упругости, МПа	Угол смачивания, град.
ПДМС Sylgard® 184	20:1 (65 °С, 4 ч)	0,74±0,01	109±1
	10:1 (65 °С, 4 ч)	2,09±0,07	107±1
	3:1 (65 °С, 4 ч)	1,22±0,04	93±1
Lasil T-4	10:1 (65 °С, 4 ч)	1,91±0,10	100±1
	10:1+10% разбавителя (65 °С, 4 ч)	1,39±0,03	98±1
	10:1 (25 °С, 24 ч)	1,97±0,09	-
Пентэласт®-712	20:1 (25 °С 72 ч)	1,43±0,05	98±1

В разделе 2.2 рассмотрены методы модификации поверхности ПДМС Sylgard® 184 с целью создания: а) функциональных групп для получения прочного и герметичного соединения между элементами чипа (конструкции ПДМС-ПДМС, ПДМС-стекло); б) функциональных слоев для обеспечения гидрофобности / гидрофильности поверхности; в) функциональных слоев для управления электроосмотическим потоком.

Распространенным методом модификации поверхности ПДМС является плазменная обработка в газовой среде (в частности, кислорода). При этом происходит увеличение числа гидроксильных групп, определяющих гидрофильные свойства поверхности. Обработка кислородной плазмой позволяет получить герметичное неразъемное соединение ПДМС со стеклом и другими полимерами за счет образования прочной ковалентной связи –Si–O–Si–.

Свойства, приобретенные при модификации поверхности ПДМС, нестабильны. Восстановление гидрофобных свойств происходит за счет реорганизации гидрофильных групп на поверхности, миграции полимерных цепей в материале, изменения шероховатости поверхности и т.д.

Исследования влияния соотношений основа : отвердитель на смачивание поверхности ПДМС после обработки плазмой в среде кислорода показали, что через 2 часа после обработки у образцов с соотношением основа : отвердитель 10:1 и 20:1 наблюдался наименьший угол смачивания. Восстановление свойств происходит быстрее у образцов с соотношением основа : отвердитель 3:1, 5:1 и 20:1. После термической обработки при 200 °С (1 час) у всех образцов зарегистрирован примерно одинаковый краевой угол (Рисунок 1).

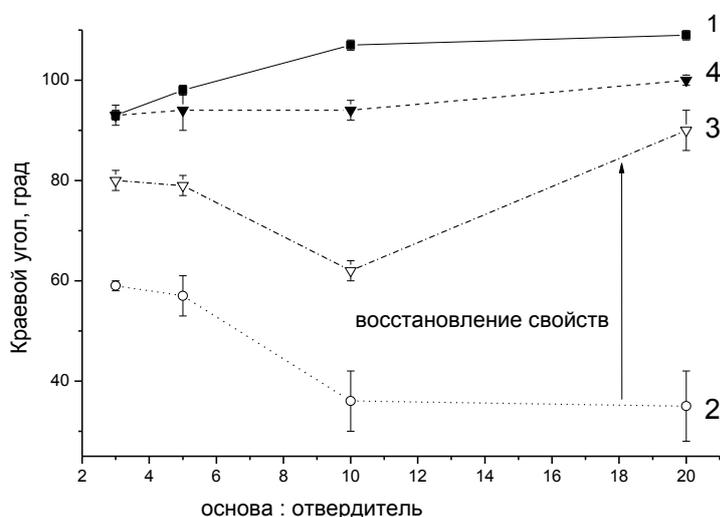


Рисунок 1 – Зависимость угла смачивания от соотношения основа : отвердитель ПДМС: необработанного - (1); после обработки в кислородной плазме и выдерживании при нормальных условиях в течение: 2 часов – (2), в течение 24 часов – (3); после обработки при температуре 200 °С в течение 1 часа – (4)

Изучение свойств смачивания в каналах МФЧ на образцах гибридных (ПДМС-стекло) и полимерных (ПДМС-ПДМС) конструкций по изображениям мениска дистиллированной воды показало, что после плазменной обработки в среде кислорода поверхность каналов становится гидрофильной – углы смачивания в каналах МФЧ (ПДМС-стекло) составляют $27 \pm 5^\circ$, а для МФЧ (ПДМС-ПДМС) – $30 \pm 4^\circ$. После нескольких дней хранения при комнатной температуре в каналах одного и того же МФЧ наблюдались как гидрофобные, так и гидрофильные свойства. Через 6-7 дней после обработки во всех МФЧ поверхность каналов становилась гидрофобной, но полного восстановления исходных свойств не происходило. Последующие исследования показали, что для восстановления гидрофобных свойств в каналах готового МФЧ, необходимо выдержать его при температуре $\sim 80^\circ\text{C}$ не менее 4 часов.

Обработка ПДМС раствором «пиранья» и последующее выдерживание в 1 М растворе КОН не позволила существенно снизить значение краевого угла, но было продемонстрировано, что такая обработка может быть применена для герметизации устройств из ПДМС и стекла. Исследованные методы модификации ПДМС (обработка 1% водным раствором поливинилового спирта; 3% водным раствором Kolliphor® Р 188; 4% водно-спиртовым раствором 3-(метакрилоилокси)-пропилтриметокси-силана) позволяют создать гидрофильную поверхность с различной стабильностью приобретаемых свойств во времени.

В этом же разделе приведены результаты спектрофотометрических измерений образцов ПДМС в ближней инфракрасной (БИК) области спектра (850-2500 нм). Исходя из данных, полученных при измерениях образцов ПДМС после различных видов обработки, можно сделать вывод, что метод БИК-спектроскопии не подходит для оценки изменения поглощения гидроксильных групп. Однако учитывая, что в материале имеется большое число метильных групп ($-\text{CH}_3$), а в методах физико-химической обработки происходят трансформации с этими группами, то ее качество можно оценивать по изменению поглощения данных групп. Для образцов ПДМС, подвергнутых модификации вышеописанными методами, наибольшее изменение относительного светопропускания наблюдалось на длинах волн 2374 и 2296 нм.

Раздел 2.3 посвящен изучению оптических свойств полимерных материалов, применяемых при изготовлении МФЧ. Спектральные зависимости светопропускания для ПДМС, ПДМС с полиолефиновой пленкой (ПО-пленкой) (Sarstedt AG & Co., Германия) и пленкой циклоолефинового сополимера (ЦОС-пленкой) (ZEONEX[®], Zeon Europe GmbH, Германия) свидетельствуют, что интеграция пленок в ПДМС не приводит к существенному изменению спектров пропускания в диапазоне от 400 до 850 нм. У силиконовой композиции КРЕОЛ (толщина $h = 1,9$ мм) пропускание свыше 85% зарегистрировано на длинах волн более 300 нм. Компаунд Пентэласт[®]-712 ($h = 3,8$ мм) обладает светорассеивающими свойствами и в видимом диапазоне у него наблюдается пропускание менее 10%. Светопропускание свыше 85% выявлено у ПЭО-510КЭ ($h = 2,3$ мм) и ПЭО-221К ($h = 2,3$ мм) на длинах волн от 385 нм, у Resine Epoxy R123 ($h = 2,2$ мм) – более 445 нм. Компаунды ПЭО-510КЭ и ПЭО-221К имеют пропускание в области от 300 до 850 нм, сравнимое с пропусканием ПДМС Sylgard[®] 184. Все указанные материалы (кроме Пентэласт[®]-712) могут применяться в конструкциях устройств, ориентированных на оптические методы регистрации в диапазоне от 400 до 850 нм.

Оценка уровня флуоресценции материалов на длинах волн возбуждения наиболее часто применяемых в молекулярной диагностике флуорофоров (5-FAM, FITC, SYBR[®] Green I, EvaGreen[®], Rhodamine R6G, HEX, 5-ROX, 5-TAMRA, Cy-3) показала, что наименьшей флуоресценцией при возбуждении на длине волны 495 нм обладают ПДМС и ПЭО-221К, при возбуждении на 525 нм – ПДМС, ПДМС с ЦОС-пленкой, ПЭО-221К и ПЭО-510КЭ, при возбуждении на 565 нм – ПДМС и ПДМС с ПО-пленкой, а при возбуждении на 545 нм – эпоксидная композиция Resine R123. Эластомер Lasil T-4 обладает более высокой флуоресценцией, чем ПДМС. Эти данные могут применяться при выборе материала МФЧ для методов, в которых используются флуоресцентные красители.

Эпоксидные компаунды позволяют создавать твердые конструкции МФЧ, в которых можно осуществлять манипуляции с потоками жидкости и газа при высоком давлении и в условиях повышенных температур. Компаунды могут использоваться как для изготовления мастер-форм и микрочипов, так и для герметизации устройств. Поскольку процесс отверждения в некоторых случаях достаточно длительный (например, для отверждения Resine R123 требуется 72 часа), то важным является определение температурных режимов, позволяющих сократить время отверждения. В БИК-области имеются полосы, которые позволяют осуществлять контроль процесса отверждения: комбинационная полоса поглощения второго обертона эпоксидного кольца с растяжением СН (≈ 4530 см⁻¹) и комбинационная полоса растяжения и изгиба NH ($\approx 4900-5000$ см⁻¹). Регистрируя изменение поглощения на длине волны 2208 нм (4530 см⁻¹) в зависимости от времени отверждения компаунда можно оценивать динамику процесса полимеризации и сравнивать результаты при разных температурах отверждения. Изменения светопропускания кювет (длина оптического пути 2 мм) с эпоксидными компаундами регистрировали в процессе отверждения при температурах 60 °С и 80 °С каждые 40 мин в течение 240 мин относительно основы на спектрофотометре Hitachi U3410 (Япония). Зависимости (Рисунок 2) свидетельствуют, что отверждение образца ПЭО-221К при температуре 80 °С происходит примерно за 2 часа, а при температуре 60 °С – за время не менее 4 часов. Отверждение при 80 °С не влияет на оптические свойства компаунда.

В **Разделе 2.4** представлены результаты проверки материалов: ПДМС Sylgard[®] 184, клея Permabond UV630, компаунда ПЭО-221К, ЦОС-пленки Zeonor Film[®] ZF14-188, ПО-пленки на ингибирование ПЦР. Проверку проводили на амплификаторе нуклеиновых кислот АНК-32 (ИАП РАН, Россия). Использовали специфичные праймеры и зонды (ООО «ДНК-Синтез», Россия) и реакционную смесь М-428 «ПЦР-Микс» (НПК «Синтол», Россия), а в качестве мишени – фрагмент ДНК гена GAPDH. Результаты экспериментов показали, что все исследуемые материалы не ингибируют ПЦР.

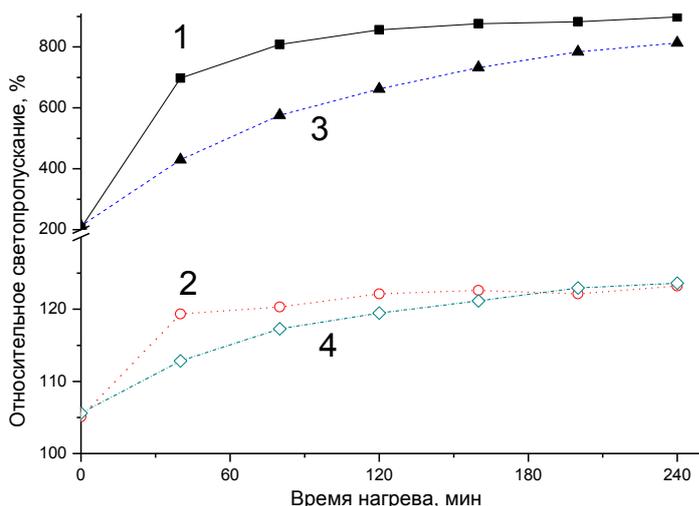


Рисунок 2 – Изменение светопропускания образца эпоксидного компаунда ПЭО-221К в процессе отверждения при температуре 80 °C (1, 2) и при 60 °C (3, 4); 1, 3 – на длине волны 2208 нм, 2, 4 – на длине волны 1650 нм

Третья глава диссертации посвящена исследованиям, связанным с модификацией метода «мягкой» литографии. Традиционный метод фотолитографии в фоторезистах на кремниевой подложке позволяет изготовить мастер-форму, с которой может быть получено ограниченное число реплик – примерно 50-70 штук. Среди возможных способов продления ресурса мастер-формы из кремния и фоторезиста (далее – мастер-форма Si/Su-8) – получение «промежуточных» эластомерных реплик, которые затем используются для создания твердых мастер-форм из эпоксидных компаундов. С этих мастер-форм формируются реплики для МФЧ из эластомеров (Рисунок 3). Такой же подход, применяя мастер-формы из эластомерных материалов, может использоваться для изготовления МФЧ из эпоксидных компаундов.



Рисунок 3 – Модификация метода «мягкой» литографии

Другой вариант модификации метода основан на применении металлических сплавов для мастер-формы, структуры в которой изготовлены методами лазерной обработки (Рисунок 3), что расширяет возможности «мягкой» литографии (в частности, ассортимент материалов реплик), но и имеет определенные ограничения по размерам и геометрии реплицируемых микроструктур.

В **разделе 3.1.** изложено описание традиционного метода фотолитографии для изготовления мастер-формы Si/Su-8, реализованного в СПб НИ АУ РАН [4], в соответствии с которым были изготовлены мастер-формы: а) с тестовыми структурами в виде геометрических фигур (полос, крестов, квадратов, кругов, треугольников) с размерами: 1 мм, 500 мкм, 250 мкм, 100 мкм, 50 мкм, 25 мкм; б) с реакционными камерами.

В **Разделе 3.2** описаны процедуры, используемые для получения заготовок с микроструктурами из эпоксидных клеев-компаундов отечественного производства (ПЭО-221К, ПЭО-510КЭ-20/0) с помощью «вторичной» мастер-формы из ПДМС Sylgard[®] 184 (Рисунок 4, а). Особенностью ее изготовления является использование дополнительной «промежуточной» реплики из ПДМС – инверсии исходной мастер-формы Si/Su-8. Для увеличения ресурса эластичной мастер-формы могут применяться другие материалы, например, компаунд Пентэласт[®]-750 марки А (ООО «Силиконовые Материалы», Россия) или эластомер Lasil T-4 (Dow Corning, Германия). От одной мастер-формы из ПДМС можно получить не менее 20 реплик из эпоксидной смолы.

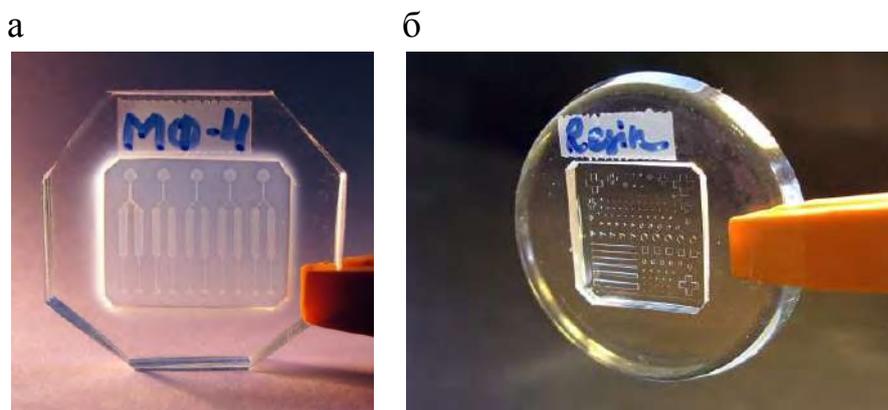


Рисунок 4 – Изображения мастер-форм, изготовленных методом «мягкой» литографии:
а – из ПДМС с реакционными камерами для амплификации (размер 43x41 мм²);
б – из эпоксидной смолы Resine Epoxy R123 с тестовыми структурами (∅47 мм)

Использование «вторичных» мастер-форм из эпоксидных компаундов позволяет увеличить ресурс исходной мастер-формы Si/Su-8 и снизить стоимость получаемых МФЧ. От мастер-формы Si/Su-8 формируется промежуточная ПДМС-реплика, которая заливается компаундом. Полученная эпоксидная мастер-форма служит для последующей репликации микроструктур в эластичных материалах. Такой подход применялся при изготовлении «вторичных» мастер-форм с тестовыми структурами из компаундов ПЭО-221К, ПЭО-510КЭ-20/0 и Resine Epoxy R123 (Рисунок 4, б). Результаты измерений рельефа поверхности компаунда ПЭО-221К на сканирующем ближнепольном оптическом микроскопе (СБОМ) ИНТЕГРА Соларис (ЗАО «НТ МДТ», Россия) в режиме поперечных сил показали, что отпечаток от мастер-формы из ПДМС имеет гладкую оптически прозрачную поверхность с шероховатостью Ra ≈ 1-2 нм.

В **Разделе 3.3** рассматриваются варианты изготовления мастер-форм методами лазерной обработки металлических сплавов. **Раздел 3.3.1** посвящен обсуждению результатов работ по изготовлению мастер-форм методом лазерной гравировки и полировки. При этом точность

изготовления структур методом гравировки и шероховатость поверхности уступают кремниевым технологиям: шероховатость может составить несколько микрометров. Лазерная полировка позволяет улучшить качество поверхности и достигнуть шероховатость поверхности $R_a = 0,05-0,3$ мкм [5].

В ООО «Лазерный центр» (Санкт-Петербург, Россия) были изготовлены мастер-формы из латуни ЛС59-1 и Л60 на установке Минимаркер 20 А4 с иттербиевым импульсным волоконным лазером с длиной волны 1,064 мкм и мощностью 20 Вт. Изготовление осуществляли в режимах лазерной гравировки (скорость перемещения луча $V=300$ мм/сек, частота следования импульсов $f=30$ кГц, мощность $P=18$ Вт) и лазерной полировки ($V=1000$ мм/сек, $f=100$ кГц, $P=15$ Вт). Измерения рельефа поверхности мастер-форм проводили на профилометре ХР-1 (Ambios Technology Inc., США) и СБОМ ИНТЕГРА Соларис. В экспериментах была получена шероховатость поверхности на уровне $R_a = 224-303$ нм на участках 50×50 мкм² (по данным СБОМ) и $R_a = 428-1440$ нм на участках 1000×1000 мкм² (профилометр ХР-1).

Раздел 3.3.2 посвящен описанию результатов создания мастер-форм для МФЧ с реакционными камерами из алюминиевого сплава АМг-6 и нержавеющей стали 40Х13 на установке лазерной гравировки «Штрих 013» с иттербиевым импульсным волоконным лазером с длиной волны излучения 1,05-1,07 мкм (АО «Научные Приборы», Санкт-Петербург, Россия). Время формирования микроструктур составило ~ 25 мин. После лазерной гравировки шероховатость поверхности оценивалась в несколько микрометров. Уменьшение шероховатости поверхности мастер-формы может быть достигнуто полировкой (химической, электрохимической, электронно-лучевой и электролитно-плазменной обработкой).

В разделе 3.3.3 обсуждаются возможности электронно-лучевых технологий обработки материалов и приводятся экспериментальные результаты, полученные при обработке образцов мастер-форм из ЛС59-1 ускоренными электронами на воздухе (ускоритель электронов РТЭ-1В) дозами 300 и 500 КГр. Поверхность мастер-формы изучалась до и после электронно-лучевой обработки на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе (КЛСМ) Leica TCS SL, СБОМ ИНТЕГРА Соларис и растровом электронном микроскопе Quanta Inspect с приставкой рентгеновского микроанализа EDAX (фирмы FEI). При электронно-лучевом воздействии наблюдается незначительное снижение шероховатости поверхности с $R_a \approx 325$ нм (до обработки) до $R_a \approx 308-280$ нм (после дозы 500 КГр). Электронно-лучевое воздействие приводит к изменению фазового и элементного состава поверхности материала, о чем свидетельствует появление в электронных спектрах линий углерода и α -Cu.

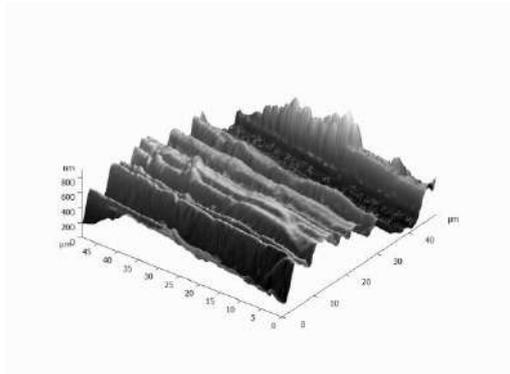
Раздел 3.3.4 содержит результаты исследований по снижению шероховатости поверхности мастер-форм при магнетронном напылении слоя хрома и электролитно-плазменной полировке. Нанесение на поверхность мастер-формы из ЛС59-1 слоя хрома толщиной ~ 100 нм привело к снижению средней шероховатости с $R_a \approx 290-340$ нм до $R_a \approx 182-237$ нм и изменению рельефа (СБОМ ИНТЕГРА Соларис).

Электролитно-плазменная полировка является современной технологией обработки металлических изделий со сложной геометрией и, при соответствующей подготовке изделия, позволяет достигнуть качества зеркальной поверхности ($R_a \sim 0,01$ мкм) при высокой производительности оборудования. В ООО «АЦИА» – Ассоциации центров инжиниринга и автоматизации проводили электролитно-плазменную обработку мастер-форм из стали 40Х13 в течение 8 мин по стандартной технологии, что позволило достигнуть средней шероховатости поверхности $R_a \approx 33-50$ нм, существенно меньшей (по крайней мере, в 4-10 раз) по сравнению с исходной (Рисунок 5).

В Разделе 3.4 приведены результаты исследований точности и воспроизводимости размеров микроструктур мастер-форм из латуни Л60, ЛС59-1, компаундов ПЭО-221К,

ПЭО-510КЭ, Resine R123 и получаемых от них реплик из ПДМС Sylgard® 184. Мастер-формы из металлических сплавов представляют собой массив выпуклых микроструктур. В репликах эти структуры формируют каналы, «глухие» отверстия в виде конусов, треугольников и т.д. Отклонение размеров структур с одинаковой геометрией для металлических мастер-форм может являться характеристикой воспроизводимости выбранной технологии изготовления структур.

а



б

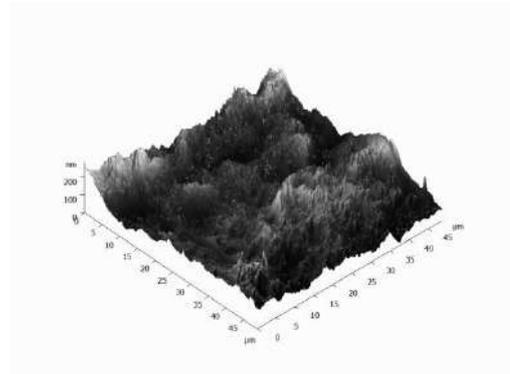


Рисунок 5 – Изображения рельефа поверхности мастер-формы из стали 40X13 до (а) и после (б) электролитно-плазменной полировки. СБОМ ИНТЕГРА Соларис, режим поперечных сил. Размер изображений 50x50 мкм²

Полученные данные свидетельствуют, что линейные структуры (каналы, полосы) в мастер-форме могут быть изготовлены методом лазерной микрообработки с отклонением (± 2 мкм) для размеров 50-250 мкм в латунных сплавах (Л60 и ЛС59-1), а при изготовлении структур, имеющих прямоугольное, треугольное или круглое сечение эта величина может варьироваться от ± 10 мкм (для треугольника со стороной 111 мкм, ЛС59-1) до ± 2 мкм (для структур с круглым сечением). Наилучшие результаты, с точки зрения воспроизводимости и точности изготовления, достигаются для линейных структур (шириной свыше 90 мкм) и цилиндрических структур (диаметром от 90 мкм). Формирование прямоугольных и треугольных структур удовлетворительного качества наблюдалось для размеров свыше 140-150 мкм.

Для оценки качества структур в ПДМС-реплике была построена зависимость отклонения размеров формируемых структур от соответствующих размеров мастер-формы (для образца ЛС59-1, Рисунок 6). По оси ординат отложена разность:

$$y = S_{Rj} - S_{MFj},$$

где S_{Rj} – контролируемый средний размер j -той микроструктуры в реплике R , S_{MFj} – соответствующий средний размер j -той структуры в мастер-форме.

ПДМС-реплики достаточно хорошо «повторяют» структуры латунных мастер-форм, самые лучшие результаты наблюдаются при репликации линейных структур, структур с круглым и квадратным сечением. Таким образом, мастер-формы из латуни наиболее подходят для МФЧ с простой топологией, содержащей линейные каналы, цилиндрические структуры и структуры с квадратным сечением с размерами от 90 мкм.

Анализ оценок воспроизводимости микроструктур в мастер-формах из ПЭО-221К, ПЭО-510КЭ и Resine R123, полученных с использованием «промежуточной» ПДМС-реплики, показал, что наилучшими характеристиками обладает шаблон из ПЭО-221К.

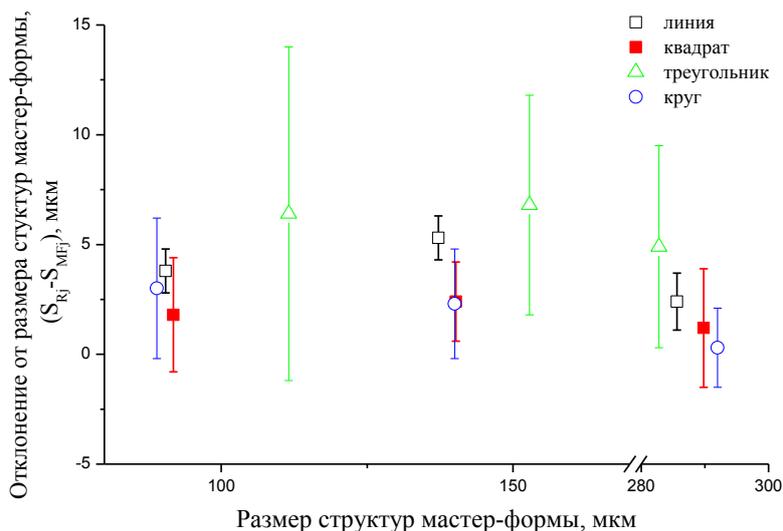


Рисунок 6 – Отклонения размеров микроструктур отпечатка ПДМС от соответствующих размеров структур мастер-формы из ЛС59-1

На Рисунке 7 приведена зависимость соответствия размеров микроструктур мастер-формы из ПЭО-221К размерам «промежуточного» отпечатка ПДМС Sylgard® 184 (полученного от мастер-формы Si/Su-8). В идеальном случае размеры структур реплики должны быть идентичны размерам соответствующих структур шаблона (мастер-формы), т.е. должна наблюдаться линейная зависимость размеров. Характеристики отклонения размеров структур реплики от размеров шаблона могут рассматриваться как интегральная оценка способа репликации при сравнении различных методов.

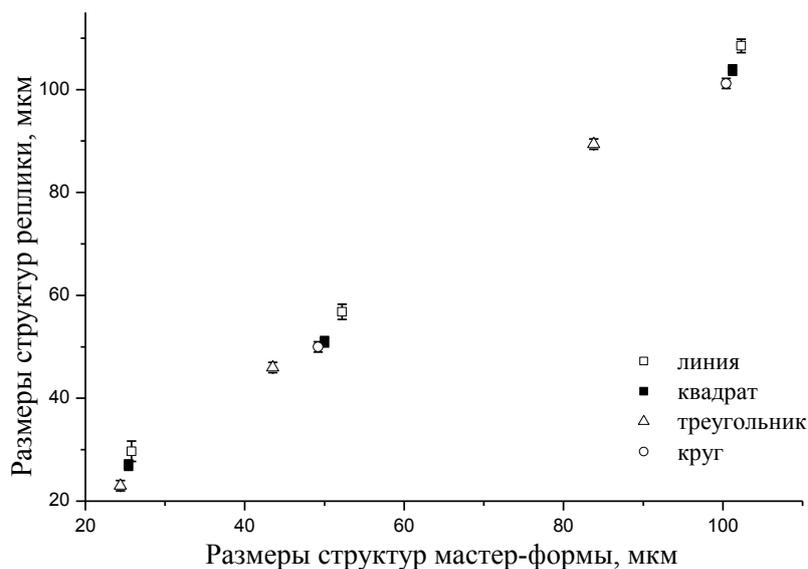


Рисунок 7 – Соответствие размеров микроструктур мастер-формы из ПЭО-221К размерам отпечатка ПДМС

При изготовлении мастер-формы из ПЭО-221К максимальные отклонения от размеров отпечатка ПДМС наблюдали для цилиндрических структур малого диаметра (менее 25 мкм), а наибольшее среднеквадратичное отклонение (СКО) – у линейных структур шириной 25 мкм. Также у линейных структур шириной свыше 100 мкм регистрировали отклонение размеров на уровне 6 мкм. Наименьшие отклонения выявлены для структур «квадрат» в интервале размеров от 25 до 100 мкм и цилиндрических структур диаметром от 40 до 100 мкм.

Анализ отклонения размеров отпечатков линейных микроструктур в ПДМС от мастер-формы из ПЭО-221К показал, что для мастер-формы наблюдаются отклонения δ от базовой ширины (для 25 мкм – $\delta = 3-7$ мкм, для 50 мкм – $\delta = 5-8$ мкм, для 100 мкм – $\delta = 7-10$ мкм), но формируемые от этой мастер-формы ПДМС-реплики имеют меньшее отклонение $\delta < 5$ мкм и СКО (Рисунок 8). Причем 1-ая и 10-ая реплики имеют примерно одинаковое СКО и отклонение $\delta < 3$ мкм для размеров 25, 50 и 100 мкм. Таким образом, использование мастер-формы из эпоксидной композиции ПЭО-221К позволяет получать отпечатки микроструктур в ПДМС, подходящие для практического использования в МФЧ.

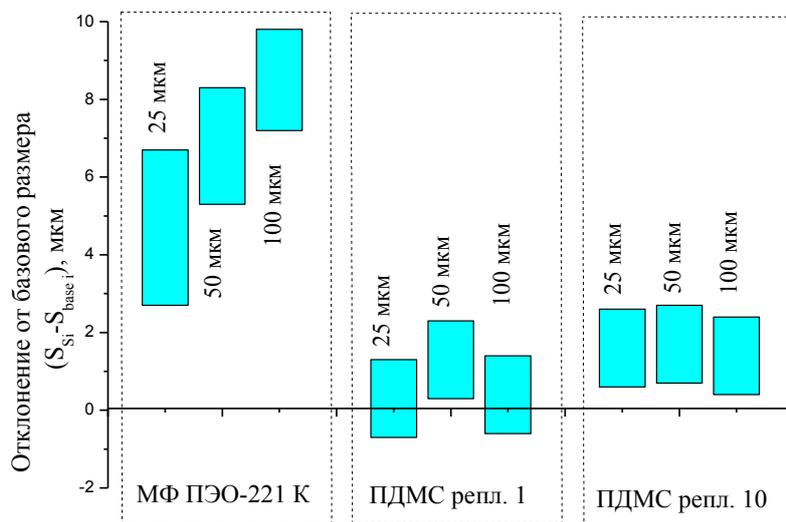


Рисунок 8 – Отклонения ширины линейной структуры мастер-формы из ПЭО-221К и ПДМС-реплик (1-ый и 10-ый отпечаток) от базового размера (25, 50 и 100 мкм)

В Разделе 3.5 рассматриваются способы и методы герметизации МФЧ. В разделе 3.5.1 обсуждаются способы создания неразъемного герметичного соединения между стеклянной подложкой и ПДМС-отпечатком: обработка соединяемых пластин в растворе «пиранья» и обработка высокочастотной плазмой (13,56 МГц) в среде аргона или кислорода при давлении ~1 мбар в течение 3,5 и 1,5 мин соответственно. Для герметизации реплики из эпоксидного компаунда и стеклянной подложки применяли клей Permabond UV630 (Permabond® Engineering Adhesives). Контроль качества соединяемых поверхностей проводили методом оптической микроскопии (раздел 3.5.2), а проверку герметичности МФЧ осуществляли при заполнении реакционной камеры раствором флуоресцеина и регистрации изображения флуоресценции раствора до и после температурного воздействия (3 часа при 90 °C). Полученные данные свидетельствует о сохранении герметичности МФЧ после температурного воздействия.

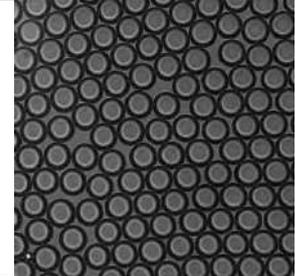
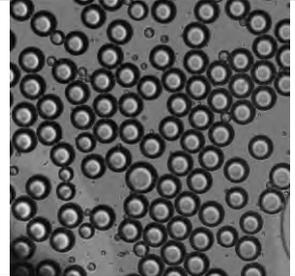
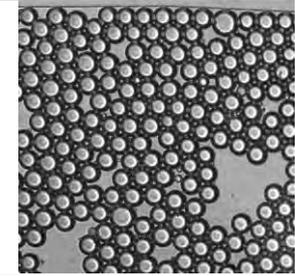
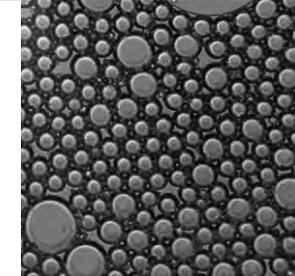
Раздел 3.5.3 содержит данные, полученные при проверке испаряемости буферного раствора из реакционной камеры МФЧ при температурном режиме изотермической амплификации (65° в течение 1 часа). Изучалось качество герметизации резервуаров для загрузки пробы в чипах ПДМС-стекло, Lasil T-4-стекло (композицией Пентэласт®-712) и в чипах ПЭО-221К-стекло (минеральным маслом). Регистрацию изображений флуоресценции раствора в реакционных камерах МФЧ проводили до и после температурного воздействия. Наименьшие потери пробы (по результатам визуальной оценки изображений) зафиксированы в микрочипах из эпоксидного компаунда (ПЭО-221К-стекло) и эластомера (ПДМС с ПО-пленкой-стекло). Результаты свидетельствуют об удовлетворительном качестве герметизации загрузочных резервуаров.

В четвертой главе приводятся результаты апробации МФЧ при амплификации нуклеиновых кислот и при разделении смеси нуклеиновых кислот на тестовых системах.

Раздел 4.1 посвящен исследованиям по созданию МФЧ для амплификации нуклеиновых кислот. МФЧ для генерации макроэмульсии «вода-в-масле» изготовлены методом «мягкой» литографии. Обработку поверхности каналов гибридного (ПДМС-стекло) МФЧ осуществляли гидрофобизирующим средством Aquapel (PPG Industries, США). Для регистрации процесса формирования макроэмульсий в режимах контролируемого давления и фиксированного расхода фаз была создана экспериментальная установка на основе КЛСМ Leica TCS SL с видеокамерой Pike F421B (Allied Vision Tech. GmbH, Германия).

В качестве непрерывной фазы применяли минеральное масло BioXtra (Sigma-Aldrich Corp., США) с добавлением поверхностно-активных веществ (ПАВ) Span[®] 80, Brij 35, Brij[®] L4 (Sigma-Aldrich Corp., США) и ABIL EM 180 (Evonik Industries, Германия). В качестве дискретной (дисперсной) фазы использовали модельный раствор, имитирующий ПЦР-смесь по составу, вязкости и pH. По результатам исследований были определены режимы и условия стабильной генерации макроэмульсий требуемых размеров. Воспроизводимые результаты при формировании капель получены при использовании ABIL EM 180 с концентрациями 3% и 4% как в режиме постоянного давления, так и в режиме фиксированного расхода фаз. Было показано, что применение 5% Span[®] 80 и 0,5% Brij[®] L4 и подбор условий эксперимента (расход масла и буферного раствора) позволяет добиться устойчивой генерации капель необходимых размеров. Результаты исследований по изучению температурной стабильности капель показали, что добавление 4% ABIL EM 180, а также 5% Span[®] 80 и 0,5% Brij[®] L4 в минеральное масло позволяет обеспечить температурную устойчивость капель (60-65 °С в течение 30-35 мин), что необходимо для реализации изотермической амплификации (Таблица 2).

Таблица 2 – Изображения капель в реакционной камере до и после температурного воздействия

Мин. масло + 4% ABIL EM 180		Мин. масло + 5% Span[®] 80 + 0,5% Brij[®] L4	
До нагрева	После 30 мин при 60 °С	До нагрева	После 35 мин при 65 °С
			
Диаметр капель			
63,6±2,1 мкм (n=40)	58,3±1,5 мкм (n=40)	47,5±2,2 мкм (n=40)	49,2±2,6 мкм (n=40)

Эксперименты по изучению возможности проведения изотермической амплификации осуществляли на МФЧ с генератором капель (Рисунок 9, а). В качестве непрерывной фазы (транспортного потока) использовали минеральное масло BioXtra с добавлением ПАВ (5% Span[®] 80 и 0,5% Brij L4), а в качестве дискретной фазы – реакционную смесь IsoAmp[®] II Universal tHDA Kit (BioHelix Corporation, США) для геликазы-зависимой изотермической амплификации. В качестве мишени использовали кДНК гена GAPDH. Амплификацию проводили в течение 1-го часа при 65 °С. Регистрацию результатов амплификации осуществляли по сигналу флуоресценции в потоке капель (объем капли ~29 нл) на КЛСМ Leica TCS SL при возбуждении на 488 нм (Рисунок 9, б). Полученные данные: а) подтверждают возможность регистрации результатов амплификации в транспортном потоке; б) свидетельствуют о том, что используемые ПАВ не оказывают влияние на флуоресценцию красителя EvaGreen[®].

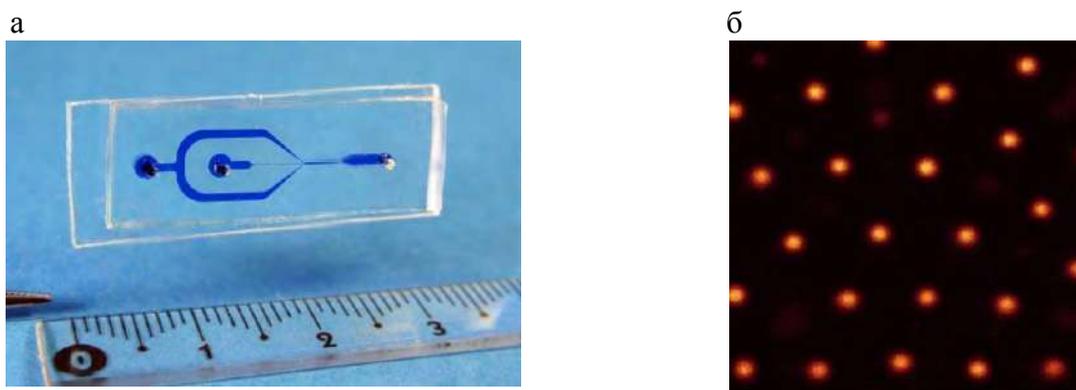


Рисунок 9 – а – Изображение МФЧ с генератором капель для изотермической амплификации; б – изображение потока эмульсии после амплификации, полученное на КЛСМ в режиме флуоресценции. Размер кадра (100 x 100) мкм²

Эксперименты по постановке ПЦР проводили на МФЧ с пятью парами реакционных камер (объем каждой камеры ~1,4 мкл) с интегрированной в ПДМС полиолефиновой пленкой (Рисунок 10, а). После заполнения камер реакционной смесью загрузочные резервуары герметизировались компаундом Пентэласт[®]-712 марки А, который отверждался на первой стадии нагрева МФЧ. ПЦР проводили по технологии TaqMan, применяли специфичные праймеры и зонд Су-5 (ООО «ДНК-Синтез», Россия) и реакционную смесь М-428 «ПЦР-Микс» (ЗАО «Синтол», Россия). В качестве мишени использовали фрагмент кДНК гена GAPDH длиной 226 пар оснований (п.о.) с концентрацией 10⁵ копий/мкл. Результаты ПЦР регистрировали на КЛСМ Leica TCS SL в режиме флуоресценции (650-670 нм) при возбуждении на 633 нм. Полученные данные свидетельствуют (Рисунок 10, б): а) о целесообразности применения компаунда Пентэласт[®]-712 для герметизации загрузочных резервуаров; б) об эффективности применения полиолефиновой пленки, предотвращающей испарение образца из реакционной камеры.

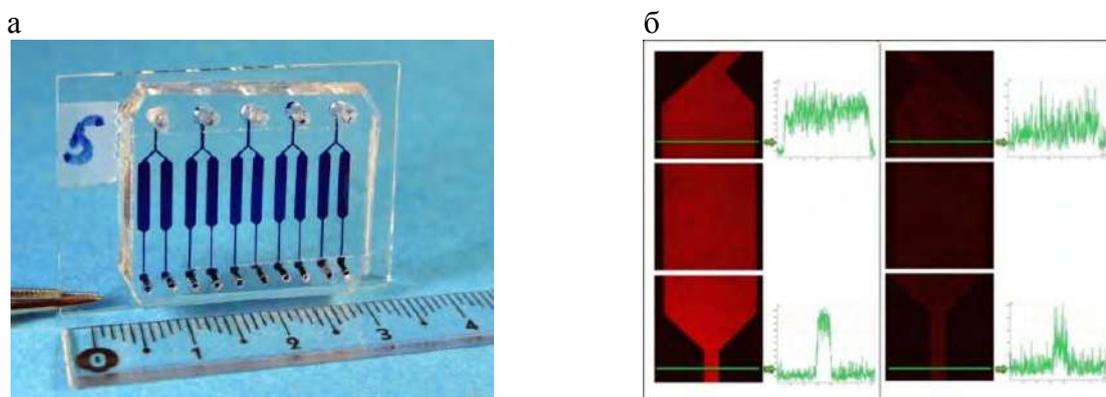


Рисунок 10 – а – Изображение МФЧ для ПЦР в жидкости с десятью реакционными камерами и интегрированной ПО-пленкой; б – изображения фрагментов реакционных камер после проведения ПЦР с мишенью кДНК (слева); без мишени, отрицательный контроль (справа), полученные на КЛСМ в режиме измерения флуоресценции. Справа от изображений – интенсивности сигналов флуоресценции в реакционной камере и подводящих каналах. Размер каждого фрагмента (1,5 x 1,5) мм²

Раздел 4.2 посвящен исследованиям по созданию гибридного МФЧ (ПДМС Sylgard[®] 184-стекло К8) для электрофоретического разделения пробы. Использовали универсальную топологию, сочетающую Т-инжектор и «простой» крест. Глубина каналов в ПДМС-реплике ~19 мкм, сепарационная длина – 43 мм. Электроосмотическую подвижность буферного раствора (50 мМ Na₂B₄O₇, pH=9,4) оценивали по результатам измерений изменения тока во времени. Изучали различные варианты обработки МФЧ, оказывающие влияние на электроосмотический поток. Наиболее эффективным способом обработки МФЧ, позволяющим достигнуть минимального значения электроосмотической подвижности, являлась обработка 3% водным раствором Kolliphor[®] P 188.

В качестве анализируемой пробы для электрофореза на МФЧ использовали смесь олигонуклеотидов (полиаденилатов) с длиной цепи 10, 20, 30, 40 и 50 нуклеотидов, меченных флуоресцентной меткой, в качестве буферного раствора – 6% раствор полидиметилакриламида с добавлением 7М мочевины. Электрофорез проводили на микрофлюидной аналитической системе МФАС-01 (ИАП РАН) с детектором лазер-индуцированной флуоресценции (длина волны возбуждения 473 нм, диапазон регистрации – 510-530 нм). Напряжение электрофореза составило 1500 В. Результаты разделения исследуемой пробы приведены на Рисунке 11. Время электрофореза смеси олигонуклеотидов в случае необработанного МФЧ составило ~ 275 с, а для обработанного раствором Kolliphor[®] P 188 ~ 220 с. Уменьшение величины электроосмотического потока привело к сокращению времени анализа.

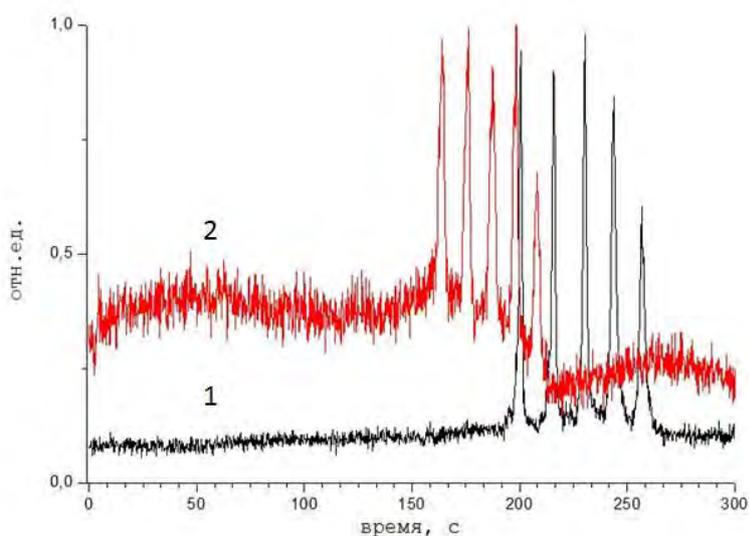


Рисунок 11 – Электрофореграмма разделения смеси олигонуклеотидов:
1 – для необработанного микрочипа, 2 – для обработанного раствором Kolliphor[®]

Основные результаты работы:

1. Предложены и обоснованы новые подходы к созданию прототипов микрофлюидных чипов, позволяющие усовершенствовать метод «мягкой» литографии (использование мастер-форм, полученных при дополнительной репликации или методом лазерной микрообработки), расширяющие возможности метода (изготовление микрофлюидных чипов из твердых материалов) и обеспечивающие снижение затрат при сокращении времени изготовления микрочипов.
2. Впервые проведенный комплекс исследований оптических и физико-механических свойств (светопропускание, флуоресценция, модуль упругости, угол смачивания поверхности) материалов позволил выбрать и обосновать перспективность применения отечественных эпоксидных компаундов (на примере ПЭО-221К, ПЭО-510КЭ-20/0, СПбГТИ (ТУ), Россия) и эластичных материалов (на примере Lasil T-4, Dow Corning,

Германия) в методах оперативного изготовления микрофлюидных устройств в условиях исследовательской лаборатории.

3. Оценки величин сигнала флуоресценции на длинах волн возбуждения красителей, применяемых в методах молекулярной диагностики, для выбранных материалов и конструкций с интегрированными полимерными пленками, позволили выработать рекомендации по применению этих материалов в МФЧ для обнаружения нуклеиновых кислот флуоресцентными методами.
4. Разработаны и созданы микрофлюидные чипы, предназначенные для амплификации нуклеиновых кислот, из ПДМС (Sylgard[®] 184, США) с интегрированной полиолефиновой пленкой (Sarstedt AG & Co., Германия) и пленкой циклоолефинового сополимера (ZEONEX[®], ZEON EUROPE GmbH, Германия). Встраивание пленок позволяет снизить испарение реакционной смеси из рабочей камеры микрочипа в процессе термоциклирования. Микрофлюидный чип с интегрированной полиолефиновой пленкой применен при обнаружении синтезированного фрагмента кДНК гена домашнего хозяйства GAPDH (226 п.о.) с концентрацией 10⁵ копий/мкл методом ПЦР по технологии TaqMan.
5. Выбраны условия стабильной генерации капель и показана возможность регистрации на микрофлюидном устройстве результатов геликаза-зависимой изотермической амплификации участка гена GAPDH (226 п.о.) в режиме детектирования флуоресценции от отдельных макроэмульсий в проточном режиме, что является основой для создания высокопроизводительных аналитических приборов для молекулярной диагностики
6. Результаты работы, связанные с созданием микрофлюидных чипов с генератором капель, предназначенных для методов амплификации нуклеиновых кислот, использованы при выполнении проекта «Микроустройства на основе принципов «капельной» микрофлюидики для химического и биологического анализа» Программы фундаментальных исследований президиума РАН № 8 «Химический анализ и исследование структуры веществ: фундаментальные основы и новые методы».

Список цитируемой литературы:

1. Xia, Y. Soft Lithography [Text] / Y. Xia, G.M. Whitesides // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 1998. – Vol.37. – P.550–575.
2. Tsao, C. Polymer Microfluidics: Simple, Low-Cost Fabrication Process Bridging Academic Lab Research to Commercialized Production [Text] / C. Tsao // *Micromachines.* – 2016. – Vol.7. – P.225.
3. Cheng, Z. Enclosed casting of epoxy resin for rapid fabrication of rigid microfluidic chips [Text] / Z. Cheng, Y. Gu, S. Lia, Y. Wang, H. Chen, J. Cheng // *Sensors and Actuators B: Chemical.* – 2017. – Vol.252. – P.785–793.
4. Bukatin, A.S. Peculiarities in the Formation of Microstructures with a High Aspect Ratio in Preparing Polymer Microfluid Chips for in vitro Analysis of Single Living Cells / A.S. Bukatin, I.S. Mukhin, E.I. Malyshev et al. // *Technical Physics.* – 2016. – Vol.61. – N.10. – P.1566–1571.
5. Laser Polishing of Metals [Электронный ресурс] – Электрон. текстовые дан. – Режим доступа: <http://www.ilt.fraunhofer.de/en/media-center/brochures/brochure-laser-polishing-of-metals.html>, свободный.

Основные результаты диссертации опубликованы в работах:

1. **Посмитная, Я.С.** Альтернативные подходы при создании мастер-форм для изготовления микрофлюидных чипов методом "мягкой" литографии [Текст] / **Я.С. Посмитная**, А.С. Букатин, Д.А. Макаров, К.В. Юдин, А.А. Евстрапов // Научное приборостроение. – 2017. – Т.27. – N.2. – С.13–20.
2. Игнатчик, М.М. Исследование изменения свойств смачивания поверхности полидиметилсилоксана и канала микрофлюидного чипа после воздействия высокочастотной плазмой в среде кислорода [Текст] / М.М. Игнатчик, **Я.С. Посмитная**, А.А. Евстрапов // Научное приборостроение. – 2016. – Т.26. – N.1. – С.41–46.
3. Кухтевич, И.В. Принципы, технологии и устройства "капельной" микрофлюидики. Ч.1 (обзор) [Текст] / И.В. Кухтевич, **Я.С. Посмитная**, К.И. Белоусов, А.С. Букатин, А.А. Евстрапов // Научное приборостроение. – 2015. – Т.25. – N.3. – С.65–85. Кухтевич, И.В. Принципы, технологии и устройства "капельной" микрофлюидики. Ч.2 (обзор) [Текст] / И.В. Кухтевич, **Я.С. Посмитная**, К.И. Белоусов, А.С. Букатин, А.А. Евстрапов // Научное приборостроение. – 2015. – Т.25. – N.3. – С.94–109.
4. Буляница, А.Л. Стекло-полимерные микрофлюидные чипы для электрофоретического разделения биомолекул [Текст] / А.Л. Буляница, **Я.С. Посмитная**, Г.Е. Рудницкая, Т.А. Лукашенко, А.И. Цымбалов, А.А. Евстрапов // Научное приборостроение. – 2014. – Т.24. – N.4. – С.67–76.
5. Рудницкая, Г.Е. Физико-химические методы модификации поверхности полиметилметакрилата для микрофлюидных чипов [Текст] / Г.Е. Рудницкая, Т.А. Лукашенко, **Я.С. Посмитная**, А.Н. Тупик, А.А. Евстрапов // Научное приборостроение. – 2014. – Т.24. – N.3. – С.22–31.
6. **Посмитная, Я.С.** Спектрофотометрический контроль соединения оптически прозрачных материалов и тонких слоев [Текст] / **Я.С. Посмитная**, А.А. Евстрапов // Научное приборостроение. – 2014. – Т.24. – N.1. – С.152–156.
7. **Посмитная, Я.С.** Микрофлюидные устройства для полимеразной цепной реакции [Текст] / **Я.С. Посмитная**, А.Л. Буляница, Г.Е. Рудницкая, А.Н. Тупик, Н.А. Есикова, Т.А. Лукашенко, А.И. Цымбалов, А.А. Евстрапов // Тезисы докладов Второй российской конференции с международным участием «Физика – наукам о жизни». – СПб.: ФТИ им. А.Ф. Иоффе. – 2017. – С.144.
8. **Posmitnaya, Y.S.** Polymer-based microfluidic chips for isothermal amplification of nucleic acids [Text] / **Y.S. Posmitnaya**, G.E. Rudnitskaya, A.N. Tupik, T.A. Lukashenko, A.S. Bukatin, A.A. Evstrapov // The Book of Abstracts 4th International School and Conference «Saint Petersburg OPEN 2017», Academic University Publishing St. Petersburg. – 2017. – P.181–182.
9. Евстрапов, А.А. Метод молекулярных колоний на стеклянных микрочиповых устройствах при определении РНК-онкомаркеров [Текст] / А.А. Евстрапов, Г.Е. Рудницкая, А.Л. Буляница, А.Н. Тупик, Т.А. Лукашенко, А.И. Цымбалов, **Я.С. Посмитная** // Биология и фундаментальная медицина в Санкт-Петербурге, материалы совещания Объединенного научного совета СПбНЦ РАН. – 14-15.04.2016. – С.59–62.
10. Тупик, А.Н. Микрочиповые устройства для высокочувствительной молекулярной диагностики [Текст] / А.Н. Тупик, **Я.С. Посмитная**, Г.Е. Рудницкая, А.А. Евстрапов // Тезисы докладов Первой российской конференции «Физика – наукам о жизни». – СПб.: ФТИ им. А.Ф. Иоффе. – 2016. – С.184.
11. Ignatchik, M.M. Study of changes in the wetting properties of the channels of the PDMS microfluidic chip depending of storage time and modification methods. Les Rencontres Scientifiques d'IFP Energies nouvelles. Microfluidics: from laboratory tools to process development. [Text] / M.M.

Ignatchik, **Y.S. Posmitnaya**, A.A. Evstrapov // Abstract volume, e-pub. – 4-5.11.2015. Rueil-Malmaison, France. – 2 pp.

12. **Posmitnaya, Y.S.** Design, development and testing of polymer-glass microfluidic chips for electrophoretic analysis of biological sample. / **Y.S. Posmitnaya**, G.E. Rudnitskaya, T.A. Lukashenko, A.S. Bukatin, A.A. Evstrapov // ICMN 2015: XIII International Conference on Microfluidics and Nanofluidics. – 9-10.07.2015. Prague, Czech Republic. – Vol.17. – N.7. – P.419.

13. **Посмитная, Я.С.** Особенности изготовления микрофлюидных чипов из полидиметилсилоксана для анализа биологических проб [Текст] / **Я.С. Посмитная**, Г.Е. Рудницкая, Т.А. Лукашенко, А.А. Евстрапов // Сборник статей Седьмой международной научно-практической конференции «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине». 20-21.11.2014. Санкт-Петербург, Россия. – С.78–82.

14. **Посмитная, Я.С.**, Изменение оптических и поверхностных свойств полидиметилсилоксана при обработке физико-химическими методами [Текст] / **Я.С. Посмитная**, Г.Е. Рудницкая, Т.А. Лукашенко, А.А. Евстрапов // Сборник трудов II Международной научно-практической конференции «Sensorica - 2014». – СПб: НИУ ИТМО. – 2014. – С.137–138.

15. **Posmitnaya, Y.S.** Investigation of the effect of PDMS processing techniques on the surface morphology, optical properties and wettability [Text] / **Y.S. Posmitnaya**, A.A. Evstrapov, G.E. Rudnitskaya, T.A. Lukashenko // Abstracts of papers presented at the EMBL Conference Series Microfluidics. – 2014. – P.142.

16. **Posmitnaya, Y.S.** Creation and inspection of functional layers in polydimethylsiloxane microfluidic devices [Text] / **Y.S. Posmitnaya**, A.A. Evstrapov, G.E. Rudnitskaya, T.A. Lukashenko // 2014 Sino-Russian Young Scientist Forum and Symposium on Advanced Materials and Processing Technology. Abstracts – Qingdao, China. – 2014. – P.96–97.