

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИНФОРМАЦИОННЫХ ТЕХНОЛОГИЙ, МЕХАНИКИ И ОПТИКИ

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

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата технических наук

Научный руководитель:
доктор технических наук
Евстрапов Анатолий Александрович

Санкт-Петербург – 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	12
1.1. Микрофлюидные устройства для молекулярной диагностики	13
1.2. Принципы и особенности «капельной» микрофлюидики. Конфигурации генераторов капель и физические принципы генерации	16
1.3. Создание стабильных макроэмульсий в микрофлюидных устройствах.....	18
1.4. Материалы для изготовления микрофлюидных чипов	20
1.4.1. Кремниевые и стеклянные материалы	21
1.4.2. Полимерные материалы.....	22
1.4.3. Эластомерные материалы. Полидиметилсилоксан.....	23
1.5. Методы и способы изготовления микрофлюидных устройств.....	25
1.5.1. Изготовление микрофлюидных устройств из полимерных материалов	26
1.5.2. Метод «мягкой» литографии.....	30
1.5.3. Развитие метода «мягкой» литографии.....	33
1.5.4. Герметизация микрофлюидных устройств и внешние интерфейсы	36
1.6. Методы и способы целевой модификации поверхности полимерных материалов	40
1.7. Контроль характеристик материалов микрофлюидных устройств	43
1.7.1. Спектроскопия полимерных материалов в ближней ИК области при оценке функциональных групп, содержащих CH_3 и OH	44
1.7.2. Контроль полимеризации эпоксидных компаундов и смол методами спектроскопии....	46
1.7.3. Определение угла смачивания на открытой поверхности и в канале микрофлюидных чипов.....	47
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1	50
2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ МИКРОФЛЮИДНЫХ ЧИПОВ	52
2.1. Исследование физико-механических свойств полимерных материалов (модуля упругости и смачивания поверхности).....	52
2.1.1. Оценка модуля упругости эластичных материалов	54
2.1.2. Оценка смачивания поверхности полимерных материалов.....	63
2.2. Методы и способы целевой модификации поверхности полимерных и стеклянных материалов	65
2.2.1. Обработка полидиметилсилоксана высокочастотной плазмой низкого давления в среде кислорода и аргона.....	65

2.2.2. Химические и физико-химические методы модификации	71
2.2.3. Контроль и оценка свойств модифицированных поверхностей ПДМС методами спектроскопии в ближней инфракрасной области.....	76
2.3. Оптические свойства полимерных материалов для микрофлюидных чипов	78
2.3.1. Спектральные зависимости светопропускания материалов для микрофлюидных чипов	79
2.3.2. Измерения величины фоновой флуоресценции материалов для микрофлюидных чипов	82
2.3.3. Определение времени отверждения эпоксидного компаунда ПЭО-221К методами спектроскопии.....	88
2.4. Проверка материалов на возможность ингибирования ПЦР	90
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 2	91
3. МОДИФИКАЦИЯ МЕТОДА «МЯГКОЙ» ЛИТОГРАФИИ	94
3.1. Изготовление мастер-формы из кремния и фоторезиста методами фотолитографии	97
3.2. Изготовление мастер-форм из эластомерного материала и эпоксидных смол по технологии «мягкой» литографии	99
3.3.1. Изготовление мастер-форм из латуни методом лазерной гравировки и полировки	103
3.3.2. Изготовление мастер-форм из металла методом лазерной гравировки.....	106
3.3.3. Электронно-лучевая обработка мастер-формы из латуни ЛС59-1	109
3.3.4. Исследование возможности улучшения качества поверхности металлических мастер-форм методами магнетронного напыления и электролитно-плазменного полирования.....	111
3.4. Контроль функционально-значимых размеров микроструктур мастер-форм и реплик .	115
3.5. Способы герметизации и контроль герметичности микрофлюидных устройств	123
3.5.1. Герметизация микрофлюидных устройств	123
3.5.2. Контроль герметичности микрофлюидного чипа оптическими методами	124
3.5.3. Проверка герметичности микрофлюидного чипа при температурном режиме изотермической амплификации.....	126
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3	129
4. ПРОВЕРКА РАБОТОСПОСОБНОСТИ МИКРОФЛЮИДНЫХ ЧИПОВ ПРИ АМПЛИФИКАЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И РАЗДЕЛЕНИИ СМЕСИ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ	132
4.1. Микрофлюидные чипы для амплификации нуклеиновых кислот	132
4.1.1. Обработка рабочей поверхности гибридного микрофлюидного чипа для генерации эмульсии.....	133
4.1.2. Экспериментальная установка на базе оптического микроскопа для регистрации процесса формирования эмульсии	135

4.1.3. Определение условий стабильной генерации капель	136
4.1.4. Экспериментальные исследования температурной и временной стабильности капель .	141
4.1.5. Амплификация нуклеиновых кислот на прототипах микрофлюидного чипа.....	142
4.2. Микрофлюидные чипы для электрофоретического разделения нуклеиновых кислот ...	144
4.2.1. Изготовление гибридных микрофлюидных чипов для электрофоретического разделения проб	145
4.2.2. Определение электроосмотической подвижности в микрофлюидных чипах.....	147
4.2.3. Электрофоретическое разделение смеси олигонуклеотидов	149
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4	151
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	152
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	154
СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО МАТЕРИАЛАМ РАБОТЫ	155
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	157
Приложение А	167
Приложение Б.....	169
Приложение В.....	172

ВВЕДЕНИЕ

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 (системы point-of-care) для экспресс-диагностики биологических образцов. 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) прототипирования микроустройств, 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). Метод предусматривает использование мастер-форм (шаблонов), получаемых с применением фотолитографии на фоторезистах и кремнии в условиях чистых помещений, что влияет на стоимость микрофлюидных 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 микрофлюидных чипов (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 микроизготовления 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. 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 рядом недостатков – паропроницаемостью, что ограничивает длительное использование МФЧ в режиме повышенных температур; гидрофобностью, что приводит к сложности при функционализации поверхности; эластичностью, ограничивающей его применение в условиях высоких давлений. Все это приводит к необходимости поиска альтернативных полимерных материалов, для которых можно было бы использовать метод «мягкой» литографии.

Таким образом, актуальным является развитие метода «мягкой» литографии, применяемого для изготовления полимерных микрофлюидных устройств и мастер-форм в условиях исследовательских лабораторий и позволяющего снизить стоимость и сократить длительность исследований при разработке новых методов анализа. Для этого необходимо проведение комплексных исследований, в том числе: а) поиск и выбор альтернативных эластичных и твердых материалов как для мастер-форм, так и для самих МФЧ; б) исследование их свойств (модуль упругости, смачивание поверхности, оптические свойства); в) модификацию метода «мягкой» литографии; г) определение способов физико-химической обработки поверхности полимеров с целью придания требуемых свойств; д) отработку методик репликации микроструктур в полимерных материалах с применением новых мастер-форм; е) изготовление экспериментальных образцов МФЧ из выбранных материалов и их апробацию на тестовых системах.

Цель и задачи работы

Разработка и апробация способов оперативного изготовления микрофлюидных устройств из полимерных материалов для методов молекулярной диагностики (для 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 фоновой флуоресценции и светопропускания материалов и 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 (реplik 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 Т-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. «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.

1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

Как полагают эксперты (отчет Yole Development, 2015 г.) рынок приборов на основе микрофлюидных технологий продолжит расти быстрыми темпами – с 2,5 млрд долл. США в 2017 году до 5,8 млрд долл. США в 2020 году (Рисунок 1.1). Годовой рост на 18% вероятно будет в основном зависеть от фармацевтических исследований и приложений Point-of-Care (PoC) [1].

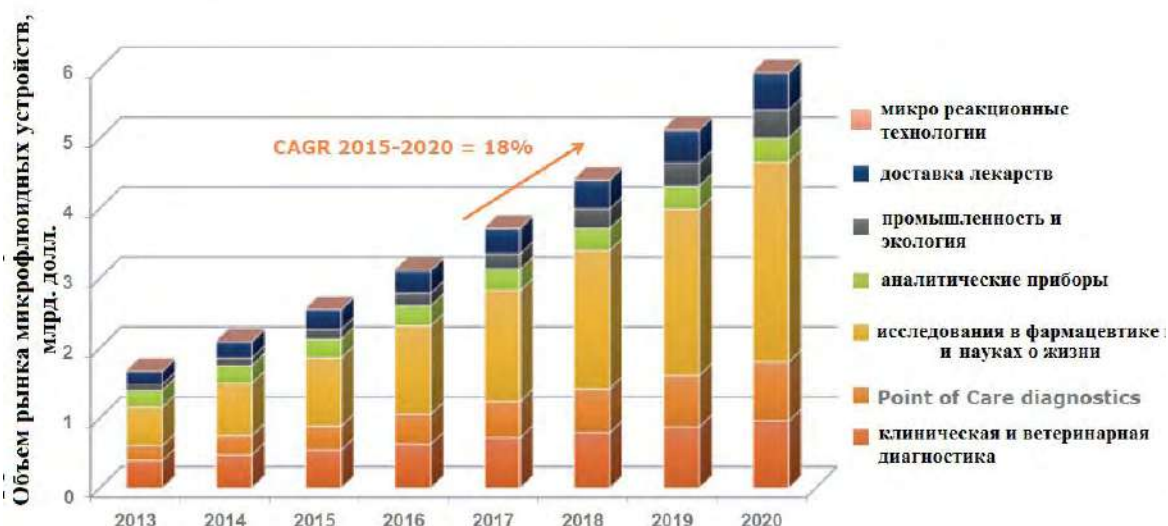


Рисунок 1.1 – Объем рынка микрофлюидных устройств по прогнозу Yole Development, 2015 год

Хотя микрофлюидные технологии уже достаточно давно развиваются, но только в последние несколько лет многие приложения обрели коммерческую значимость. Во-первых, использование микрофлюидных технологий в системах секвенирования следующего поколения (NGS) продемонстрировало новые возможности, повышающие точность и производительность исследований в геномике и протеомике. На высокопроизводительных аналитических платформах удалось существенно улучшить качество и эффективность лекарственных средств. Ряд эпидемий, зарегистрированных в различных странах мира, выявил потребность в быстром анализе на месте инцидента с использованием недорогих тестов. Это явилось мощным стимулом для развития систем PoC. Микрофлюидные технологии стали широко использоваться в системах PoC с 2014-2015 гг. и показали преимущества децентрализованного подхода к диагностике. Международные конфликты в агропродовольственной и водной промышленности привели к резкому увеличению потребности в высокочувствительных экспрессных тестах по обнаружению бактерий. Рост количества микрофлюидных приложений и обеспечивающей их

техники обусловлен спросом со стороны конечных пользователей на автоматизированные, интегрированные и миниатюрные устройства. В частности, высокочувствительная диагностика онкологических заболеваний на текущий момент времени может быть реализована с применением микрофлюидных устройств как на уровне подготовки проб (выделение циркулирующих опухолевых клеток и ДНК в жидких биопсиях), так и на уровне анализа (клеток и молекул нуклеиновых кислот). Organ-on-a-chip – это еще одно приложение микрофлюидики, которое может сформировать многомиллиардный рынок, так как позволяет использовать более удобные и прогностические модели для быстрого тестирования лекарств и химических соединений. Такие известные фирмы, как Abbott, Alere, bioMérieux и Roche разрабатывают или приобретают перспективные молекулярно-диагностические системы на основе микрофлюидных технологий (стартапы) или компании, которые работают в этой области. В микрофлюидике широко используются методы оперативного изготовления устройств, которые на этапе разработки новых систем помогают существенно снизить стоимость исследований и сократить время разработки.

1.1. Микрофлюидные устройства для молекулярной диагностики

Методы амплификации нуклеиновых кислот являются важным инструментом в биологических и медицинских исследованиях, так как значительно повышают чувствительность молекулярно-генетического анализа. Методы позволяют осуществлять многократное копирование исходной нуклеиновой кислоты, получив из единственной копии целевого фрагмента до миллиардов копий за время менее двух часов. Реализация этих методов в микрофлюидных устройствах (МФУ) 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.

Самыми распространенными методами амплификации нуклеиновых кислот на настоящее время являются методы, основанные на полимеразной цепной реакции (ПЦР). С их помощью можно с высокой точностью идентифицировать последовательность, характерную для определенного типа и вида микроорганизма. Заложённая в основу метода ПЦР амплификация образца позволяет проводить обнаружение на уровне фемто- и даже аттограммов нуклеиновых кислот [2]. В то же время данные методы обладают серьезным недостатком: из-за высокой чувствительности контаминация образца может существенно

отразиться на результатах. Необходимо проведение качественных контрольных тестов для подтверждения специфичности анализа и отсутствия искажений результатов.

Развитие технологий микрообработки и модификации материалов, совершенствование микрофлюидных устройств и детектирующих систем привело к появлению методов цифровой ПЦР (цПЦР). Были разработаны аналитические системы с реакционными камерами малых размеров: «цифровыми» панелями, например, Dynamic Array и Digital Array фирмы Fluidigm [3]; Open Array Real-Time PCR Platform фирмы Applied Biosystems [4]; микрофлюидными устройствами, например, SlipChip [5] и др. Новые технологии позволили создать управляемые микроклапаны, благодаря которым образец может быть поделен на тысячи частей, в которых проводится цПЦР. Например, используя чипы [6], одновременно проводилось 9180 реакций объемом 6 нл. Такой подход в настоящее время реализован в нескольких коммерческих приборах, например, Fluidigm BioMark™ Real-Time PCR и Fluidigm EP1™ end point PCR.

Другим успешным направлением развития систем для молекулярной диагностики является создание методов и приборов для проведения цПЦР в жидкости, изолированной от окружающей среды тонкой оболочкой масла или полимера. Эти методы основаны на технологиях «капельной» микрофлюидики [7]. Капли являются своеобразными реакционными камерами (объемом от 10^{-9} до 10^{-15} л), в которых могут быть проведены химические реакции или другие взаимодействия с исследуемым объектом. К преимуществам «капельной» микрофлюидики следует отнести: высокие скорости формирования капель (с частотами генерации от нескольких Гц до сотен кГц), малый расход реагентов и пробы, возможность полного контроля условий формирования капель, управление слиянием или «дроблением» капель и т.п.

Публикации результатов исследований по «капельной» микрофлюидике показывают ее огромный потенциал при создании приборов для высокопроизводительной молекулярной диагностики, химического и биохимического синтеза веществ [8], скрининга лекарственных средств [9], изотермической амплификации нуклеиновых кислот [10, 11], секвенирования [12, 13], исследования отдельных клеток и изучения процессов их функционирования [14] и т.д.

При анализе клинических образцов во многих случаях требуется реализовать высокую чувствительность обнаружения искомого компонента, например, при диагностике заболеваний на ранних стадиях и выявлении остаточных признаков заболевания, а дискретизация образца на множество проб (капель) малых объемов позволяет добиться чувствительности на уровне единичных молекул. Так, в случае сепсиса крови уровень патогенов соответствует 1-10 микробам на мл на фоне 10^7 белых кровяных клеток, что трудно обнаружить обычными

методами. Вариант «капельной» микрофлюидики позволяет увеличить эффективную концентрацию молекул-мишеней при проведении ПЦР в капле, содержащей ДНК.

Хотя в настоящее время методы «капельной» микрофлюидики не в достаточной мере реализованы в коммерческих системах для цПЦР из-за технических и методических проблем, но существует несколько вариантов серийно выпускаемых приборов. Например, QX200™ Droplet Digital™ PCR System (Bio-Rad Laboratories, Inc., США) [15] позволяет сформировать ~20 000 монодисперсных капель из 20 мкл образца реакционной смеси ПЦР; RainDrop® Digital PCR System (Raindance Technologies, Inc., США) [16] обладает производительностью 80 000 капель/сек в 8 каналах одновременно [17].

Аmplификация на основе ПЦР требует сложного оборудования для термоциклирования, что в некоторых случаях является неудобным как для повседневной клинической практики, так и для экспресс-диагностики. Это стимулирует развитие новых молекулярно-биологических методов, в том числе методов изотермической амплификации. Данные методы работают, как правило, при одной постоянной температуре, что позволяет создавать более простые и надежные приборы, которые подходят для использования в условиях ограниченных ресурсов (системы PoC) [18]. Таким образом, методы изотермической амплификации становятся перспективной альтернативой ПЦР, обладают высокой производительностью, специфичностью, экспрессностью и упрощенной пробоподготовкой. К особенностям изотермической амплификации можно отнести: необходимость применения специфических пар праймеров, невозможность использования продукта амплификации в дальнейших исследованиях, ограничение по длине применяемых фрагментов (не подходит для коротких фрагментов нуклеиновых кислот) и т.д. Разработка и создание МФУ, основанных на методах «капельной» микрофлюидики для изотермической амплификации может являться новой базой для высокопроизводительных аналитических приборов.

Метод капиллярного электрофореза (КЭ) широко используется в генетическом анализе и вошел в повседневную практику исследовательских и клинических лабораторий молекулярной биологии. На микрофлюидных чипах (МФЧ) могут быть реализованы почти все известные методики капиллярного электрофореза, используемые в практике исследовательских и клинических лабораторий при обнаружении мутаций, анализе экспрессии генов, однонуклеотидных полиморфизмов, детектировании гетерозигот, идентификации аллелей и т.д. В микрочиповом формате достигается ряд преимуществ: сверхмалые объемы анализируемой пробы и используемых реагентов, высокая скорость анализа, низкое энергопотребление, высокая чувствительность. Поэтому развитию и совершенствованию методов электрофореза на МФЧ уделяется внимание многих исследователей [19, 20].

1.2. Принципы и особенности «капельной» микрофлюидики. Конфигурации генераторов капель и физические принципы генерации

В МФУ капли могут быть сформированы с использованием активных и пассивных методов. Для активных методов характерно применение внешних источников энергии (электромагнитное излучение, тепловые поля, центробежные силы и т.п.), в пассивных формирование капель осуществляется за счет конструктивных особенностей устройства и подбора условий генерации капель. В транспортном потоке жидкости создаются необходимые условия для формирования регулярного и стабильного потока капель. Размер капель определяется геометрией устройства, вязкостью фаз, свойствами смачивания поверхности канала, соотношением потоков (скорость, расход) несмешивающихся фаз и межфазным натяжением.

Авторы [21] на основе результатов численного моделирования предложили три варианта режимов течения, приводящих к образованию капель: а) сжатия (*squeezing*), б) капающий (*dripping*) и в) струйный (*jetting*). Механизмы формирования капель в данных режимах и соответствующие им конфигурации генераторов капель приведены на Рисунке 1.2.

При размещении более узкого канала внутри широкого, капли могут быть сформированы при соосном течении потоков (Рисунок 1.2, а). Такая конструкция позволяет реализовать режимы формирования капель: «капающий» (*dripping*) и «сужающейся струи» (*narrowing jetting*). В такой конструкции могут формироваться капли-сателлиты с диаметров около 0,5% от диаметра капли.

В системе с пересекающимися каналами можно реализовать режим фокусировки потока жидкости (Рисунок 1.2, б). Дискретная (или диспергируемая) фаза подается через центральный канал, а непрерывная фаза (транспортный поток жидкости) подается через два канала, расположенных по обе стороны от него. Сжатие потока дискретной фазы при определенных условиях приводит к образованию капель в канале. Контролируя отношение расходов дискретной и непрерывной фазы можно формировать капли с заданными размерами. В такой конструкции реализуются четыре режима генерации капель: с «контролируемой геометрией» отрыва капель (*geometrically controlled break up*); «капающий» (*dripping*); «сужающейся струи» (*narrowing jetting*); «уширяющейся струи» (*widening jetting*).

Конструкция Т-инжектора (Рисунок 1.2, в) представляет собой систему пересекающихся под прямым углом каналов. В пространстве пересечения создаются условия для формирования капель, которые затем перемещаются в потоке непрерывной фазы по транспортному каналу. Размер/объем генерируемых капель ограничен площадью пересекающихся каналов. Возможны

режимы формирования капель: «капание» (*dripping*) и «выдавливание» (*squeezing*). В первом случае образуются капли сферической формы, а во втором – пробки дисперсной фазы.

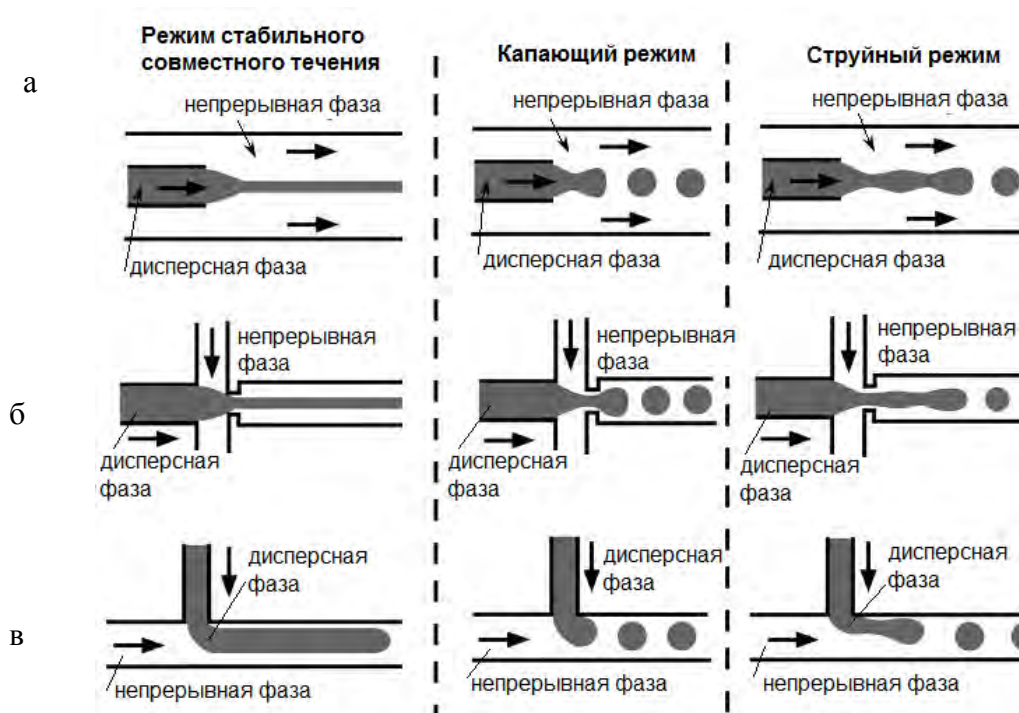


Рисунок 1.2 – Режимы течения потоков и формирования капель в базовых конфигурациях генератора капель: а – соосных потоков, б – фокусировки потока, в – Т-инжекции [22]

Отметим, что конструкция генератора капель с фокусировкой потока позволяет формировать макроэмульсии в широком диапазоне размеров (объемов). Эта важная особенность явилась основным аргументом при выборе базовой топологии МФЧ для дальнейших исследований.

Важной характеристикой жидкости на границе раздела сред является величина поверхностного натяжения, зависящая от сил молекулярного сцепления. Минимизация поверхностного натяжения на границе раздела жидких сред – одна из задач при создании стабильных капель, для этого приходится подбирать соответствующие эмульгаторы – поверхностно-активные вещества (ПАВ). В работе [23] было выявлено, что при низкой концентрации ПАВ частичное смачивание поверхности вызывает нарушение генерации капель, а в работе [24] показана важная роль кинетических эффектов. С использованием дистиллированной воды в качестве диспергируемой фазы и минерального масла (с добавлением 2% ПАВ Span[®] 80) в качестве непрерывной фазы были поставлены эксперименты на генераторах капель с фокусировкой потока, изготовленных из ПДМС. Эксперименты

свидетельствовали, что при движении потока краевой угол воды на стенках канала должен превышать $\theta_A \approx 92^\circ$ для генерации эмульсии «вода-в-масле» и оставаться ниже этого значения для формирования капель «масло-в-воде». Таким образом, для системы, позволяющей создавать стабильные капли с заданными свойствами (дисперсность, форма капель), необходимо осуществлять модификацию поверхности с использованием методов «мокрой» химии, химии силанов, плазменной обработки и других способов.

МФУ с генератором капель могут производить монодисперсные капли диаметром от 5 мкм до 120 мкм (объемом от $\sim 0,07$ пл до 0,9 нл) [25], что позволяет экономить реагенты. Капли могут содержать клетки, биомолекулы, ДНК или РНК и другие частицы или молекулы, находящиеся в водной фазе. За счет малого объема капель при их детектировании достигается низкий уровень шума регистрируемого сигнала, так как фоновый шум от раствора будет уменьшен пропорционально объему. Поскольку реакционное пространство в капле мало, а, следовательно, эффективная концентрация велика, то время реакции может быть снижено до нескольких секунд или минут (вместо нескольких часов в макросистемах). Минимальная концентрация продуктов реакции, необходимая для обнаружения, будет «наработана» быстрее в малых объемах, поэтому детектирование также может быть выполнено быстрее [26]. Транспортные среды (масло и другие вещества), которые применяются в качестве непрерывной фазы, предотвращают нежелательное взаимодействие между каплями и компонентами в них, твердыми поверхностями микрочипа и позволяют отделять капли друг от друга. При этом достигается минимизация загрязнения и перекрестной контаминации дискретных объемов пробы.

Компоненты капель могут быть объединены путем их слияния, что позволяет смешать их содержимое [27]. После проведения необходимых манипуляций и реакций капли могут быть отсортированы по определенным признакам, а их компоненты извлечены из масляной оболочки. Многие из методов, используемых в биологических исследованиях, можно реализовать на основе принципов и методов «капельной» микрофлюидики.

1.3. Создание стабильных макроэмульсий в микрофлюидных устройствах

Эмульсии могут быть образованы любыми несмешивающимися жидкостями (например, водой и жидкими углеводородными жирами). Существуют прямые (капли неполярной жидкости в полярной среде – «масло-в-воде», М/В) и обратные («вода-в-масле», В/М) эмульсии, однократные и множественные (мультифазные) эмульсии, в которых капли дисперсной фазы содержат в своем объеме более мелкие капли дисперсионной среды («вода-в-масле-в-воде», В/М/В; «масло-в-воде-в-масле», М/В/М и так далее).

Как уже упоминалось, для стабилизации эмульсий (капель) используют эмульгатор, в качестве которого применяют ПАВ, снижающее поверхностное натяжение между двумя жидкостями путем формирования на границе раздела жидкость-жидкость ориентированного слоя. Одним из условий выбора стабилизатора является его лучшая растворимость в той жидкости, которую предполагается сделать непрерывной фазой. Стабилизатор должен обладать хорошей адсорбционной способностью на границе раздела для выбранных жидкостей и располагаться между ними, т.е. содержать группы, обладающие сродством к обеим фазам, и уменьшать свободную энергию системы. Молекулы эмульгатора должны иметь достаточную длину, чтобы образовавшийся со стороны внешней фазы адсорбционный слой не допускал сближения капель на расстояние, где наблюдается преобладание ван-дер-ваальсовых сил притяжения.

Стабилизаторами прямых эмульсий являются водорастворимые ПАВ с высокими значениями гидрофильно-липофильного баланса (ГЛБ – баланс между действием полярной и неполярной частями молекул) более 8: анионные (мыла щелочных металлов), неионогенные (твины, этоксилаты спиртов), катионные (алкилимидазолины, четвертичные аммониевые соли), высокомолекулярные ПАВ природного (лецитины, полисахариды, липопротеины, белки) и синтетического (поливиниловый спирт, полиакрилаты и др.) происхождения. Для стабилизации обратных эмульсий используют моноалканоламиды, неионогенные ПАВ с низким ГЛБ (например, Span[®] 80, этиленоксилаты высших спиртов и кислот). ПАВ, которые лучше растворимы в воде, чем в масле, как правило, формируют эмульсии М/В, а ПАВ, которые лучше растворимы в масле – формируют эмульсии В/М [28]. Для каждого случая эмульгатор подбирается опытным путем, а при его выборе используются эмпирические зависимости и характеристики.

Для того чтобы выполнять операции с каплями, такие как воспроизводимая генерация, инкубация при разной температуре, транспортировка и слияние, важно использовать стабильные ПАВ. В качестве ПАВ, как правило, выбирают амфифильные молекулы с гидрофобными и гидрофильными группами. ПАВ адсорбируются на границе раздела масло-вода и снижают поверхностное натяжение, что препятствует слиянию капель и придает им метастабильность. Это означает, что эмульсии имеют ограниченное время жизни до слияния, которое может варьироваться от миллисекунд до нескольких лет в зависимости от стабилизирующих характеристик ПАВ и физических условий окружающей среды [29]. ПАВ для микрофлюидных технологий должны удовлетворять различным требованиям и обладать необходимыми свойствами для обеспечения эффективности выбранной методики анализа или синтеза. Так, в случае скрининга лекарственных средств, они должны быть совместимы с

клетками в течение времени, необходимого для исследования, быть инертными по отношению к компонентам в капле, регулировать молекулярный обмен между каплями и предотвращать миграцию биомолекул к границе [30].

Распространенными ПАВ в «капельной» микрофлюидике являются неионные Span и Tween, которые имеют хорошую стабильность в широком диапазоне pH и толерантность к электролитам. Для формирования капель В/М, как правило, используются коммерчески доступные углеводородные, фтористоуглеродные и минеральные масла. Капли в углеводородном масле обычно стабилизируют коммерчески доступными ПАВ – Span[®] 80 или ABIL EM90.

В микрофлюидных системах минеральное масло с добавлением ABIL EM90 применяется для цПЦР в каплях [31] и обеспечивает хорошую температурную стабильность. Однако высокая вязкость раствора обуславливает обратное давление при длительной инкубации капель в замкнутом объеме и приводит к нестабильности капель. Поэтому ABIL EM90 не подходит для методик, требующих длительной выдержки при повышенной температуре и сложных операций с каплями. Другой ПАВ ABIL EM180 [32] обладает хорошей термостабильностью и совместимостью с электролитами, а его применение в парфюмерной промышленности свидетельствует о хорошей биосовместимости.

Взаимодействие биологических молекул (белков, ДНК, РНК) с границей раздела вода-масло часто приводит к дезактивации, денатурации и локализации молекул на поверхности [33]. Чтобы уменьшить взаимодействие с биомолекулами используют неионные ПАВ [34]. Диффузия молекул в масляную фазу может привести к потере чувствительности при обнаружении аналита, неправильности экспериментальных результатов и перекрестной контаминации капель [35].

Итак, ПАВ, применяемые для микрофлюидных технологий, должны обеспечивать эффективность выбранной методики анализа или технологии синтеза, а именно быть инертными по отношению к компонентам в капле, биосовместимыми, а в случае их применения в методах амплификации нуклеиновых кислот – не ингибировать реакцию. Так как для регистрации результатов амплификации в капле используют флуорофоры, а влияние различных ПАВ на квантовый выход флуоресценции и образующиеся формы флуорофоров на текущий момент времени плохо изучено, то необходимо проводить и такие исследования.

1.4. Материалы для изготовления микрофлюидных чипов

Выбор материала для МФЧ предполагает определение технологического процесса изготовления микроструктур с учетом требуемых точностных и функциональных

характеристик структур, экономических затрат при организации необходимого объема производства устройств. Некоторые из металлов могут применяться в микрофлюидных приложениях, но редко в качестве материалов для самого МФЧ. Металлы обрабатываются механическим способом, химическим травлением, лазерной абляцией или электрическим разрядом. Обычно в микрофлюидике используют кремниевые, стеклянные и полимерные материалы. С конца 1990-х годов кремниевые и стеклянные материалы постепенно стали вытесняться полимерными в первую очередь из-за простоты их обработки и относительно низкой стоимости.

1.4.1. Кремниевые и стеклянные материалы

Кремний был первым материалом, используемым в микрофлюидике [36] и заимствованным от технологий микроэлектроники. Обработка кремния обычно происходит с применением фотолитографии и последующим изотропным или анизотропным травлением. Модификация кремния может осуществляться с применением химии силанов, т.к. на его поверхности находятся силанольные группы (-Si-OH), что приводит к снижению неспецифической адсорбции биомолекул. Непрозрачность кремния для ультрафиолетового (УФ) и видимого диапазона затрудняет использование устройств в методах оптического детектирования. Этот недостаток может быть устранен, если с кремнием соединить оптически прозрачный материал (полимер или стекло) – изготовить гибридный чип. Кремний, обладающий высокой теплопроводимостью, успешно использовался при создании МФЧ для ПЦР в капле [37].

В 1991 году А. Манц (A. Manz) и др. [38] обсуждали важность применения стеклянных материалов наряду с кремнием для микрофлюидных аналитических систем. Стекло является важным материалом для изготовления микрореакторов, где требуется высокая химическая и термическая устойчивость. Следует заметить, что обработка стекла и кремния обычно проводится методами травления с применением масок, что делает производство (обработку) двухэтапным по определению. Исключение составляет использование фото-структурированного стекла, которое является коммерчески доступным (например, *Fotoform by Corning*, США или *Foturan by Schott*, Германия).

Поверхность стекла может быть модифицирована с применением химии силанов. Стекло совместимо с биологическими образцами, имеет относительно низкую неспецифическую адсорбцию и непроницаемо для газов. В настоящее время стеклянные МФУ поставляются фирмами Dolomite [39], Micronit [40] и др. Использование стекла в микрофлюидных технологиях обусловлено: 1) его оптической прозрачностью в широкой области спектра, что

позволяет применять оптические методы детектирования; 2) отработанными технологиями герметизации, включающими термическое (500-1050 °С) и анодное связывание (70-500 °С, 50-1200 В), склеивание полимерными композициями (в том числе фотоотверждаемыми полимерами), метод глубокого оптического контакта и др. Эти технологии герметизации позволяют изготавливать устройства с системой микроканалов, устойчивых к высоким давлениям.

Использование стекла для быстрого прототипирования ограничено из-за необходимости применения специального оборудования, а также высокой стоимости самого материала и процесса обработки в условиях чистых помещений. Процессы микрообработки стекла являются трудоемкими и требуют длительного времени изготовления, при этом используются агрессивные среды, влияющие на свойства материала.

1.4.2. Полимерные материалы

С начала 1990-х годов широкое применение в микрофлюидике получили полимерные материалы, описанные, например, в обзоре [41]. Это было вызвано спросом на дешевые и одноразовые МФЧ, которые становятся все более значимыми в биомедицинских и клинических приложениях. Полимеры не требуют процессов химического структурирования (таких как травление), связанных с использованием опасных веществ (например, фтороводородная кислота). В промышленности полимеры обычно обрабатывают с помощью технологий репликации, преимущественно путем литьевого формования, что позволяет достичь высокопроизводительного и сравнительно дешевого по стоимости производства. Достоинствами полимеров являются: их низкая стоимость, широкий ассортимент материалов, отработанные методы получения микроструктур и простота их изготовления, биосовместимость, возможность серийного выпуска изделий. Все это позволяет создавать одноразовые чипы, технология утилизации которых также является доступной. Полимеры обладают хорошей прозрачностью, что делает возможным использование этих устройств с системами оптического детектирования. Менее трудоемкими по сравнению со стеклянными материалами являются способы герметизации каналов и реакционных камер. Обычно применяются методы спекания (при температурах до 250 °С), связывание полимерными композициями (в том числе и фото- или термоотверждаемыми клеями), адгезивами и др.

Методы изготовления микроструктур в полимерных материалах имеют свои особенности, например, методы прессования и литья в форму подразумевают использование прецизионных и дорогостоящих мастер-форм. Некоторые полимеры не могут использоваться

при температурах выше ~ 100 °С, так как они становятся пластичными и могут менять форму, что сказывается на характеристиках устройств.

Широко применяемыми полимерами в микрофлюидике являются: полидиметилсилоксан (ПДМС), полиметилметакрилат (ПММА), поликарбонат (ПК), полиимид, полистирол, поливинилхлорид, SU-8 и др.

Полиметилметакрилат, акриловое стекло – прозрачная или полупрозрачная (бесцветная или окрашенная) термопластичная производная акриловых смол [42]. ПММА относится к термопластам, которые при нагревании размягчаются до текучести, а после охлаждения – затвердевают. Акриловое стекло обладает высокой устойчивостью к старению, действию атмосферных факторов, устойчивостью к ультрафиолету. ПММА поддается механической обработке и горячей формовке. При обработке ПММА необходимо учитывать особенности: высокий коэффициент линейного теплового расширения, чувствительность к механическим повреждениям, восприимчивость к тепловому излучению.

Поликарбонат относится к группе термопластов (сложные полиэфиры угольной кислоты и двухатомных спиртов) объединенных общей формулой $(-O-R-O-CO-)_n$ [43]. ПК обладает высокой жесткостью и прочностью. Отличается хорошими оптическими свойствами, высокой теплостойкостью, незначительным водопоглощением, характеризуется стойкостью к ультрафиолетовому излучению, биологически инертен. Устойчив к действию водных растворов минеральных и органических кислот, бензина, спиртов, масел, но не стоек к щелочам, концентрированным кислотам, органическим растворителям, к действию хлорсодержащих углеводородов жирного и ароматического ряда, диоксана, метакрезола и тетрагидрофурана.

1.4.3. Эластомерные материалы. Полидиметилсилоксан

Перспективными и востребованными материалами для оперативного изготовления микрофлюидных устройств в условиях научно-исследовательских лабораторий являются *эластомеры* – поперечно слабосвязанные полимеры, эластичные и упругие, восстанавливающие свою форму после снятия напряжения. Они обладают низким модулем упругости и высокой прочностью. Среди терморезистивных эластомеров особое место занимает ПДМС – наиболее часто используемый материал для создания прототипов микрофлюидных устройств.

Впервые использование ПДМС в качестве материала для создания микроустройств было рассмотрено в работах Г. Вайтсайда (G. Whitesides) [44]. Материал является эластичным, достаточно прочным, биосовместимым, обладает высокой адгезией к кремнию и стеклу. В процессе полимеризации материал испытывает умеренную усадку (1-3%) [45] и в нем можно

формировать прецизионные структуры. ПДМС устойчив к температурам до 200 °С, ко многим химическим средам, а также обладает высокой паропроницаемостью. Широко применяемый для макетирования в микрофлюидике ПДМС Sylgard® 184 (Dow Corning, США) [46] представляет собой двухкомпонентный материал, при получении которого используется смесь основы и отвердителя. Полимер позволяет с высокой точностью получать реплики структур размерами до 10 нм, является оптически прозрачным в диапазоне от 240 до 1100 нм, обладает незначительным двойным лучепреломлением, имеет коэффициент теплопроводности ~0.18 Вт/м*К. Упругие механические свойства ПДМС позволяют создавать пневматические клапаны, элементы для микронаносов и интегрировать их в микрофлюидные чипы. Реакция полимеризации ПДМС включает гидросилилирование диметилсилоксана с концевыми виниловыми группами, входящего в состав основы, с олигомерным метил гидросилоксаном, входящим в состав отвердителя, и требует присутствия платинового катализатора.

Поверхность ПДМС гидрофобна, так как содержит $-O-Si(CH_3)_2-$ группы. В некоторых случаях такое свойство материала является недостатком и приводит к необходимости дополнительной обработки. Для изменения свойств смачивания применяют различные способы физико-химической обработки материалов, например, воздействие плазмой в среде различных газов (кислород, аргон и др.). Силанольные группы на поверхности ПДМС, образующиеся после плазменной обработки, позволяют взаимодействовать с силанами (Si_nH_{2n+2}), которые содержат различные функциональные группы (NH_2 , $COOH$, SH и др.), что дает возможность менять свойства полимера и формировать реакционноспособные группы [47].

ПДМС – пористый материал. Пористая структура может использоваться для разделения газов, фильтрации соединений, а также для создания различных индикаторных элементов (например, при внедрении молекул флуорофора по изменению флуоресценции можно контролировать температуру устройства). В то же время пористость ПДМС делает устройство водо- и газопроницаемым, что может приводить к испарению пробы [48].

ПДМС набухает при контакте с неполярными растворителями (пентан, хлороформ и др.), что вызывает искажение рабочих поверхностей (каналов) и влияет на характеристики потока жидкости. Для устранения и минимизации этого эффекта применяются методы модификации наночастицами диоксида кремния или создания защитных покрытий, например, золь-геля [49, 50].

Особенностью ПДМС является нестабильность свойств поверхности после обработки, обусловленная диффузией мономеров. После плазменной обработки в среде кислорода поверхность приобретает гидрофильные свойства, но по истечению некоторого времени при хранении материала в нормальных условиях происходит частичное восстановление

гидрофобных свойств. Исследователи разных стран прилагают усилия по разработке методов и средств, устраняющих эти недостатки ПДМС.

Часто при изготовлении МФУ используют сочетания материалов, например, стекло и полимеры, кремний и полимеры. Такие гибридные конструкции идеально подходят для исследовательских лабораторий, если требуется разработать прототип устройства или системы за относительно короткое время и провести на нем исследование, так как большинство современных лабораторий оснащено технологическим оборудованием для формирования микроразмерных элементов в полимерных материалах. Здесь особую роль играют технологии «мягкой» литографии.

1.5. Методы и способы изготовления микрофлюидных устройств

Для получения микрофлюидных чипов необходимо сформировать в выбранном материале микроразмерные функциональные элементы, в частности: микроканалы, реакционные камеры, микросмесители, переходные камеры и т.д. К этим структурам предъявляются высокие требования, как к геометрическим характеристикам, так и к свойствам поверхности. Используемые технологии должны обеспечивать воспроизводимую прецизионную обработку материалов.

Традиционным методом изготовления микроструктур в подложках из кремния и стекла является литография – процесс формирования на поверхности подложки требуемых функциональных элементов с помощью чувствительных к высокоэнергетическому излучению (ультрафиолетовому свету, электронам, ионам, рентгеновским лучам) покрытий с последующим травлением (жидкостным, электронным, рентгеновским, ионно-реактивным способом).

Фотолитография является доминирующей технологией изготовления структур микрометровых размеров, но не всегда лучшим и/или единственным вариантом для всех приложений. Эта технология плохо подходит для формирования структур на неплоской поверхности, не позволяет контролировать химию поверхности и, следовательно, непригодна для изготовления 2D-структур специфических химических слоев на поверхности и применима только для светочувствительных материалов – фоторезистов. Для работы с другими материалами необходимо использовать хромофоры или добавлять фотосенсибилизаторы, но ни одна из этих процедур не является удобной. Разрешение оптической проекционной литографии ограничивается дифракционным пределом (критерий Рэлея).

Причиной разработки литографических процессов с использованием электронного, рентгеновского и ионного излучений являлась необходимость улучшения разрешающей

способности процесса вплоть до получения элементов с субмикронными размерами менее 0,2 мкм. Все эти процессы сложны, занимают много времени, требуют высокотехнологичного и дорогого оборудования, участия высококвалифицированных специалистов, а поэтому не находят широкого применения для создания микрофлюидных устройств. В основном они используются для создания прецизионных шаблонов и масок.

Перспективы применения микрофлюидных устройств в биомедицинских приложениях, системах диагностики на месте и др. привели к необходимости создания одноразовых устройств. Для изготовления микроструктур в полимерных материалах не применяются агрессивные реагенты, а оборудование для изготовления полимерных устройств оказалось дешевле систем для кремний-стеклянных технологий, более экономичным в эксплуатации. Эти факторы позволяют получать микрофлюидные устройства в условиях исследовательских лабораторий, что приводит к развитию микрофлюидики в академическом и исследовательских секторах, ее внедрению в сферы промышленного применения.

1.5.1. Изготовление микрофлюидных устройств из полимерных материалов

После нескольких лет исследований полимерных материалов, разработаны различные технологии микрообработки с использованием простых и недорогих инструментов. В зависимости от материала МФЧ, требуемых характеристик и реализуемой методики анализа или синтеза определяется способ обработки полимера и технологии (способы) формирования функциональных микроструктур. Условно способы формирования микроструктур можно разделить на группы: с применением фотошаблонов, с применением мастер-форм и прямого воздействия на материал.

Полимерные материалы, обычно используемые в микрофлюидике, можно разделить на: термопласты (термопластичные) и реактопласты (термореактивные). Термопластичные полимеры (полиметилметакрилат, полиэтилентерефталат, поликарбонат, полистирол, полиимид и др.) могут быть многократно преобразованы при нагреве в высокоэластичное либо в вязкотекучее состояние и в этой фазе им будет придана нужная форма. Важным свойством является то, что термопласты обладают возможностью повторной переработки, что является существенным для утилизации изделий. Реактопласты при формовании в изделия претерпевают необратимые химические реакции с образованием сшитой структурной сетки макромолекул (отверждение) с образованием полимера. После отверждения изделия не могут быть вторично переработаны. К реактопластам относят фенопласты (основа – фенолформальдегидные смолы), эпоксипласты (основа – эпоксидные смолы), эфиропласты (основа – акриловые олигомеры) и др. Следует выделить *эластомеры* – полимеры и материалы на их основе, характеризующиеся

высокоэластичными свойствами в диапазоне эксплуатационных температур. Эластомеры способны упруго деформироваться при нагрузке, а при ее снятии – возвращаться в исходное состояние. К эластомерам относят каучуки, каучукоподобные полимеры, резины.

Для изготовления МФЧ из термопластов применяются различные методы обработки. Например, доступными являются микрообработка с использованием станков с числовым программным управлением (ЧПУ) и лазерная абляция, которые имеют ограничения по разрешению размеров структур и шероховатости поверхности, но являются важными инструментами, когда требуется оперативная проверка работоспособности концепции устройства без изготовления мастер-форм или иных приспособлений. Для массового производства могут использоваться: горячее тиснение и импринтинг, литье под давлением. Выбранный метод изготовления для каждого полимера определяет минимальные размеры получаемых структур и их аспектное соотношение (соотношение высоты (глубины) к ширине).

В работе [51] дается краткий обзор методов микроструктурирования полимеров для микрофлюидных устройств, обсуждаются текущие проблемы исследований и будущие возможности производства полимерных устройств. Особое внимание уделяется сравнению термопластов и ПДМС. Более обширные возможности, с точки зрения выбора методов изготовления и способов герметизации предоставляются при использовании термопластов. На основе анализа используемых подходов и возможностей применения современных технологий изготовления устройств для микрофлюидики авторами предложено схематичное представление процесса изготовления полимерных микроустройств (Рисунок 1.3). Авторы полагают, что в настоящее время полимерные МФУ находятся на этапе перехода технологии от исследовательских лабораторий к промышленному производству.

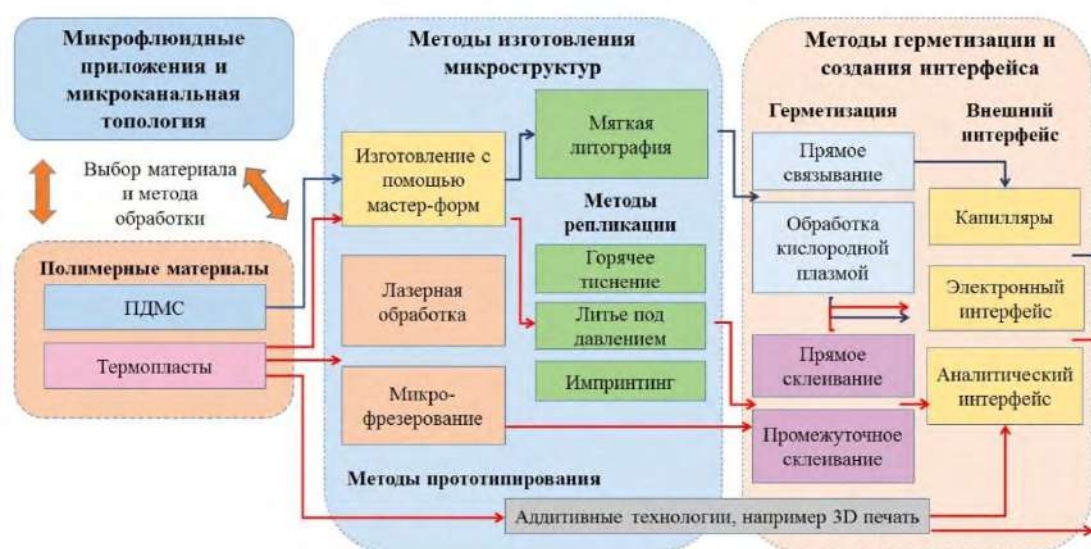


Рисунок 1.3 – Стадии разработки и изготовления полимерных микрофлюидных устройств

К настоящему времени для полимерных материалов разработано множество доступных технологий формирования микроструктур, которые условно можно разделить на группы:

1. технологии непосредственного (прямого) формирования (все виды прецизионной механической микрообработки, в том числе и лазерной, лазерная абляция) [52, 53];
2. технологии с использованием масок и шаблонов (плазменные методы, некоторые виды литографии, например, рентгеновская) [54];
3. методы с применением мастер-форм (литье в форму, инжекционное литье, горячее тиснение, «мягкая» литография и др.) [55];
4. аддитивные технологии, 3D-принтинг [56-58];
5. комбинированные методы (например, сочетание методов механической обработки и «мягкой» литографии) [59].

Методы прямого изготовления микроструктур являются подходящими для лабораторий и небольших организаций, занимающихся исследованиями и разработкой приборов (но не серийным выпуском). Хотя оборудование и имеет относительно высокую стоимость (системы лазерной микрообработки, ионной литографии и др.), но обладает универсальностью и многофункциональностью и может быть перепрограммировано под любую топологию микрофлюидного устройства.

Лазерная абляция (ЛА) – метод удаления вещества с поверхности материала (через шаблон или непосредственно на подложке) под воздействием лазерного излучения. В литературе термин ЛА обозначает совокупность сложных физико-химических процессов, результатом которых является удаление или унос вещества с поверхности или объема твердого тела [60]. Плотность мощности излучения должна превышать порог режима абляции, при этом наблюдается вынос вещества (аэрозоля) с образованием кратера на поверхности. При движении лазерного луча по поверхности материала могут быть сформированы структуры, соответствующие траектории перемещения лазерного пятна. Применение УФ лазеров обеспечивает получение структур с пространственным разрешением до 0,2 мкм и ниже. При ЛА полимерных материалов характеристики формируемых микроструктур определяются свойствами полимера, параметрами используемой установки (длина волны излучения, мощность лазера), геометрией светового потока и условиями среды, в которой осуществляется абляция. Скорость процесса изготовления микроструктур и несомненные удобства при оперативной корректировке топологии МФЧ делает лазерные системы незаменимым инструментом для микромеханической обработки. Однако при этом методе обработки формируемая поверхность имеет значительную шероховатость, что уменьшает оптическую

прозрачность, а в процессе обработки происходит загрязнение поверхности продуктами абляции.

Для создания воспроизводимых микроразмерных структур в полимерах применяются методы литья в форму, горячего тиснения и инжекционного литья (Рисунок 1.4).

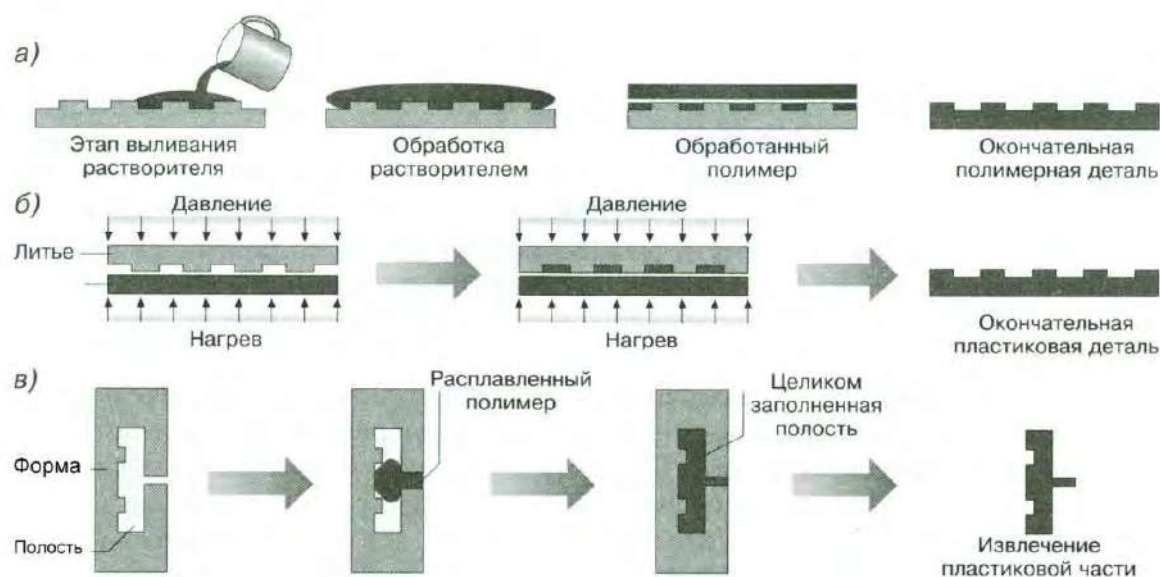


Рисунок 1.4 – Формирование микроразмерных структур в полимерных материалах методами:
 а) литья в форму; б) горячего тиснения; в) инжекционного литья [55]

Литье и горячее тиснение являются простыми и доступными для лабораторного использования методами, но требуют применения высокоточных дорогостоящих форм (пресс- и мастер-форм), с помощью которых можно получить большое число отпечатков (реplik) микроструктур.

Инжекционное литье используется для получения пластмассовых изделий в больших объемах при низкой стоимости одной единицы. Включает в себя впрыск под высоким давлением расплавленных термопластичных гранул в нагретую форму. Стандартное операционное время отливки одного изделия может занимать несколько секунд. Даже учитывая, что параметры литья должны быть оптимизированы для каждого производственного цикла, инжекционное литье является высокопроизводительным методом. Из-за сложности и высокой начальной стоимости формовочного оборудования и твердых металлических литейных мастер-форм, данный метод редко используется для методов оперативного прототипирования.

Горячее тиснение, которое состоит в прессовании нагретой кремниевой или металлической формой термопластичного листа, такого как ПММА или циклических олефиновых сополимеров, производится при температуре, близкой к температуре стеклования

полимера с образованием требуемых структур. Тиснение является быстрым и менее дорогим методом, чем литье, но требует специального оборудования и мастер-форм. Данный метод обладает дополнительными преимуществами: возможностью применения большинства термопластичных полимеров и относительно низкими затратами при серийном производстве. Но и в этом случае необходимы металлические или силиконовые формы, которые изготавливаются с использованием технологий фрезерования или другими методами микрообработки, что требует временных затрат и участия квалифицированных специалистов.

В настоящее время развиваются методы горячего тиснения. Так в работе [61] сообщается об оперативном способе изготовления микроканалов в ПММА с использованием трехмерных печатных металлических пресс-форм из нержавеющей стали. Оценивалась воспроизводимость реплик из ПММА, полученных от одной формы, за 40 циклов, при этом геометрические характеристики и размеры каналов оставались практически неизменными на протяжении всего периода исследования. Использование для подобных целей форм из ПДМС (соотношение основа : отвердитель 5:1) при изготовлении реплик каналов глубиной 70 мкм в предварительно размягченном ПММА имеют ограниченный срок службы ~ 20-25 циклов [62].

Необходимость оперативного получения экспериментальных образцов МФЧ в условиях научно-исследовательских лабораторий требует упрощения и совершенствования всего процесса изготовления устройств с использованием доступных технологий и недорогих материалов (твердых или эластичных), для которых отработаны и оптимизированы процессы герметизации. В связи с этим широкое распространение находят методы быстрого прототипирования, которые обладают такими характеристиками, как малый срок изготовления и недорогой полный цикл от проектирования топологии до изготовления, упаковки и тестирования. Быстрое прототипирование МФУ используется на этапе разработок, когда новые идеи должны быть оперативно апробированы. Такой подход должен сократить время исследований, удешевить разработку устройств, облегчить передачу конструкций от уровня лабораторных исследований к производству в больших объемах без значительных модернизаций, что, однако, требует применения материалов со схожими физико-химическими свойствами.

1.5.2. Метод «мягкой» литографии

Метод «мягкой» литографии был предложен G.M. Whitesides и др. и основан на применении эластичных полимерных реплик и мастер-форм (например, из полидиметилсилоксана), отпечаток структур на которых получен с помощью оригинальной жесткой мастер-формы [44].

На первом этапе необходимо изготовить мастер-форму (шаблон) из твердого материала. Обычно для этого используется кремниевая подложка и фоторезист SU-8. Этапы изготовления схожи с традиционной литографией, но процесс является менее трудоемким и основан на экспонировании и проявлении фоторезиста. В некоторых случаях необходима силанизация поверхности мастер-формы для уменьшения адгезии с полимерными материалами из которых получают реплики. Однако мастер-формы из кремния являются достаточно дорогими, хрупкими и позволяют получить ограниченное число реплик (~50 шт.). Оборудование для литографии также является дорогостоящим, а процесс изготовления мастер-формы требует участия квалифицированного персонала и проводится в условиях чистых помещений. На следующем этапе раствор полимера заливают на мастер-форму, осуществляют дегазацию, после чего все помещают в термошкаф для полимеризации. После отверждения полимер отделяют от мастер-формы и таким образом получают реплику с микроструктурами.

Полученная реплика допускает три варианта использования:

1. непосредственно для изготовления микрофлюидных устройств, тогда в ней проделывают отверстия для загрузочных резервуаров и гидравлических интерфейсов; проводят физическую, химическую или физико-химическую обработку реплики и защитной пластины (стекло, эластомеры, термопласты) для герметизации каналов.

2. в качестве мастер-формы для получения 2D-структур методом «молекулярной» печати, а также 3D-структур в термопластах, эпоксидных компаундах и других термо- и фотореактивных полимерах.

3. являться основой для мастер-форм из твердых материалов, которые впоследствии будут использованы для получения отпечатков в ПДМС (что позволяет увеличить число получаемых реплик за счет более длительного срока службы твердой мастер-формы или ее тиражирования) или термопластах.

Во втором случае можно выделить следующие методы: микроконтактная печать, микроинжекционное литье, литье в капиллярах, формование, получение структур с помощью растворителя и др. [63].

Микроконтактная печать (Microcontact Printing)

Различают следующие варианты печати:

- а) печать на плоской поверхности с планарной мастер-формы;
- б) печать на плоской поверхности с помощью роликовой мастер-формы;
- в) печать на неровной поверхности при помощи планарной мастер-формы.

В случае а) поверхность мастер-формы помещают в раствор гексадеканола, молекулы которого образуют на поверхности подложки, покрытой слоем золота или хрома, самоорганизующийся монослой при контакте мастер-формы с подложкой. Далее происходит травление металла на тех участках, которые не покрыты слоем молекул. Во втором случае на закрепленную на ролике мастер-форму из ПДМС наносится гексадеканол и при прокатывании ролика по поверхности подложки происходит «печать». В случае в) происходит прокатывание объекта между пленкой ПДМС и мастер-формой, покрытой гексадеканолом. При использовании этого метода структуры мастер-формы ограничены низким аспектным отношением и происходит диффузия молекул по поверхности вне области печати. Достижимое разрешение: 0,1-100 мкм [63].

Формование (Replica Molding)

Для данного метода структуры на поверхности ПДМС по ширине должны быть больше 50 нм. Поверх мастер-формы заливается раствор другого преполимера, отверждается и отсоединяется (Рисунок 1.5, А)).

Микроинжекционное литье (Микротрансферное литье) (Microtransfer Molding)

Раствор преполимера заливается поверх мастер-формы из ПДМС, так чтобы заполнить промежутки между структурами, избыток полимера удаляется. Мастер-форма с полимером помещается на подложку структурами вниз. Далее происходит отверждение полимера, отделение мастер-формы от ПДМС (Рисунок 1.5, В)). На поверхности подложки формируются необходимые структуры. Особенностью является наличие остаточной пленки преполимера на подложке в пространстве между структурами. Достижимое разрешение: 1-100 мкм.

Литье в капиллярах (Micromolding in Capillaries)

Мастер-форма из ПДМС помещается структурами вниз на подложку. С одной стороны структур помещается небольшое количество раствора преполимера, заполнение каналов происходит за счет капиллярных сил (Рисунок 1.5, С)). После отверждения полимера, мастер-форма из ПДМС отделяется от него. Достижимое разрешение: 1-100 мкм. Капиллярное литье является улучшенной версией «мягкой» литографии – объединение наноимпринтинга и использования эластомерной мастер-формы. Когда рисунок (структуру) на ПДМС-форме помещают на поверхность полимера и нагревают выше температуры стеклования, за счет капиллярных сил расплавленный полимер заполняет каналы, образованные мастер-формой и поверхностью полимера, формируя негативную копию структур. Формирование шаблона

возможно в полимере, содержащем растворитель, или в композиции, отверждаемой УФ-излучением, с последующим выпариванием растворителя.

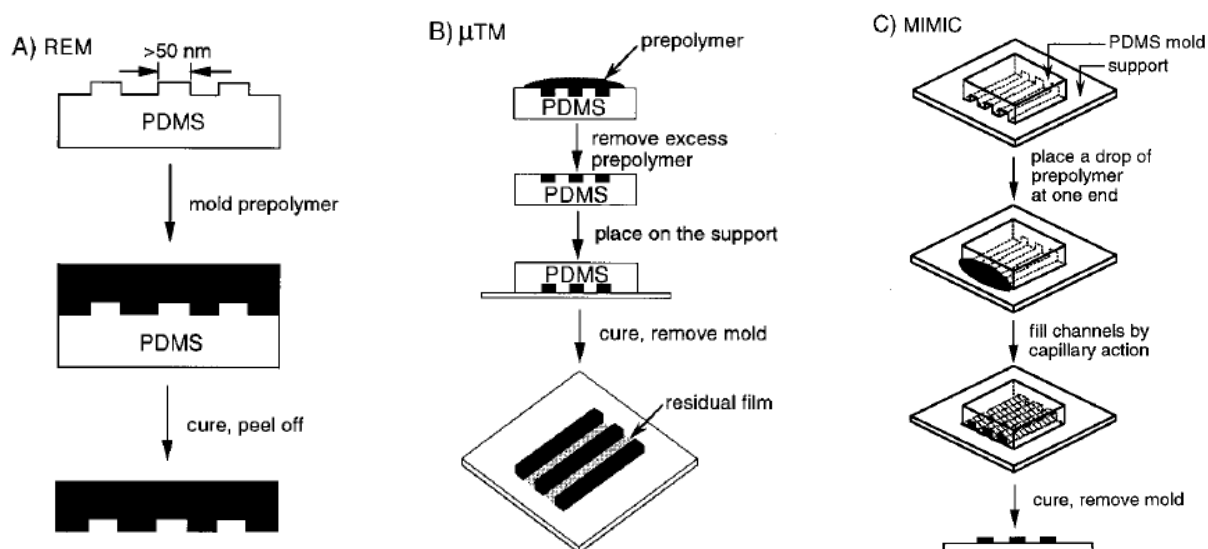


Рисунок 1.5 – Иллюстрация процедур для: А) формования, В) микротрансферного литья, С) литья в капиллярах [63]

1.5.3. Развитие метода «мягкой» литографии

Существует несколько различающихся методов изготовления микрофлюидных устройств в зависимости от конечной цели – промышленного массового производства или быстрого прототипирования для исследовательской лаборатории. Несмотря на преимущества ПДМС и широкое его использование в академических лабораториях, эластичность материала не позволяет работать при высоком давлении, поскольку это приводит к изменению геометрии структур. Деформация затрудняет точное прогнозирование скорости потока в сложных микрофлюидных каналах, управление инерционным движением частиц и потоков для приложений цитометрии и т.д. В последнее время появились примеры использования полимеров с большей жесткостью и лучшей устойчивостью к растворителям (термореактивный полиэстер TPE, полиуретановый метакрилат PUMA и Norland Adhesive 81, NOA81). При этом используются процедуры изготовления, основанные на методе «мягкой» литографии. В обзоре [64] оцениваются различные альтернативные ПДМС материалы для быстрого прототипирования с учетом возможности их использования в микрофлюидике при высоких давлениях и инерционной микрофлюидике. Оцениваются биосовместимость, устойчивость к растворителям и трудоемкость изготовления. В статье приводится сравнение протоколов для изготовления чипов из ПДМС, PUMA, TPE и NOA (Рисунок 1.6). При изготовлении чипов из

PUMA, NOA и TPE использовалась мастер-форма из ПДМС, поверхность которой обрабатывалась силаном.

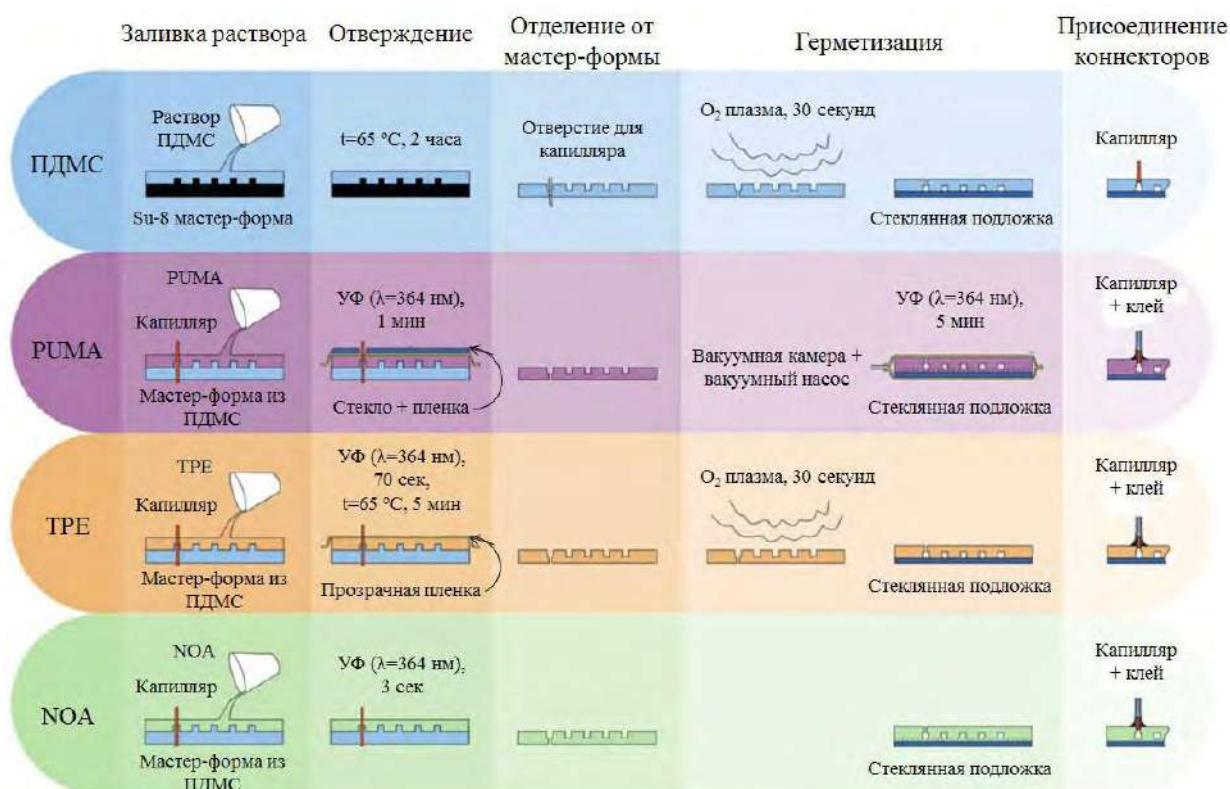


Рисунок 1.6 – Сравнение протоколов изготовления микрофлюидных чипов из разных материалов [64]

Одним из направлений метода «мягкой» литографии является техника двойного литья (*double casting technique*), которая состоит в изготовлении мастер-формы из ПДМС и использовании этой формы для получения ПДМС-реплик. Готовые реплики применяются в качестве мастер-форм в техниках «мягкой» литографии или горячего тиснения. Например, с помощью мастер-формы из ПДМС возможно получать микроструктуры в ПММА. Необходимой стадией в технике двойного литья является создание разделительного слоя на поверхности мастер-формы из ПДМС.

В работе [65] рассматривается метод обработки, уменьшающий адгезию и основанный на применении биосовместимого парилена С. Для нанесения покрытия использовали процесс химического осаждения из газовой фазы, что позволило увеличить угол смачивания с $117,2^{\circ}$ до $141,2^{\circ}$. Расчеты показали уменьшение поверхностной энергии на мастер-форме с $13,1\text{ мДж/м}^2$ (ПДМС) до 3 мДж/м^2 (парилена). С помощью указанной техники авторы изготавливали реплики со структурами тороидальной, секторной и древовидной формы. Удалось получить тороидальные структуры с соотношением сторон 20:1. Измерение углов на структурах

секторной формы показало расхождение угла мастер-формы и реплики в пределах от 0 до $2,3^\circ$, среднее отклонение составило $0,85^\circ$. Измерения линейных размеров реплик показали отклонение в 0,1 мкм. Авторы также исследовали критическое соотношение сторон цилиндрических структур: при соотношении высоты к диаметру 20:1 (диаметр 5 мкм) наблюдалась существенная деформация.

В статье [66] авторами было предложено использовать 1Н, 1Н, 2Н, 2Н-перфтордецилтрихлорсилан для обработки мастер-формы с предварительной активацией поверхности коронным разрядом. Покрытие из силана позволило увеличить значение краевого угла со 105° до 113° и уменьшить поверхностную энергию с 20 мДж/м^2 до $15,4 \text{ мДж/м}^2$. За счёт высокой химической стабильности обработанные мастер-формы можно хранить до 1 недели перед использованием.

Авторы [67] применяли обработку поверхности мастер-формы из ПДМС в фосфатном буферном растворе (5 мМ, pH 3), содержащим 0,1% (мас./мас.) гидроксиполиметилцеллюлозы. Измерения краевого угла обработанной поверхности показали аналогичные свойства смачивания, как у исходного образца ПДМС.

Эпоксидные смолы считаются перспективными материалами для микрофлюидных приложений [68, 69].

В работе [70] описывается технология литья пластмасс для изготовления МФЧ на основе эпоксидной смолы. Авторы считают, что эпоксидное литье – это недорогой метод для массового изготовления «жестких» высококачественных микрофлюидных устройств с превосходными физическими и химическими свойствами для различных биохимических применений. Эта высокопроизводительная техника с низкими расходами в отличие от других технологий изготовления пластмасс (горячее тиснение и литье под давлением) способна производить микроструктуры с высоким разрешением при низких температурах. При необходимости к готовым твердым эпоксидным репликам могут применяться обычные методы микрообработки.

Совсем недавно, в 2017 г. в статье [71] продемонстрирована возможность применения промышленно доступной эпоксидной смолы Hexion в качестве дополнительного материала для быстрого изготовления жестких микрофлюидных устройств. Использование ПДМС в качестве мастер-формы позволило создать эпоксидные отпечатки. Для эпоксидной смолы были разработаны простые способы склеивания с большинством обычных материалов, используемых в микрофлюидике, что позволило достигнуть прочности сцепления $\sim 261 \text{ кПа}$ для эпоксидной смолы и ПДМС, 1185 кПа для смолы и стекла и 1516 кПа для эпоксидной конструкции. Это исследование подтвердило возможность использования эпоксидной смолы в качестве

материала для быстрого тестирования новых конструкций МФЧ в лабораторных условиях, для которых ПДМС не подходит.

Разработка способов формирования структур с высоким аспектным соотношением представляет большой интерес для технологий микроэлектромеханических систем (МЭМС) и микрофлюидики. В исследовании [72] представлен новый метод обработки эпоксидных материалов на основе прямого лазерного воздействия и описывается применение метода для быстрого прототипирования микроструктур с высоким аспектным соотношением более 40.

1.5.4. Герметизация микрофлюидных устройств и внешние интерфейсы

Методы соединения (герметизации) МФЧ могут быть условно разделены на: (I) термические, (II) химические и (III) клеевые.

При термическом методе происходит соединение изделий друг с другом при давлении и температуре, близкой к температуре стеклования (T_g). Этот метод применяется для соединения пластин, изготовленных из жестких полимеров (ПК или ПММА), тонких пленок (ламинирование). Для улучшения качества соединения проводится обработка поверхности материала в водном растворе или органическом растворителе. Термическое соединение является простым и недорогим способом получения прочного соединения. Недостатком является необходимость применения относительно высоких температур и агрессивных сред, которые могут влиять на структуру герметизируемых пространств и свойства поверхности.

Химический метод основан на применении химических и физико-химических методов модификации с целью получения на поверхности соединяемых материалов особых функциональных групп, при контакте которых происходит образование химической связи.

Наиболее распространенным методом герметизации конструкций ПДМС-ПДМС, ПДМС-стекло, ПДМС-SU-8 является плазменная обработка в кислородной или аргоновой среде. При этом образуется неразъемное соединение. Измерение силы связывания (соединения) между SU-8 и ПДМС, проведенное авторами [73] показали, что в результате плазменной обработки в среде азота при мощности генератора 70 Вт прочность соединения увеличилась до $\sim 0,4$ Мпа.

При клеевом соединении осуществляется нанесение слоя клея или связывающего полимера на поверхность подложки. Этот метод позволяет соединить различные типы материалов, но часто приводит к изменению геометрии микроканалов (рабочих камер) и химии поверхности. В этом методе важно подобрать необходимую толщину наносимого слоя, вязкость композиции для предотвращения затекания клея в микроструктуры, а также убедиться в том, что клей не оказывает влияние на проводимые в МФУ реакции.

Подробно способы герметизации термопластов описаны Tsao и DeVoe в работе [74]. Как правило, герметизация достигается путем прямого связывания, либо с использованием промежуточного соединения. К методам прямого связывания относят: термическое соединение [75, 76], ультразвуковую сварку [77], модификацию поверхности [78-80] и связывание растворителями [81, 82]. Непрямыми методами являются, например, склеивание с использованием эпоксидных смол, адгезивов [83-85] или микроволновое соединение [86].

Наиболее распространенным методом герметизации ПДМС и различных термопластов (поликарбонат, полиметилметакрилат, полистирол, циклоолефиновый сополимер) является силанизация (например, используют аминопропилтриэтоксисилан и тетраэтоксисилан) как самостоятельно [87], так и в сочетании с последующей обработкой коронным разрядом [88, 89] или кислородной плазмой [90].

Герметизация гибридных конструкций из ПДМС и таких полимеров, как полиметилметакрилат, поликарбонат, полиимид и полиэтилентерефталат описана в работе [91].

Для изготовления МФУ из полиметилметакрилата могут применяться следующие методы обработки с целью создания герметичного соединения: гидролиз, катализируемый серной кислотой [92]; обработка этиловым спиртом с последующим воздействием УФ [93]; обработка кислородной плазмой и создание покрытия из поливинилового спирта [94].

После завершения процесса изготовления и герметизации микроканалов необходимо подключить устройство к периферии с помощью внешнего интерфейса. Это является важным аспектом, определяющим успех практического применения и потенциала к коммерциализации. В обзоре Temiz и др. сообщается о методах подключения МФУ к насосам, устройствам ввода пробы, электронике и аналитическим интерфейсам [95].

Большинство эластомерных и термопластичных МФУ обычно использует стандартный разъем типа «Луер» (Luer lock/cone) или коннекторы [96] для создания интерфейса. Могут также применяться хирургические иглы [97] или разработанные заказчиком соединители [98].

Основываясь на данных, приведенных в [51] была сформирована Таблица 1. 1, в которой приведено сравнение методов изготовления и способов герметизации МФЧ. При потребности до 300 шт. микрочипов в месяц метод «мягкой» литографии является наиболее целесообразным методом изготовления. При больших партиях МФЧ следует ориентироваться на методы горячего тиснения или метод лазерной микрообработки (с более низкой точностью разрешаемых структур). Метод импринтинга требует применения достаточно редкого оборудования и, по-видимому, высоких эксплуатационных расходов. Литье под давлением – технология, ориентированная на массовое производство, вряд ли может быть рекомендована для исследовательских учреждений.

Таблица 1.1 – Сравнение методов изготовления микроструктур для МФЧ и способов герметизации

	Метод	Оборудование / стоимость	Особенности
Методы изготовления микроструктур	Мягкая литография	Вакуумная печь (стоимость около 60 000 руб.), вакуумный насос	Материалы: эластомеры, эпоксидные компаунды Производительность: 0,5-1 час/цикл, 150-300 шт./мес. Температура: 80 °С Разрешение: субмикронный диапазон
	Горячее тиснение	Термопресс (стоимость ~1 200 000 руб.)	Материалы: термопласты, дюропласты Производительность: 10-20 минут/цикл, 300-1000 шт./мес. Температура: 100-200 °С Разрешение: субмикронный диапазон
	Лазерная обработка	Лазерная установка (стоимость ~900 000 руб.)	Материалы: термопласты, дюропласты Производительность: 5-30 минут/цикл, 300-2000 шт./мес. Разрешение: >100 микрометров (толщина пучка)
	Микро-фрезерование	Станок с ЧПУ (стоимость ~1 800 000 руб.)	Материалы: твердые полимеры Производительность: 5-30 минут/цикл, 300-2000 шт./мес. Разрешение: >100 микрометров (размер кончика фрезы)
	Импринтинг	Роликовый импринтер (стоимость ~600 000 руб.)	Материалы: термопласты Производительность: 10-30 секунд/цикл, >5000 шт./мес. Разрешение: субмикронный диапазон
	Литье под давлением	Установка для литья (стоимость ~2 400 000 руб.)	Материалы: термопласты, дюропласты Производительность: 10-30 секунд/цикл, >5000 шт./мес. Температура: 150-400 °С Разрешение: субмикронный диапазон

Продолжение Таблицы 1.1

	Метод	Оборудование / стоимость	Особенности
Методы герметизации	Прямое склеивание термопласта (УФ-обработка)	Термопресс (стоимость ~1 800 000 руб.) и установка для УФ-обработки (700 000 руб.)	Производительность: 10-30 минут/цикл, 300-1000 шт./мес. Сила связывания: 1,7 МПа
	Прямое склеивание термопласта (спекание)	Термопресс (стоимость ~1 800 000 руб.)	Производительность: ~30 минут/цикл, ~300 шт./мес. Сила связывания: ~1 МПа
	Плазменная обработка ПДМС в кислородной среде	Установка плазменной обработки (стоимость 900 000 руб.)	Производительность: 5-30 минут/цикл, 1000-2000 шт./мес. Сила связывания: ~300 кПа
	Прямое связывание ПДМС	Не требуется	Производительность: ~2 минуты/цикл, ~5000 шт./мес. Сила связывания: ~160 кПа
	Промежуточное связывание термопластов	Не требуется	Производительность: ~2 минуты/цикл, ~5000 шт./мес. Сила связывания: 10-800 кПа

1.6. Методы и способы целевой модификации поверхности полимерных материалов

Большинство полимерных материалов обладают гидрофобными свойствами и невысокой концентрацией реакционноспособных функциональных групп. Для изменения поверхностных свойств широко применяются физические, химические и физико-химические методы модификации: воздействие потоком энергии (обработка плазмой, УФ, коронным разрядом); динамическая модификация с использованием ПАВ; методы, основанные на процессе физической адсорбции (осаждение пленок полиэлектролита); методы, основанные на образовании ковалентной связи (самоорганизующиеся монослои или ковалентные полимерные покрытия); графтинг (создание полимерных слоев под действием УФ-излучения); силанизация; химическое осаждение из газовой фазы; иммобилизация белков и др. [99].

При химической обработке обычно используют известные химические реакции по функциональным группам или активным центрам в макромолекулах на поверхности полимера. Достоинством химических методов является то, что они не требуют применения дорогостоящего оборудования для обработки поверхности полимеров. Но эти методы основаны на проведении реакций в агрессивных средах, поэтому во многих случаях предпочтение отдается более универсальным физическим или физико-химическим методам.

Плазменная обработка ПДМС является распространенным способом повышения смачивания и активации поверхности. Несмотря на многочисленные исследования, окончательного представления о влиянии данной обработки и механизмах последующего гидрофобного восстановления на данный момент времени нет. В работе [100] изучение влияния модификации ПДМС в среде аргона, гелия, кислорода и азота на свойства поверхности проводилось с использованием рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии и сканирующей электронной микроскопии. Было подтверждено, что поверхность восстанавливает свою гидрофобность, чему способствует диффузия непрореагировавших полимерных цепей.

Методы плазменной обработки поверхности полимерных материалов могут применяться для достижения, как минимум, пяти различных результатов: образования функциональных групп, изменения шероховатости (травление), сшивки или прививки цепей других полимеров (поверхностная прививка), а также создания тонкослойных покрытий [101].

Применение низкотемпературной плазмы описано в работах [102-104]. При плазмохимической модификации полимерных материалов изменениям подвергается только поверхностный слой (толщиной менее микрометра). Плазменная обработка полимера

приводит к изменению свойств смачивания, адгезии, способности к склеиванию, происходит очистка поверхности материала (травление) и его модификация (образование различных функциональных групп). Свойства и состав этих групп зависят от материала, среды обработки (кислород, водород, аргон или смесь газов), а также от характеристик плазмы. Таким способом можно сформировать на поверхности полимера разнообразные полярные группы, такие как карбонильные, перекисные, азотосодержащие или кислородсодержащие группы.

В большинстве случаев плазменная обработка ПДМС применяется для улучшения адгезии поверхности при его соединении со стеклом или с полимером. В работе [105] исследовалось влияние воздействия кислородной плазмы с разными параметрами (мощность, время обработки, скорость потока газа) на адгезионные свойства ПДМС и стекла, а также прочность их соединения. Отмечено, что увеличение времени активации и мощности радиочастоты повышает прочность соединения.

Существуют примеры другого применения плазменной обработки, например, в устройствах, где микроканалы формируются посредством травления ПДМС в плазме SF₆ [106].

Общепринятой характеристикой, позволяющей оценивать результаты обработки поверхности, является величина краевого угла (угла смачивания), который может быть измерен гониометрическим методом. Обработка плазмой в кислородной среде позволяет значительно менять величину угла смачивания для многих полимерных материалов [107].

Одной из важных характеристик, с точки зрения технологической обработки и практического использования, является длительность сохранения свойств обработанной плазмой поверхности. В зависимости от материала полимера, параметров и условий его обработки это время может варьироваться от нескольких часов до нескольких месяцев.

Контроль результатов плазменного воздействия и оценку качества обработки можно проводить используя методы масс-спектрометрии (регистрируя образование продуктов реакций, например, CO₂, CO, H₂, H₂O), инфракрасной спектроскопии (регистрируя образование функциональных групп), электронной спектроскопии для химического анализа (определяя элементный состав и химическую структуру полимера [108]), электронной микроскопии (фиксируя изменения надмолекулярной структуры полимера) и другие.

При плазменной модификации поверхности полимеров используют разнообразные газовые среды: воздушную [109], кислородную [110], аргоновую [111], в присутствии водяных паров [112]. Наиболее часто применяют обработку кислородной плазмой, что

приводит к расщеплению полимерных цепей на поверхности, их поперечной сшивке, образованию кислородсодержащих функциональных групп ($-\text{CO}_x$, $-\text{OON}$, $-\text{C}=\text{O}$).

В работе [113] проведен анализ влияния химического состава рабочей среды, используемой для поверхностной модификации ПДМС, на изменение геометрии поверхности и химического состава. Методами атомно-силовой микроскопии (АСМ) удалось определить соотношения между характеристиками поверхности и параметрами процесса обработки, что позволило выбрать условия, облегчающие получение изотропных или анизотропных ориентаций поверхностных структур. «Морщины», образующиеся на модифицированной поверхности, могут проявлять одно- или многонаправленный характер в зависимости от состава среды, в которой осуществляется обработка. Наименьшее структурирование поверхности характерно в случае применения кислородной плазмы.

Требования, предъявляемые к свойствам смачивания рабочих поверхностей МФЧ для «капельной» микрофлюидики, зависят от типа формируемой эмульсии. Для формирования двойной эмульсии требуются два последовательно расположенных генератора, поверхность которых имеет различные свойства смачивания. Для формирования эмульсии В/М необходимо придать поверхности гидрофобные свойства (хотя ПДМС в своем исходном состоянии уже обладает гидрофобными свойствами, но после плазменной обработки, используемой для герметизации, поверхность становится гидрофильной). Наиболее часто применяемыми методами обработки для получения гидрофобных свойств является модификация при помощи коммерчески доступных водоотталкивающих агентов, а также силанизация. Более сложной является модификация устройств для производства двойных эмульсии. При этом сочетаются различные методы с последовательной обработкой. Наиболее популярными являются методы, основанные на осаждении слоев полиэлектролита, а также с использованием метода УФ-структурирования (полимеризация под действием УФ-излучения), которые позволяют получить гидрофильную пленку на поверхности канала.

Во многих работах применяется методика иммобилизации слоев поливинилового спирта (ПВС), заключающаяся в заполнении канала МФЧ раствором ПВС с последующей термической обработкой.

В [114] сообщается о применении монодисперсной двойной эмульсии, производимой на одном МФЧ с частично гидрофильными и гидрофобными каналами для проточно-цитометрического анализа. МФЧ для формирования двойной эмульсии (два последовательных генератора с фокусировкой потока) были изготовлены из ПДМС Sylgard[®] 184 (Dow Corning, США). Для того чтобы получить частично гидрофильные и гидрофобные участки в устройстве, использовалась двухэтапная обработка, описанная в

[115]. На первом этапе для получения гидрофильного покрытия канала производилось последовательное осаждение слоев полиэлектролита на поверхность микроканала после герметизации устройства. На втором этапе для получения гидрофобных свойств применялась локализованная обработка модифицируемой поверхности с помощью Aquapel. При этом гидрофильное покрытие в смежных каналах было защищено встречным потоком фторуглеродного масла. Интеграция двух генераторов капель на одном чипе позволяет синхронизировать два процесса формирования капель в отличие от использования для этих целей двух отдельных чипов.

Авторы работы [116] использовали комбинацию ковалентной пришивки силана и фотополимеризации акриловых кислот под действием УФ-излучения, чтобы выборочно изменять свойства поверхности на определенных участках готового устройства. Данный подход использовался для МФЧ, предназначенного для получения двойной монодисперсной эмульсии (В/М/В и М/В/М) и многократной эмульсии, содержащей различные количества капель внутри.

1.7. Контроль характеристик материалов микрофлюидных устройств

При создании МФЧ важно контролировать свойства рабочих поверхностей (например, с целью выявления необходимых функциональных групп). Если используются оптические методы детектирования, то крайне существенно, чтобы материалы обладали достаточной прозрачностью в требуемом спектральном диапазоне, а при применении флуоресцентных методов анализа – чтобы у материалов отсутствовала фоновая флуоресценция или ее уровень был бы невысок.

Другой важный аспект – контроль качества полимеризации материала. Особенно в том случае, когда полимеры используются в качестве основного материала устройства или для соединения (склейки) элементов чипа. Неполная полимеризация может приводить к потере герметичности устройства, ингибированию аналитических реакций и др.

Для отмеченных выше задач рационально применять: а) методы спектрофотометрии в ультрафиолетовой, видимой и ближней инфракрасной (БИК) областях спектра; б) методы флуоресцентной спектроскопии; в) метод лежащей капли – для оценки свойств смачивания поверхности материалов.

1.7.1. Спектроскопия полимерных материалов в ближней ИК области при оценке функциональных групп, содержащих C-H и O-H

Инфракрасная спектроскопия (ИК-спектроскопия) широко применяется при определении различных свойств материалов, идентификации веществ в химии и физике, других областях науки и техники. В лабораторной практике широко используется ближняя ИК-область спектра ($0,75\text{-}2,5$ мкм или $13000\text{-}4000$ cm^{-1}). Поглощение веществ в этом диапазоне связано, как правило, с обертонами колебаний групп C-H , N-H , O-H , C-C , C=C , C-O , C=O и комбинационными частотами. Использование ближней ИК-области для решения технологических, научных и практических задач имеет ряд преимуществ. БИК-спектроскопия применяется для количественного анализа функциональных групп полимеров (CH , CH_3 , NH , OH , CO и т.д.), исследования водородных связей, изучения взаимодействия растворителя с полимером [117].

В полимерных материалах часто возникает задача, связанная с необходимостью контроля наличия молекул воды. Вода представляет собой соединение, обладающее интенсивным поглощением в ИК-области. Свободная молекула H_2O имеет три основных нормальных колебания, которым в парах соответствуют частоты: 1595 cm^{-1} (деформационное колебание δ), 3654 cm^{-1} (симметричное валентное колебание ν_s) и 3756 cm^{-1} (асимметричное валентное колебание ν_{as}) [118]. Молекулы воды, адсорбированные на поверхности, имеют поглощение в полосе спектра, соответствующей $\nu_{\text{OH}} = 3580\text{-}3300$ cm^{-1} . На спектральной зависимости воды (жидкое состояние) наблюдается множество полос поглощения, соответствующих основным колебаниям, их обертонам и комбинациям составных частот. Значения максимумов полос поглощения воды в жидкой фазе соответствуют частотам валентных колебаний молекул в области $2700\text{-}3650$ cm^{-1} , а деформационных – в области $1070\text{-}1670$ cm^{-1} [119]. Максимумы частот колебаний молекул воды зависят от того, в каких соединениях они находятся.

Хотя спектральные исследования воды проводятся достаточно давно, сведения об основных частотах колебаний молекулы, приводимые разными авторами, противоречивы. Обычно исследователей интересует наличие гидроксильных групп на поверхности изучаемого объекта, которые способны сильно поглощать излучение в ИК-области спектра [120]. Узкие спектральные полосы свидетельствуют о наличии гидроксильных групп, не участвующих в образовании водородных связей, а широкие – о связанных группах.

Валентные колебания связи C-H в полимерах также дают обертоны и комбинированные частоты, которые могут быть использованы для аналитических целей.

В БИК-спектре обычно наблюдаются полосы обертонов фундаментальных групп, содержащих СН, ОН и NH, поэтому органические молекулы могут быть исследованы и в этой области. Следует отметить, что чем выше обертонов групп СН на участке полос ИК-спектра, тем меньшую интенсивность он имеет в сравнении с фундаментальной полосой поглощения. Так, если принять фундаментальную полосу поглощения групп СН в диапазоне длин волн 3380-3510 нм за 100 единиц, то интенсивность первого обертона (1690-1755 нм) будет примерно 1 ед., а второго (1127-1170 нм) – всего 0,1, что в некоторых практических случаях не достаточно для надежного детектирования.

ПДМС имеет показатель преломления $n=1,4035$ (при 25 °С на длине волны 589 нм). Известно, что для ПДМС характерно наличие частот поглощения, обусловленных валентными колебаниями групп CH_3 (2964 см^{-1} или 3374 нм), деформационными колебаниями связей $\text{CH}_3\text{-Si}$ на частоте 1261 см^{-1} (7930 нм), слабым уширенным сигналом колебаний ОН групп в области $3400\text{-}3475 \text{ см}^{-1}$ (2940-2875 нм) и т.д. [121, 122]. ПДМС имеет не только полосы сильного поглощения в средней ИК-области, но и определенные полосы обертонов в БИК-области, которые являются обертонами и комбинациями фундаментальных полос, классической области среднего инфракрасного диапазона. Характеристическое поглощение наблюдается для колебаний групп СН в области $3000\text{-}2840 \text{ см}^{-1}$ (3300-3520 нм), метильных групп при изгибе $1375\text{-}1450 \text{ см}^{-1}$ (7270-6900 нм), колебаний метильных групп на 2692 и 2872 см^{-1} , группы $\text{CH}_3\text{-Si}$ при колебаниях в диапазоне $1300\text{-}1280 \text{ см}^{-1}$ (7690-7815 нм) и $875\text{-}750 \text{ см}^{-1}$ (11430-13400 нм). Информационно-полезными являются спектральные области $7800\text{-}3035 \text{ см}^{-1}$ (1280-3295 нм), $2768\text{-}1470 \text{ см}^{-1}$ (3615-6800 нм) и др. Так поглощение в области 1695-1785 нм связано с обертонами, характерными для связи С-Н. В работе [122] показано, что поглощение ПДМС в БИК диапазоне в основном вызвано колебательными обертонами групп CH_3 , а также приведены данные по длинам волн поглощения для диапазона от 620 до 1850 нм.

В работе [123] представлены результаты измерений спектров поглощения и рамановского рассеяния ПДМС, производимого компанией Wacker Chemie AG (Германия). Эта информация является полезной при интерпретации спектральных данных, полученных в процессе физико-химической обработки ПДМС, поэтому частично приведем таблицу из данной статьи (Таблица 1.2). Отметим, что максимальное поглощение наблюдается вблизи следующих длин волн ~ 2292 , ~ 2371 , ~ 2470 , ~ 2659 , ~ 2699 нм.

Таблица 1.2 – Поглощение ПДМС в БИК-области, обусловленное модами колебаний групп CH_3 [123]

Волновое число, см^{-1}	Длина волны, нм	Поглощение (10 мм)	Мода
8440	1185	1,1	$3\nu_s(\text{CH}_3)$
7127	1403	0,75...0,8	$\nu_s(\text{CH}_3)+3d_{as}(\text{CH}_3)$
5917	1690	4,27...5,6	$2\nu_{as}(\text{CH}_3)$
5875	1702	4...5,44	$2\nu_{as}(\text{CH}_3)$
5728	1746	4,32... 4,99	$2\nu_s(\text{CH}_3)$ $\nu_s(\text{CH}_3)+2d_{as}(\text{CH}_3)$
5605	1784	1,4...1,74	$\nu_{as}(\text{CH}_3)+$ $d_s(\text{CH}_3)+d_{as}(\text{CH}_3)$
5450	1835	0,88...1,14	$\nu_{as}(\text{CH}_3)+ 2d_s(\text{CH}_3)$
5404	1851	1,03...1,25	$\nu_s(\text{CH}_3)+ 2d_s(\text{CH}_3)$
4359...4363	2292...2294	11,8...24,3	$\nu_{as}(\text{CH}_3)+ d_a(\text{CH}_3)$
4218...4219	2371...2370	11,3...14,8	$\nu_{as}(\text{CH}_3)+ d_s(\text{CH}_3)$
4049...4053	2470...2467	7,97...13,9	$2d_a(\text{CH}_3)+ d_s(\text{CH}_3)$
3761...3762	2659...2658	19,2...25,9	$\nu_s(\text{CH}_3)+\rho_s(\text{CH}_3)$
3705...3706	2699...2698	26,0...27,6	$\nu_s(\text{CH}_3)+\rho_a(\text{CH}_3)$

ν - валентные колебания, d –деформационные колебания, ρ - маятниковые колебания, индекс s – симметричные, as – асимметричные.

1.7.2. Контроль полимеризации эпоксидных компаундов и смол методами спектроскопии

Двухкомпонентные эпоксидные компаунды, состоящие из основы и отвердителя, претерпевают полимеризацию при смешивании компонентов. Время отверждения можно варьировать, изменяя концентрации компонентов. Способность контролировать реакцию как на макроуровне, так и в микромасштабах имеет большое значение для ряда практических применений. Особенно это касается микрофлюидных устройств и технологий их изготовления.

Отверждение эпоксидных смол в динамике можно описать как двухстадийную реакцию эпоксидных групп с аминами. Такой процесс можно контролировать путем

регистрации изменения концентрации эпоксидных групп и аминов, которая количественно связана с площадью полосы поглощения в линейной области, где выполняется закон Бугера-Ламберта-Бера. Обычно используются данные ИК-области спектра. В БИК-области спектра также можно найти отдельные полосы, не имеющие перекрытия, связанные с эпоксидной смолой и первичным амином: комбинационная полоса второго обертона эпоксидного кольца ($\sim 4530 \text{ см}^{-1}$) и комбинационная полоса NH ($\sim 4900\text{-}5000 \text{ см}^{-1}$) [124].

Изменения концентрации эпоксидных групп и первичных аминов могут быть непосредственно определены из полос поглощений на длинах волн $\sim 4530 \text{ см}^{-1}$ и $\sim 4900 \text{ см}^{-1}$ соответственно [124]. Для эпоксидных смол в БИК диапазоне четко не наблюдался второй обертон CO (обычно расположенный около $5100\text{-}5200 \text{ см}^{-1}$). К основным особенностям, наблюдаемым в спектре можно отнести только обертоны полос растяжения СН и СН₂. Хотя БИК-спектроскопия дает немного полезной информации для смол, ее все же можно использовать для мониторинга процесса отверждения путем регистрации изменения полос, присущих отвердителю.

1.7.3. Определение угла смачивания на открытой поверхности и в канале микрофлюидных чипов

Оценка свойств смачивания поверхности сводится к нахождению краевого угла θ , который согласно теории Юнга-Лапласа определяется равновесием свободной поверхностной энергии твердого тела (γ_{sv}), сил поверхностного натяжения жидкости (γ_{lv}) и взаимодействием между двумя средами (γ_{sl}) [125-127] (Рисунок 1.7):

$$\gamma_{lv} \cos \theta = \gamma_{sv} - \gamma_{sl} \quad (1.1)$$

Метод лежащей капли является экспрессным, информативным и широко распространенным методом при оценке результатов модификации поверхности и основан на измерении краевых углов взаимодействия жидкости с поверхностью образца [128]. Недостатком метода является трудность измерения малых значений краевых углов (менее 15°), поскольку в данном случае касательная проходит практически горизонтально.

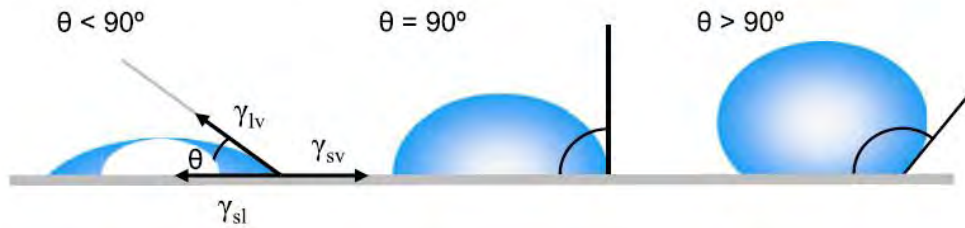


Рисунок 1.7 – Значения углов смачивания на различных поверхностях [127]

Разными авторами приводятся различные градации свойств поверхности в зависимости от значений угла смачивания. Например, в [129] значения углов $\sim 20-45^\circ$ соответствуют гидрофильной поверхности, при углах $\sim 45-75^\circ$ наблюдается нормальное смачивание, поверхность считается гидрофобной для углов $\sim 75-115^\circ$, супергидрофобной – для $\sim 140-160^\circ$. Краевой угол имеет единственное значение для определенной поверхности при постоянных условиях (температура, давление). Однако исследования показывают, что угол смачивания может несколько варьироваться. Для уменьшения влияния сторонних факторов подложка с помещенной на ней каплей поворачивается на небольшой угол, проводятся измерения угла оттекания (θ_{om}) и натекания (θ_n), после чего берется среднее значение.

Определение угла смачивания в каналах МФЧ имеет существенное практическое значение, так как позволяет оценить качество обработки внутренней поверхности, не прибегая к повреждению чипа.

Один из наиболее простых методов определения угла смачивания в канале основан на капиллярном эффекте [127]. Более сложная модель поведения жидкости описана авторами [130], где приводятся уравнения, определяющие краевой угол для двумерного случая (две параллельные пластины) и для трехмерного (в канале).

В экспериментальных исследованиях применялся метод определения краевого угла в канале МФЧ после соответствующей обработки изображения, предложенный в статье [131]. Для определения значений угла использовалась следующая формула:

$$\theta = \frac{180^\circ}{\pi} \arccos\left(\pm \frac{W}{2R}\right), \quad (1.2)$$

где W – ширина канала,

R – радиус мениска жидкости, для поверхности с гидрофильными свойствами $\left(+\frac{W}{2R}\right)$, с гидрофобными $\left(-\frac{W}{2R}\right)$ (Рисунок 1.8).

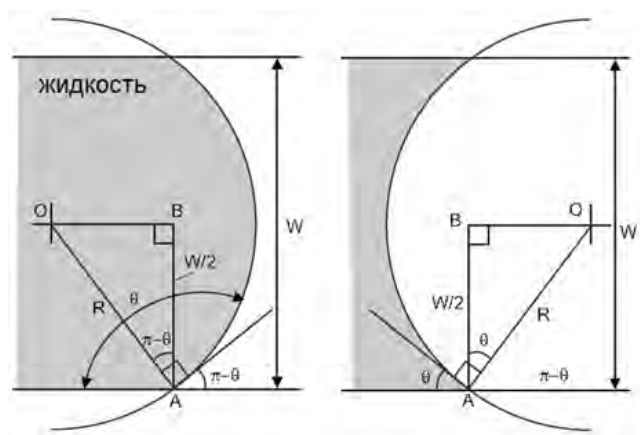


Рисунок 1.8 – Построения, необходимые для вычисления угла смачивания в канале МФЧ для гидрофобной и гидрофильной поверхностей [131]

Метод определения краевого угла в канале МФЧ по изображению мениска позволяет оценивать свойства смачивания после различных видов модификации поверхности и является аналогом метода лежащей капли для оценки свойств открытой поверхности материалов. Однако внутри канала наблюдаются несколько иные значения краевых углов, поскольку свойства определяются сразу несколькими сопряженными поверхностями.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1

Методы изотермической амплификации, обладающие высокой производительностью, специфичностью, экспрессностью и упрощенной пробоподготовкой становятся перспективной альтернативой ПЦР. Разработка и создание МФУ, основанных на методах «капельной» микрофлюидики для изотермической амплификации может являться основой для создания высокопроизводительных аналитических приборов.

Развитие и совершенствование методов прототипирования для оперативного изготовления МФЧ в условиях исследовательской лаборатории позволяет эффективно разрабатывать новые подходы, стратегии исследований и методы анализа нуклеиновых кислот, в частности, методы «цифровой» микрофлюидики применительно к изотермической амплификации или же к цПЦР, что в настоящее время является актуальной и востребованной задачей.

ПАВ, применяемые для капельной микрофлюидики, должны обладать инертностью по отношению к компонентам в капле, не ингибировать реакцию амплификации, не оказывать влияние на снижение квантового выхода флуоресценции. Таким образом, актуальным являются экспериментальные исследования: а) по выбору ПАВ, обеспечивающего формирование капель с заданными размерами и их термостабильность при режимах амплификации нуклеиновых кислот; б) по изучению влияния ПАВ на детектирование результатов амплификации в капле.

Необходимость оперативного получения экспериментальных образцов МФЧ в условиях научно-исследовательских лабораторий требует упрощения и совершенствования всего процесса изготовления устройств с использованием доступных технологий и недорогих материалов (твердых или эластичных). На этапе разработок новых методик и стратегий анализа широкое распространение находят методы быстрого прототипирования, обеспечивающие оперативность изготовления и недорогой цикл от проектирования топологии до изготовления, упаковки и тестирования. Среди этих методов наиболее широкое распространение получил метод «мягкой» литографии в ПДМС. Существуют возможности модификации метода, позволяющие сократить сроки и снизить стоимость расходов, связанных с разработкой новых методик анализа при проведении исследований.

ПДМС – основной материала для прототипирования в микрофлюидике – обладает рядом недостатков, в частности, высокой паро- газопроницаемостью, эластичностью, нестабильностью свойств смачивания, что исключает возможность его применения в некоторых вариантах микрофлюидных приложений. Востребованной задачей является поиск

и исследования вариантов альтернативных ПДМС материалов, в том числе и отечественных, лишенных отмеченных недостатков. В этом аспекте следует отметить перспективность применения эпоксидных компаундов, так как из имеющегося ассортимента компаундов можно выбрать материал с необходимыми свойствами и характеристиками. При этом тесно связанной задачей является модификация метода «мягкой» литографии для выбранного материала.

При создании МФЧ важно контролировать свойства материала чипа на стадиях его изготовления и использовать материалы, наиболее подходящие для выбранной методики исследования биологической пробы. Для контроля свойств смачивания поверхности рационально использовать метод лежащей капли, как наиболее простой, оперативный и позволяющий оценивать свойств поверхности на локальных участках. В методах, ориентированных на оптическое детектирование существенным является прозрачность материала в выбранном спектральном диапазоне и низкий уровень флуоресценции. Другой аспект – контроль качества полимеризации материала, если он используются как основной материала устройства или для соединения (склейки) элементов чипа. Неполная полимеризация может приводить к потере герметичности устройства, к эффектам ингибирования аналитических реакций и др. Поэтому при создании конструкций МФЧ необходимым являются спектральные исследования свойств выбранных материалов.

На основе вышеприведенного литературного обзора сформированы следующие задачи диссертационной работы:

- определение основных требований к материалам, способам изготовления и модификации рабочих поверхностей МФЧ, доступных в условиях исследовательских лабораторий;
- сравнительный анализ и исследования полимерных материалов (в том числе и отечественных), подходящих для выбранного способа изготовления и удовлетворяющих требованиям методов молекулярной диагностики;
- разработка / адаптация способов оперативного изготовления функциональных микроструктур в полимерных материалах;
- разработка и исследование способов модификации рабочих поверхностей, методов герметизации и контроля герметичности МФЧ;
- создание макетных образцов МФЧ и экспериментальные исследования на тестовых (модельных) системах.

2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ МИКРОФЛЮИДНЫХ ЧИПОВ

В рамках работы изучалась возможность применения новых полимерных материалов и компаундов для создания мастер-форм и прототипов микрофлюидных устройств методами «мягкой» литографии.

2.1. Исследование физико-механических свойств полимерных материалов (модуля упругости и смачивания поверхности)

Поскольку изначально ПДМС Sylgard® 184 применялся в качестве заливочного материала элементов солнечных батарей, датчиков, элементов управления в электронике и электротехнике, то, в соответствии с этой областью применения, были выбраны следующие материалы: Пентэласт®-712, каучук СКТН, КРЕОЛ, Lasil T-4. Эти материалы используются для изоляции делителей напряжения, катушек индуктивности, соединителей, плат, составных частей электрооборудования, ферритовых сердечников, элементов солнечных батарей, трансформаторов и светодиодов, а также для изготовления форм в ювелирном и сувенирном производстве, при прототипировании и моделировании и др. Некоторые характеристики, особенности и комментарии к выбранным эластомерам приведены в Таблице 2.1.

Таблица 2.1 – Характеристики и особенности полимерных материалов, выбранных в качестве альтернативы ПДМС Sylgard® 184

Марка материала, фирма-производитель	Характеристики	Способ полимеризации
Компаунд Пентэласт®-712 (П-712) марки А (ООО «Силиконовые Материалы», Россия) http://www.pentasever.ru/	Двухкомпонентный прозрачный бесцветный полимер, ТУ 2513-011-40245042-99	Получают смешиванием пасты и катализатора в соотношениях: паста – 100 м.ч., катализатор № 68 – 5 м.ч., режим вулканизации 72 часа при +20 °С
<p>Комментарии <i>Линейный эластомер, обладает хрупкостью. Краевой угол для соотношения осн:отв=20:1 равен 102°±1°, через 2 мин значение составляет 98°±1°. Обладает высокой адгезией к кремнию, хорошо отделяется от стеклянных подложек с напыленными слоями золота или хрома</i></p>		

Продолжение Таблицы 2.1

Марка материала, фирма-производитель	Характеристики	Способ полимеризации
Синтетический термостойкий низкомолекулярный каучук СКТН марки А (ООО «Силиконовые Материалы», Россия)	Низкомолекулярная диметилсилоксановая жидкость, стабилизированная активной окисью кремния и отверждаемая катализаторами холодного отверждения, ГОСТ 13835-73. Обладает эластичностью, упругостью и прочностью, высокой гидрофобностью, химической и биологической инертностью, газопроницаемостью	Отверждается при комнатной температуре в присутствии катализаторов типа К-1, К-100 или №18 в течение 72 часов
Комментарии <i>Обладает схожими с Пентэласт®-712 свойствами</i>		
КРЕОЛ (ООО «СУРЭЛ», Россия) http://surel.ru/	Силоксановая оптически прозрачная композиция. Представляет собой двух- или трехкомпонентную смесь (в зависимости от цели применения)	Композиция образуется при смешивании компонентов в массовом соотношении от 10:1 до 10:1,4. Отверждается при комнатной температуре, время полного отверждения 24 часа
Комментарии <i>Прозрачный, эластичный полимер. Обладает высокой адгезией к кремнию. При использовании мастер-форм из кремния и фоторезиста SU-8 необходимо ввести стадию силанизации для получения разделительного слоя</i>		
Lasil T-4 (Dow Corning, США, Германия)	Жидкая двухкомпонентная силиконовая прозрачная резина холодного отверждения с платиновым катализатором	Пропорция смешивания основы к катализатору 10:1. Ускорение отверждения с помощью тепла вызывает видимую усадку формы из-за отличий в объемном сжатии при охлаждении между силиконовой резиной и оригиналом. Чем выше температура отверждения, тем больше вероятные отличия в размерах
Комментарии <i>Основа представляет собой вязкую жидкость прозрачного белого цвета. Для снижения вязкости рекомендуется добавить разбавитель DC 200. Ускорение отверждения возможно при 65 °С в течение 4 часов. После отверждения материал приобретает эластичные упругие свойства. Применение: изготовление сложных форм, пищевая промышленность. Подходит для литья воска, полиуретанов, смол, гипса. Герметизируется со стеклянной пластиной после плазменной обработки в среде кислорода</i>		

2.1.1. Оценка модуля упругости эластичных материалов

В зависимости от соотношения основа : отвердитель и условий отверждения смеси полимеры могут обладать разными физическими свойствами. При создании конструкций из эластичных материалов важным является оценка модуля упругости полимера, так для клапанов и мембран необходимо использовать высокоэластичные материалы, а для реакционных камер и каналов предпочтительным является применение твердых материалов. Кроме того, при создании мастер-форм из эластомеров следует использовать более «жесткие» материалы, поскольку эластичные могут претерпевать деформацию после нескольких циклов использования за счет впитывания агрессивных компонентов материала реплики, а также приводить к вариации геометрических размеров микроструктур в формируемых репликах. Разные соотношения основа : отвердитель, химические добавки и условия отверждения позволяют получать конструкции с разной твердостью. Поэтому задачей исследования являлась оценка упругих свойств эластичных материалов в зависимости от условий отверждения и соотношения компонентов.

Оценка упругих свойств может осуществляться на основе результатов измерения модуля Юнга. Существуют разные методы измерения модуля упругости: микроскопический и макроскопический. Микроскопические тесты, как правило, основаны на методах атомно-силовой микроскопии (АСМ) (измерение силовых кривых или метод Peak Force QNM). Макроскопические тесты эластичных материалов могут быть проведены на растяжение или сжатие, что подробно изложено в [132].

В данной работе осуществлялось измерение механических свойств эластичных материалов методом АСМ (Peak Force QNM) и методом, предложенным в работе [133].

Оценка модуля упругости на основании микроскопических измерений поверхности

Оценка модуля упругости ПДМС Sylgard[®] 184 осуществлялась на основе данных атомно-силовой микроскопии в режиме Peak Force QNM. Измерения проводились на АСМ Bruker Bioscope Catalyst зондом SNL-10A с жесткостью 0,437 Н/м. Результаты сканирования поверхности образцов ПДМС, полученных при разных соотношениях основа : отвердитель (20:1, 10:1, 5:1, 3:1) и отвержденных при температуре 65 °С в течение 4 часов, приведены на Рисунке 2.1. Изображения свидетельствуют о наличие пористой структуры на поверхности образца.

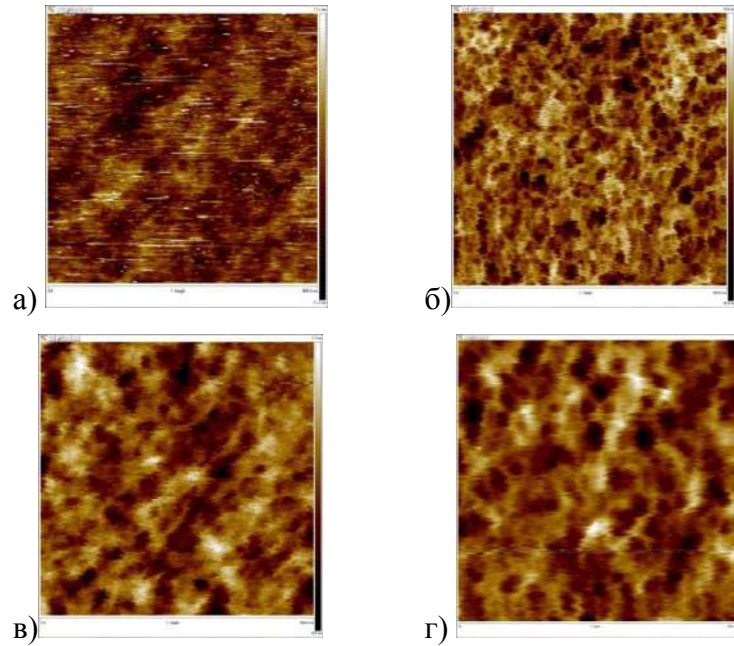


Рисунок 2.1 – АСМ изображения поверхности образцов ПДМС Sylgard[®] 184, отвержденных при температуре 65 °С в течение 4 часов, с соотношением основа : отвердитель: а) 20:1; б) 10:1; в) 5:1; г) 3:1. Размер изображения 500 нм x 500 нм. (Режим PeakForce QNM, АСМ Bruker Bioscope Catalyst).

Модуль Юнга (E^*) определялся по модели DMT (Derjaguin-Muller-Toropov) [134] в соответствии с формулой:

$$F_{tip} = \frac{4}{3} E^* \sqrt{Rd^3} + F_{adh}, \quad (2.1)$$

где: F_{tip} – сила на зонде,

R – радиус зонда,

d – расстояние зонд-образец,

F_{adh} – сила адгезии.

Для аппроксимации силовой кривой подвода использовалась модель Снеддона (Sneddon).

Полученные данные свидетельствуют, что величина модуля упругости зависит от соотношения основа : отвердитель и при стандартном протоколе отверждения (65 °С в течение 4 часов) может варьироваться от 2 до 11 МПа (Рисунок 2.2). Более жесткие конструкции микрофлюидных устройств могут быть сформированы при соотношениях основа : отвердитель 5:1. Отметим также, что шероховатость поверхности RMS (среднеквадратичное значение ординат $z(x)$ на базовой длине l) меняется от 2,3 нм до 4,9 нм при существенном изменении модуля упругости.

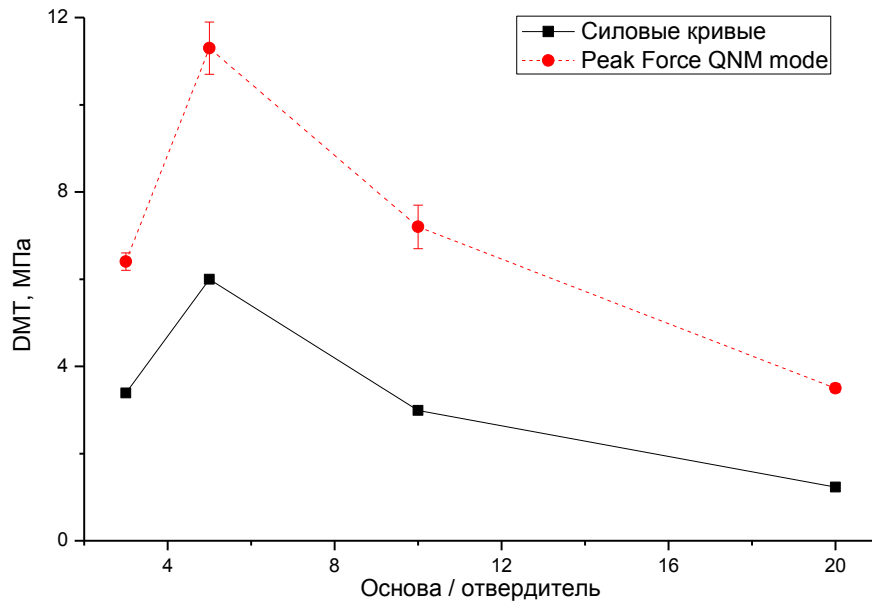


Рисунок 2.2 – Изменение модуля упругости ПДМС Sylgard® 184 в зависимости от соотношения основа:отвердитель (расчет по силовым кривым и в режиме Peak Force QNM)

Следует отметить, что результаты оценки модуля упругости по данным силовых кривых дают более низкие значения, чем в режиме Peak Force QNM (в 2,5-3 раза), что отражено в Таблице 2.2. Модуль упругости при соотношении основа : отвердитель 3:1 оказался ниже, чем для соотношения 5:1.

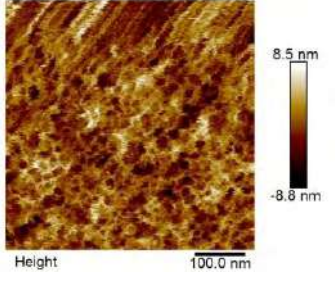
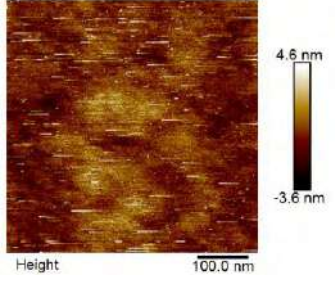
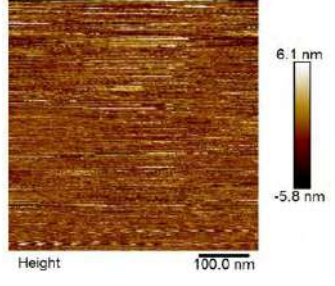
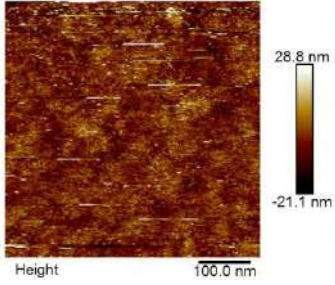
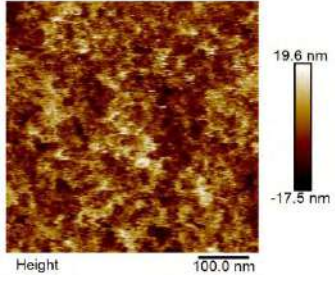
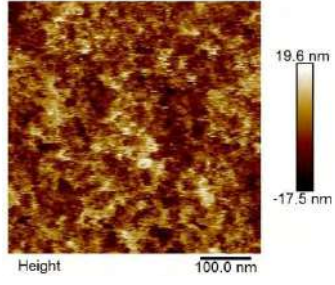
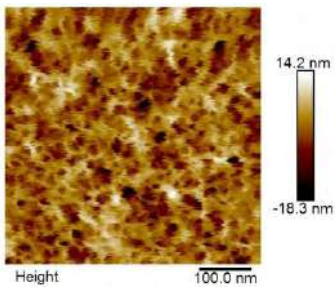
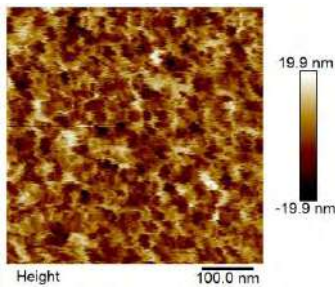
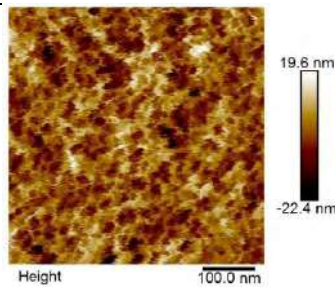
Таблица 2.2 – Характеристики поверхности ПДМС Sylgard® 184, полученные на основе данных АСМ

Соотношение основа : отвердитель	Силловые кривые		Peak Force QNM, PFA=150 нН, Set Point=500 нН			
	DMT, МПа	E, МПа	RMS, нм	DMT, МПа	Адгезия, нН	Деформация, нм
20:1	1,2	1,1	3,7	3,5±0,1	15,2±0,6	10±3
10:1	3,0	2,7	4,9	7,2±0,5	4,0±0,3	14±2
5:1	6,0	5,5	2,3	11,3±0,6	5,7±0,2	1,5±0,3
3:1	3,4	3,1	2,3	6,4±0,2	7,3±0,2	2,3±0,8

При изучении топологии поверхности ПДМС Sylgard® 184 при разных соотношениях основа : отвердитель и разных режимах отверждения были получены изображения, приведенные в Таблице 2.3, из которых следует, что изменение рельефа является незначительным, на всех изображениях явно проявляется пористая поверхность материала.

Повышение температуры отверждения ПДМС (соотношение 10:1) приводит к существенному изменению свойств смачивания поверхности, при этом достаточно трудно получить качественные изображения для всех образцов и соответствующие достоверные оценки неоднородности поверхности.

Таблица 2.3 – АСМ изображения поверхности ПДМС Sylgard® 184 при разных соотношениях основа : отвердитель и режимах отверждения (размер каждого изображения 500 нм x 500 нм)

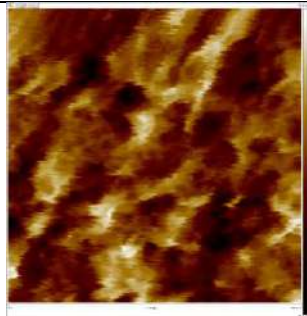
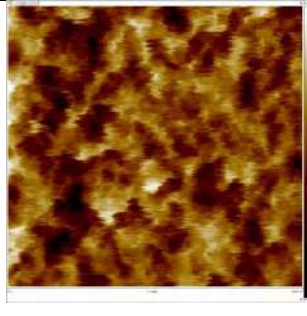
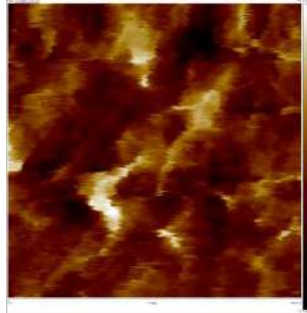
Соотношение основа : отвердитель	65 °C (4 часа)	80 °C (2 часа)	100 °C (35 мин)
10:1			
20:1			
5:1			

Оценка модуля упругости для Lasil T-4 также осуществлялась на основе данных, АСМ (Peak Force QNM mode) на микроскопе Bruker Bioscope Catalyst. Полученные характеристики и изображения поверхности представлены в Таблицах 2.4 и 2.5.

Таблица 2.4 – Характеристики поверхности образца Lasil T-4, полученные на основе данных АСМ

Соотношение основа : отвердитель	Силовые кривые		Peak Force QNM, PFA=150 нН, SetPoint=автоматический			
	DMT, МПа	E, МПа	RMS, нм	DMT, МПа	Адгезия, нН	Деформация, нм
10:1	8,7	7,9	19,8	15,2±4,2	3,6±0,8	11±7
10:1+10% разбавит.	9,3	8,4	12,6	11,1±2,7	2,7±0,7	5±3
10:1+30% разбавит.	3,1	3,4	23,3	5,3±1,0	7,4±0,7	65±21

Таблица 2.5 – АСМ изображения поверхностей образцов Lasil T-4 в зависимости от соотношения основа : отвердитель (размер каждого изображения 500 нм x 500 нм)

Соотношение основа : отвердитель	Рельеф поверхности
10:1	
10:1 + 10% разбавит.	
10:1 + 30% разбавит.	

Поверхность образцов Lasil T-4 имеет большую шероховатость, чем у образцов Sylgard[®] 184 и больший модуль упругости. Исключением является образец (10:1 + 30% разбавителя), модуль упругости которого соответствует интервалу значений этого параметра для ПДМС с соотношениями 10:1 и 20:1. Заметим, что введение силиконового масла-разбавителя (DC 200, Dow Corning Europe S.A.) в количестве 30% (по массе основы) в Lasil T-4 приводит к существенному уменьшению модуля упругости. Рельеф поверхности образцов Lasil T-4 свидетельствует о пористости этого материала.

Аналогичные измерения проводились для образцов П-712 и СКТН. Данные представлены в Таблицах 2.6 и 2.7. Сканирование осуществлялось зондом SNL-10D в режиме Peak Force QNM на АСМ Bruker Bioscope Catalyst. Условия эксперимента до проведения измерений: чувствительность – 34 нм/В, жесткость зонда – 0,126 Н/м, после проведения измерений – чувствительность – 40 нм/В, жесткость зонда – 0,092 Н/м. По каталогу типичная жесткость зонда составляет 0,06 Н/м, радиус кривизны зонда – 5 нм. Оценка модулей упругости этих образцов существенно ниже, чем у образцов ПДМС Sylgard[®] 184 и Lasil T-4, а режим отверждения образцов незначительно влияет на значение модуля.

Таблица 2.6 – Характеристики поверхности образца П-712 на основе данных АСМ

Основа : отвердитель (Режим отверждения)	Peak Force QNM, PFA=150 нН, SetPoint=500 пН			
	RMS, нм	DMT, МПа	Адгезия, нН	Деформация, нм
20:1	3,9	1,74±0,07	4,1±0,3	41±4
20:1 (72 часа)	3,2	1,79±0,09	4,1±0,3	84±3
15:1	6,0	0,95±0,05	4,0±0,2	34±6
20:1 (55 °С, 6 часов)	4,6	1,41±0,04	3,6±0,4	75±11
15:1 (55 °С, 6 часов)	3,7	1,13±0,06	4,3±0,4	12±4

Таблица 2.7 – Характеристики поверхности образца СКТН на основе данных АСМ

Основа : отвердитель (Режим отверждения)	Peak Force QNM, PFA=150 нН, SetPoint=500 пН			
	RMS, нм	DMT, МПа	Адгезия, нН	Деформация, нм
50:1 (72 ч, комн. t°)	7,1	2,20±0,20	5,0±0,4	48±6
15:1 (72 ч, комн. t°)	4,0	2,10±0,06	6,2±0,4	30±2
20:1 (72 ч, комн. t°)	5,7	1,74±0,09	3,9±0,4	37±5
20:1 (55 °С, 6 часов)	3,9	1,70±0,10	3,6±0,3	18±4
50:1 (55 °С, 6 часов)	12,7	1,78±0,08	4,2±0,6	149±4

Оценка модуля упругости на основании макроскопических измерений

Для макроскопического метода было собрано устройство на основе индикатора часового типа ИЧ 0-10 (ГОСТ 577-68) с разрешением 0,01 мм. Схема устройства и принцип действия поясняется Рисунком 2.3. Индикатор (1) снабжен платформой для размещения нагрузки (4), на которую устанавливаются поверочные гири (гири для поверки весов от 50 до 200 г). Образец эластичного материала (2), вырезанный в виде цилиндра диаметром 5 мм и высотой $L \approx 4$ мм устанавливается на основание (3) непосредственно под измерительный стержень индикатора. При нагрузке образца $P=mg$ происходит его деформация ΔL , которая регистрируется индикатором.

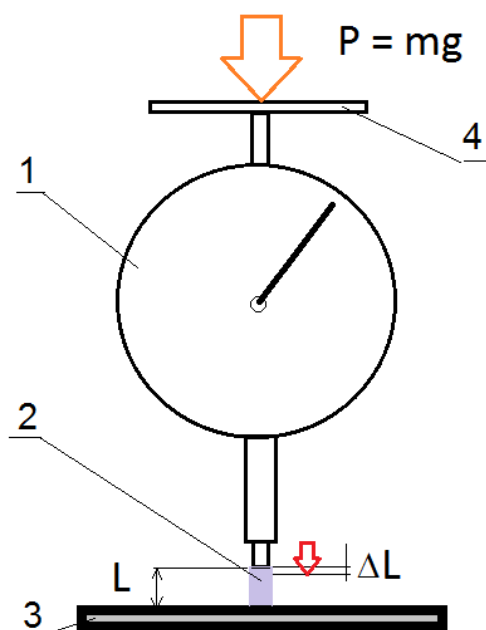


Рисунок 2.3 – Устройство для измерения деформации упругих материалов при их нагрузке:
 1 – индикатора часового типа, 2 – эластичный образец, 3 – опорная платформа (основание),
 4 – платформа для размещения нагрузки

При нагрузке платформы $P = mg$, где m – масса гири, g – ускорение свободного падения, происходит сжатие образца на величину ΔL .

Модуль Юнга E рассчитывался по формуле:

$$E = \left(\frac{P}{S}\right) \left(\frac{L}{\Delta L}\right), \quad (2.2)$$

где P – сила, действующая на образец,

S – площадь поверхности действия силы P ,

L – длина (высота) деформируемого стержня (цилиндра),

ΔL – величина деформации.

В экспериментах проводились измерения относительной деформации эластомерных материалов: Пентэласт®-712, ПДМС Sylgard® 184, Lasil T-4. Полученные данные приведены в Таблицах А.1 – А.3 Приложения А, а построенные на их основе зависимости представлены на Рисунках 2.4 – 2.6.

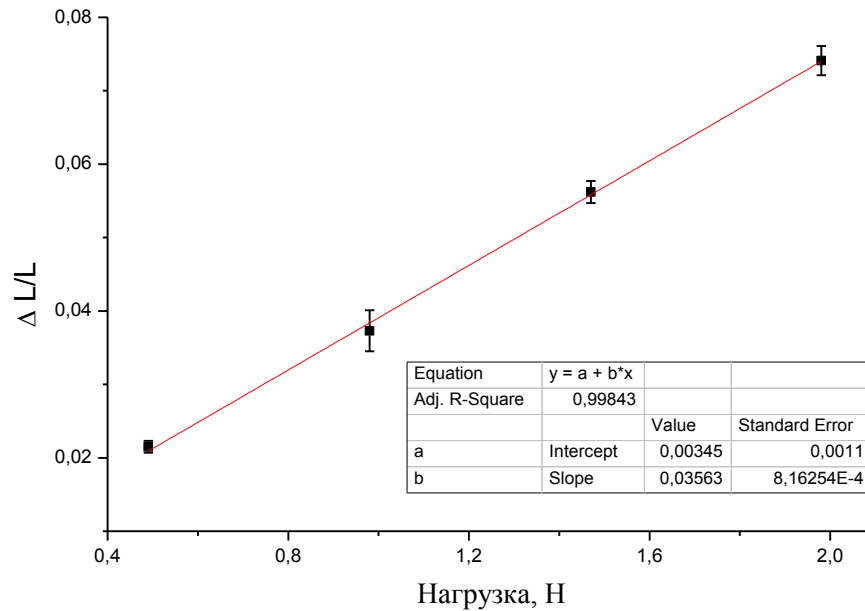


Рисунок 2.4 – Зависимость относительной деформации образцов из Пентэласт®-712 от приложенной нагрузки (отверждение при 25 °С в течение 72 часов)

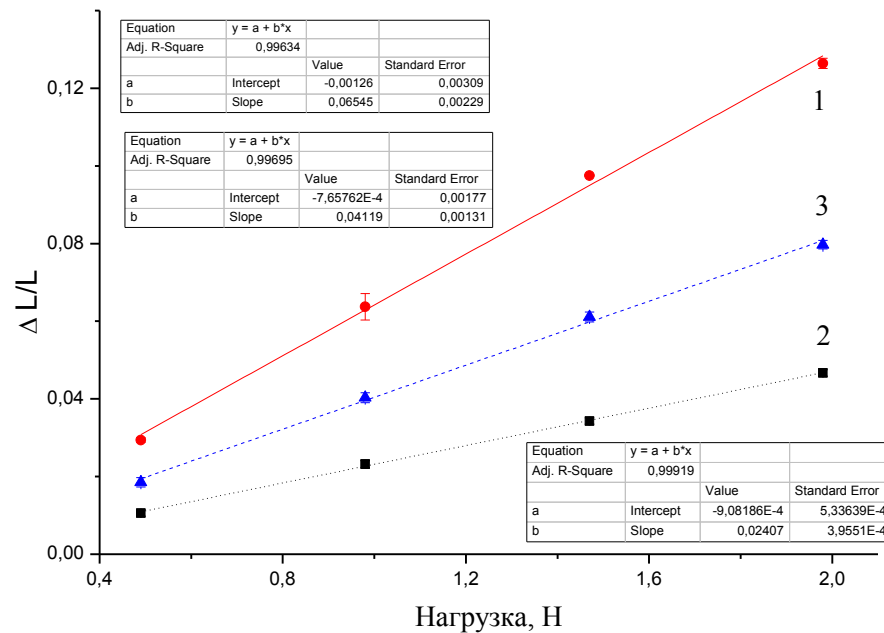


Рисунок 2.5 – Зависимость относительной деформации образцов из ПДМС Sylgard® 184 от приложенной нагрузки (отверждение при 65 °С в течение 4 часов) для различных соотношений (основа : отвердитель): 1 – (20:1), 2 – (10:1), 3 – (5:1)

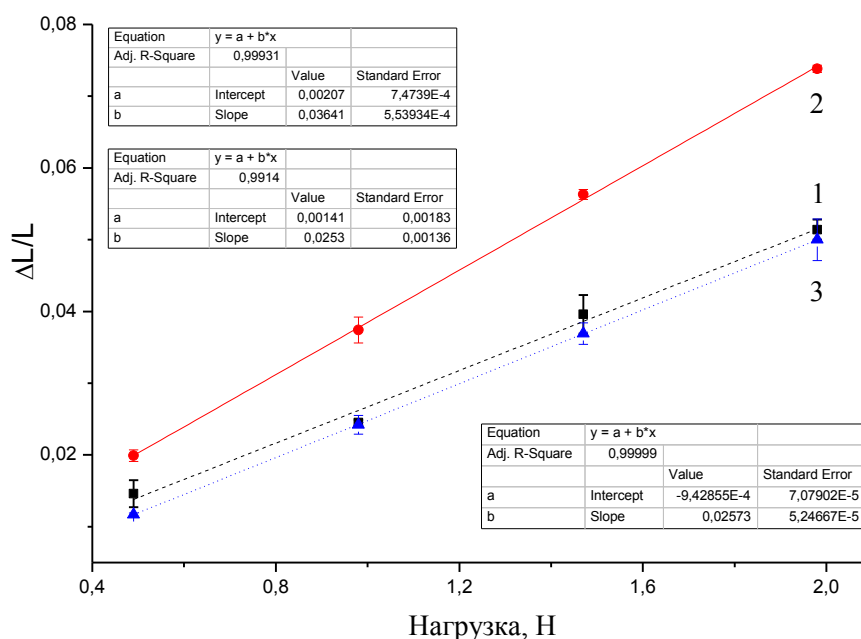


Рисунок 2.6 – Зависимость относительной деформации образцов из материала Lasil T-4 от приложенной нагрузки: 1 и 2 – отверждение при 65 °С в течение 4 часов; 3 – отверждение при 25 °С в течение 24 часов. Соотношение основа : отвердитель – 10:1 (зависимости 1 и 3) и 10:1 + 10% разбавителя (зависимость 2)

Для всех исследуемых полимеров получены линейные зависимости относительной деформации от приложенной нагрузки, из чего следует, что закон Гука соблюдается во всех случаях при выбранных условиях измерений и, следовательно, экспериментальные данные могут быть использованы для оценки модуля упругости.

Отметим, что в случае образцов Lasil T-4 введение разбавителя существенно влияет на относительную деформацию образца в зависимости от нагрузки (Рисунок 2.6) и на модуль упругости (Таблица 2.8). Схожая тенденция наблюдалась и при микроскопических измерениях. В то же время режим отверждения не оказывает существенного влияния на эту зависимость и на модуль Юнга.

В соответствии с формулой (2.2) были получены оценки модуля Юнга по результатам тестирования эластомеров на сжатие, которые приведены в Таблице 2.8. Оценки модуля упругости эластичных материалов микроскопическим тестом отличаются от оценок, полученных при использовании макроскопического теста. Так для ПДМС Sylgard[®] 184 (10:1) оценка на основе силовых кривых составляет 2,72 МПа, методом Peak Force QNM – 7,2 МПа, а при использовании макроскопического теста на сжатие – 2,09 МПа. Оценка модуля упругости образца Lasil T-4 (10:1) на основе силовых кривых составляет 7,94 МПа, Peak Force QNM – 15,2 МПа, на основе макроскопического теста – 1,91 МПа.

Таблица 2.8 – Оценки модуля Юнга для исследуемых образцов эластичных материалов

Материал	Соотношение основа : отвердитель Режим отверждения	Модуль Юнга, МПа
ПДМС Sylgard® 184	10:1 65 °С 4 ч	2,09±0,07
	20:1 65 °С 4 ч	0,74±0,01
	3:1 65 °С 4 ч	1,22±0,04
Lasil T-4	10:1 65 °С 4 ч	1,91±0,10
	10:1+10% разбавителя 65 °С 4 ч	1,39±0,03
	10:1 25 °С 24 ч	1,97±0,09
Пентэласт®-712	20:1 25 °С 72 ч	1,43±0,05

Для образца Пентэласт®-712 (20:1, отверждение при 25 °С 72 ч) модуль упругости по данным Peak Force QNM составляет 1,79 МПа, на основе макроскопического теста – 1,43 МПа. Во всех случаях значения оценок микроскопического теста выше, чем макроскопического. Можно полагать, что это связано с особенностями наноизмерений. Существенную роль играет правильно выбранная жесткость зонда, параметры режима измерений и другие факторы. В случае конструирования функциональных наноразмерных элементов из эластомерных материалов, несомненно, следует использовать оценку модуля упругости, полученную с помощью микроскопического теста. При создании функциональных элементов милли- или микрометровых размеров более адекватной является оценка, полученная при использовании макроскопических тестов. Таким образом, в дальнейшем следует ориентироваться на оценки, приведенные в Таблице 2.8.

2.1.2. Оценка смачивания поверхности полимерных материалов

Оценка смачивания поверхности дистиллированной водой проводилась методом лежащей капли (объем капли – 20 мкл). При этом у некоторых полимеров наблюдалось изменение смачивания во времени, поэтому определялись значения краевого угла непосредственно в момент нанесения капли и спустя 2 мин после этого. Измеренные значения углов смачивания для изучаемых материалов представлены в Таблице 2.9.

Таблица 2.9 – Значения краевых углов смачивания поверхности эластомерных материалов и эпоксидных компаундов

Материал	Соотношение основа : отвердитель	Условия отверждения	Краевой угол	
			Сразу	2 мин
Эластомерные материалы				
ПДМС Sylgard® 184	10:1	65 °С, 4 ч	107°±1° n=7	-
КРЕОЛ	10:1,15	90 °С, 6 ч	101°±2° n=9	98°±1° n=10
		120 °С, 3 ч	97°±2° n=10	98°±1° n=10
	10:1,4	90 °С, 6 ч	102°±1° n=9	98°±1° n=9
		120 °С, 3 ч	98°±3° n=10	98°±1° n=8
Пентэласт®-712	20:1	t _{комн} , 72 ч	102°±1° n=8	98°±1° n=9
Lasil T-4	10:1	65 °С, 4 ч	102°±1° n=6	100°±1° n=9
	10:1+10% разбавителя	65 °С, 4 ч	~105°	98°±1° n=10
Эпоксидные компаунды				
ПЭО-221К	2:1	60 °С, 4 ч	85°±1° n=8	
ПЭО-510КЭ-20/0	4:1	60 °С, 6 ч	79°±2° n=10	
Resine Epoxy R123	10:4,5	24 ч t _{комн} , 24 ч 70 °С, 24 ч t _{комн}	78°±2° n=10	

Из приведенных данных следует, что эластомерные материалы обладают гидрофобными, схожими с ПДМС Sylgard® 184 свойствами.

У эпоксидных компаундов краевой угол смачивания менее 90°, что позволяет их считать гидрофильными, хотя смачивание поверхности при этом невысокое.

Одним из методов соединения эпоксидных реплик со стеклянными пластинами является связывание УФ-клеем. В связи с этим были изучены методы обработки поверхности пластин из эпоксидных смол с целью повышения ее смачивания: обработка ПЭО-221К в 0,5 М растворе NaOH в течение 24 часов приводит к незначительным изменениям и снижает значение краевого угла до 78°±1° (n=9). Последующая обработка образца плазмой в

кислородной среде в течение 1 минуты позволяет достигнуть значения краевого угла $40^{\circ} \pm 4^{\circ}$ ($n=5$). Однако даже при таком значении угла поверхность пластины не смачивается водой (при наклоне образца на 90° капли остаются на поверхности и не стекают, что, возможно, обусловлено влиянием эпоксидных групп на поверхности).

Для того чтобы использовать эпоксидные компаунды в конструкциях МФЧ, предназначенных для формирования макроэмульсий «вода-в-масле», рабочие поверхности чипов следует подвергнуть обработке так, чтобы величина угла смачивания превышала 92° . Поэтому была изучена возможность усиления гидрофобных свойств путем обработки водоотталкивающим агентом Aquapel (PPG Industries, США). Значения краевых углов для образцов ПЭО-221К, ПЭО-510КЭ-20/0, Resine Epoxy R123 после обработки составили $106^{\circ} \pm 1^{\circ}$ ($n=9$), $104^{\circ} \pm 3^{\circ}$ ($n=7$), $105^{\circ} \pm 2^{\circ}$ ($n=9$) соответственно. Однако следует учитывать, что в случае использования данных материалов в микрочипах для двойной эмульсии, когда требуется многостадийный процесс обработки, последующая обработка поверхности в кислородной плазме после гидрофобизации агентом Aquapel приводит к тому, что наблюдается угол смачивания близкий к нулю.

2.2. Методы и способы целевой модификации поверхности полимерных и стеклянных материалов

Основными целями модификации рабочей поверхности МФЧ могут являться:
а) создание функциональных групп, необходимых для получения прочного и герметичного соединения между элементами чипа; б) создание функциональных групп или слоев для обеспечения гидрофобности или гидрофильности поверхности (в методах «капельной» микрофлюидики); в) создание функциональных слоев для управления электрокинетическим потоком (в системах капиллярного электрофореза) и др. В данной работе изучались способы модификации поверхности ПДМС Sylgard[®] 184 для этих целей.

2.2.1. Обработка полидиметилсилоксана высокочастотной плазмой низкого давления в среде кислорода и аргона

Широко распространенным методом обработки поверхности ПДМС обеспечивающим получение функциональных групп является плазменная обработка. При обработке используются различные газы: Ar, N₂, O₂, NH₃ и др. В результате воздействия электрического поля происходит диссоциация газов и образование функциональных групп

на поверхности, тип которых зависит как от выбранного газа, так и от рабочих параметров (давление, время обработки, скорость потока газа и т.д.).

При плазменной обработке ПДМС в среде кислорода происходит повышение поверхностной энергии за счет образования, в том числе, силанольных групп (Si–OH), которые заменяют метильные (Si–CH₃) (Рисунок 2.7). В результате модификации происходит увеличение концентрации гидроксильных групп (–OH), определяющих гидрофильные свойства поверхности, после чего материал смачивается водой и полярными растворителями. Также плазменная обработка приводит к образованию сильных межмолекулярных связей. Так, после модификации кислородной плазмой образуются прочные ковалентные связи –Si–O–Si–, что позволяет получить герметичное неразъемное соединение ПДМС со стеклом и другими полимерами.



Рисунок 2.7 – Образование функциональных групп на поверхности ПДМС при обработке плазмой в среде кислорода

Свойства, приобретенные при обработке поверхности ПДМС плазмой, нестабильны. Восстановление гидрофобных свойств происходит по ряду причин:

- реорганизация гидрофильных групп на поверхности;
- миграция прореагировавших полимерных цепей от поверхности вглубь материала;
- потеря обогащенных кислородом соединений при взаимодействии с окружающей средой;
- переориентация цепей, предотвращающих конденсацию поверхностных силанольных групп;
- изменение шероховатости поверхности;
- загрязнение поверхности;
- миграция непрореагировавших олигомеров из объема к поверхности.

По мнению авторов, например, [135, 136] основной причиной восстановления гидрофобных свойств является миграция непрореагировавших олигомеров. Полного восстановления исходных свойств не происходит, так как при плазменной обработке

наблюдается структурирование поверхности на наноскопическом уровне, что влияет на значения углов смачивания, кроме того частично сохраняются образовавшиеся группы ОН.

Поскольку в литературных источниках встречались противоречивые сведения о стабильности свойств ПДМС, то было решено провести исследования по изучению изменения свойств смачивания после обработки материала.

Контроль результатов обработки осуществлялся с помощью метода лежащей капли на экспериментальной установке на базе оптического микроскопа PrimaExpert (ЛОМО, Россия). Во всех экспериментах проводилось по 6-8 измерений краевого угла для каждого образца, исследовалось свойство смачивания поверхности дистиллированной водой (объем капли 20 мкл).

Образцы ПДМС обрабатывались плазмой в среде кислорода в течение 1,5 минут и в среде аргона в течение 1 мин при давлении ~1 мбар на установке Denier Zepco (Германия) с частотой генерации 13,56 МГц. Результаты измерений краевых углов до и после обработки образцов в зависимости от времени хранения приведены в Таблице 2.10.

Таблица 2.10 – Зависимость значений краевых углов образцов ПДМС (10:1) до и после обработки кислородной и аргоновой плазмой от времени хранения

Обработка кислородной плазмой (1,5 мин)						
	Необработанный	Сразу после обработки	1 день	2 день	5 день	15 день
Средн. знач. ±СКО	$107^{\circ} \pm 1^{\circ}$ n=7	$<10^{\circ}$	$54^{\circ} \pm 1^{\circ}$ n=7	$59^{\circ} \pm 2^{\circ}$ n=7	$69^{\circ} \pm 2^{\circ}$ n=6	$78^{\circ} \pm 2^{\circ}$ n=8
Обработка аргоновой плазмой (1 мин)						
	Необработанный	Сразу после обработки	1 день	3 день	12 день	
Средн. знач. ±СКО	$107^{\circ} \pm 1^{\circ}$ n=7	$\sim 20^{\circ}$	$67^{\circ} \pm 1^{\circ}$ n=6	$74^{\circ} \pm 3^{\circ}$ n=7	$82^{\circ} \pm 1^{\circ}$ n=7	

Обработка высокочастотной плазмой образцов ПДМС приводит к значительному уменьшению значения краевого угла, но в процессе хранения свойства частично восстанавливаются, а спустя 15 дней значения угла достигают уже $78 \pm 2^{\circ}$. Таким образом, после плазменной обработки микрофлюидные чипы необходимо либо выдержать достаточно длительное время (не менее 7 дней), либо применять дополнительные способы обработки для стабилизации свойств смачивания (в том числе термический отжиг), чтобы получить воспроизводимые результаты.

Были проведены исследования по изучению влияния различных соотношений основа : отвердитель на смачивание поверхности до и после обработки кислородной плазмой, результаты которых представлены на Рисунке 2.8. Через 2 часа после обработки у образцов с соотношением основа : отвердитель 10:1 и 20:1 наблюдался наименьший угол смачивания. По истечению 24 часов минимальный угол смачивания был обнаружен у образца с соотношением 10:1. Восстановление свойств происходит быстрее у образцов соотношением основа : отвердитель 3:1, 5:1 и 20:1. После термической обработки при 200 °С в течение 1 часа у всех образцов зарегистрирован примерно одинаковый краевой угол. Было выявлено, что условия хранения образцов после обработки (в частности, температура и влажность окружающей среды) также влияют на восстановления свойств.

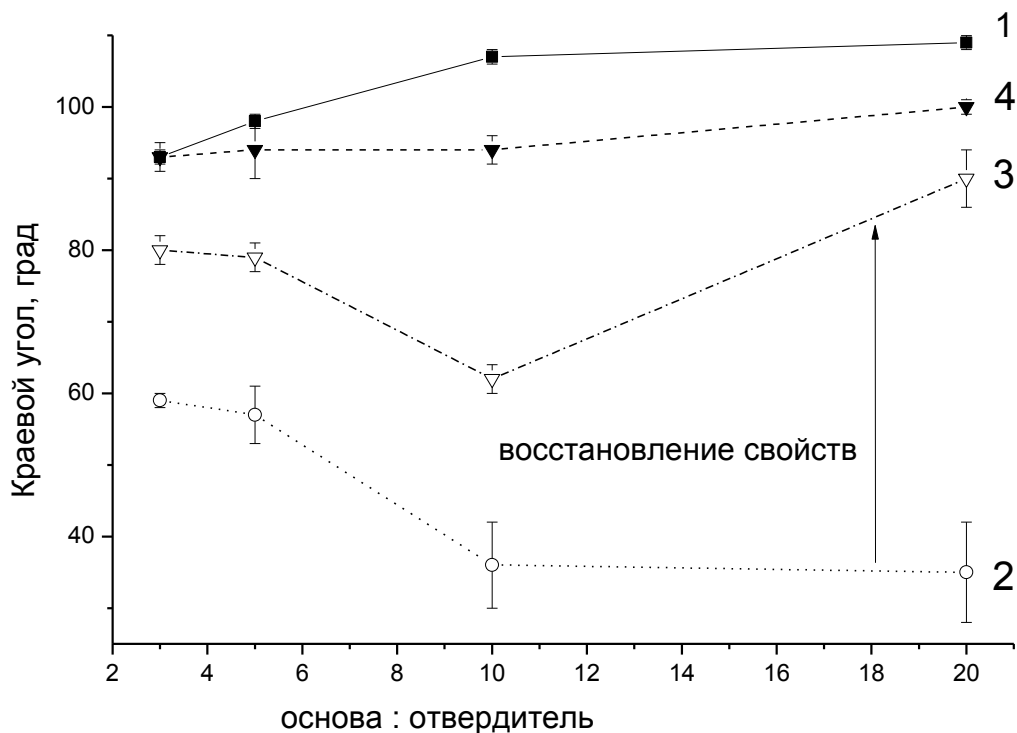


Рисунок 2.8 – Зависимость угла смачивания от соотношения основа : отвердитель ПДМС: 1 – для необработанного; 2 – после обработки в кислородной плазме и выдерживании при нормальных условиях в течение: 2 часов, 3 – в течение 24 часов; 4 – после обработки при температуре 200 °С в течение 1 часа

Оценка свойств смачивания в каналах МФЧ

Изучение свойств смачивания в каналах МФЧ проводили на 30 образцах гибридных (ПДМС-стекло) и 10 полимерных (ПДМС-ПДМС) чипах: сразу после обработки, через 1, 2, 7 и 14 дней (хранение при нормальных условиях). Оценку углов смачивания проводили по изображениям мениска жидкости дистиллированной воды при ее прокачивании через канал

со скоростью 1 мкл/мин. На Рисунке 2.9 приведены усредненные значения краевых углов от времени хранения МФЧ после их обработки.

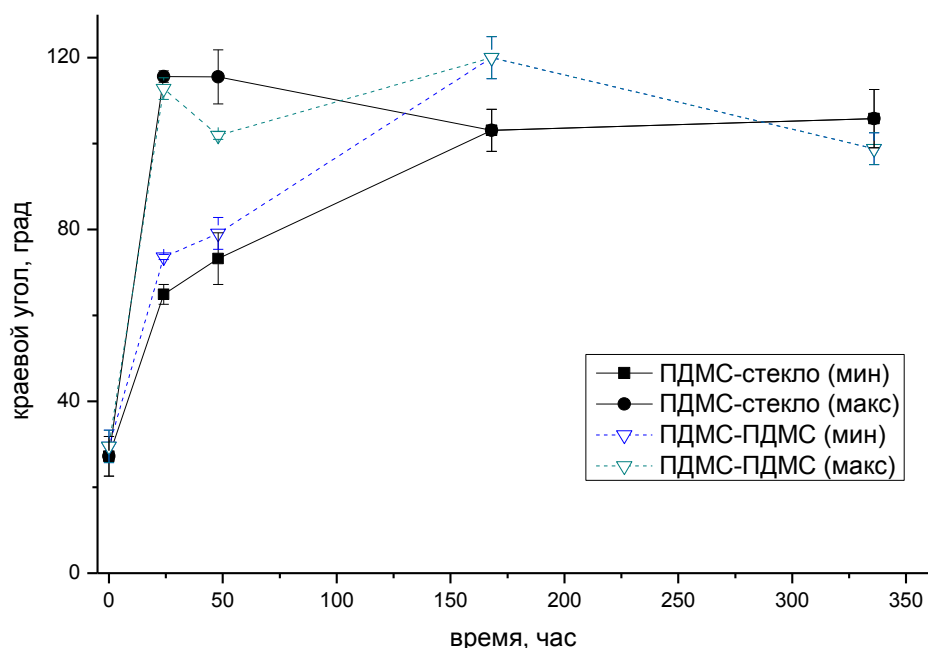


Рисунок 2.9 – Изменение свойств смачивания гибридных (ПДМС-стекло) и полимерных (ПДМС-ПДМС) МФЧ после обработки кислородной плазмой в зависимости от времени хранения

Во всех случаях сразу после модификации поверхность каналов становится гидрофильной: краевые углы $\Theta = 27 \pm 5^\circ$ (ПДМС-стекло) и $\Theta = 30 \pm 4^\circ$ (ПДМС-ПДМС). После нескольких дней хранения в каналах чипа наблюдали как гидрофобные ($\Theta > 90^\circ$), так и гидрофильные ($\Theta < 90^\circ$) свойства на одном МФЧ. Через 6-7 дней после обработки во всех МФЧ поверхность каналов становилась гидрофобной, но полного восстановления исходных гидрофобных свойств (до $\Theta = 130 \pm 2^\circ$ для ПДМС-ПДМС и $\Theta = 126 \pm 4^\circ$ для ПДМС-стекло) не происходило. Вероятно, что даже спустя несколько недель после плазменной обработки на поверхности материала сохраняются функциональные группы, определяющие гидрофильные свойства [137].

Экспериментальные исследования показали, что для восстановления исходных свойств каналов МФЧ, обработанного в среде кислорода, чип должен быть выдержан при температуре не менее 80°C , по крайней мере, в течение 4 часов (Рисунок 2.10).

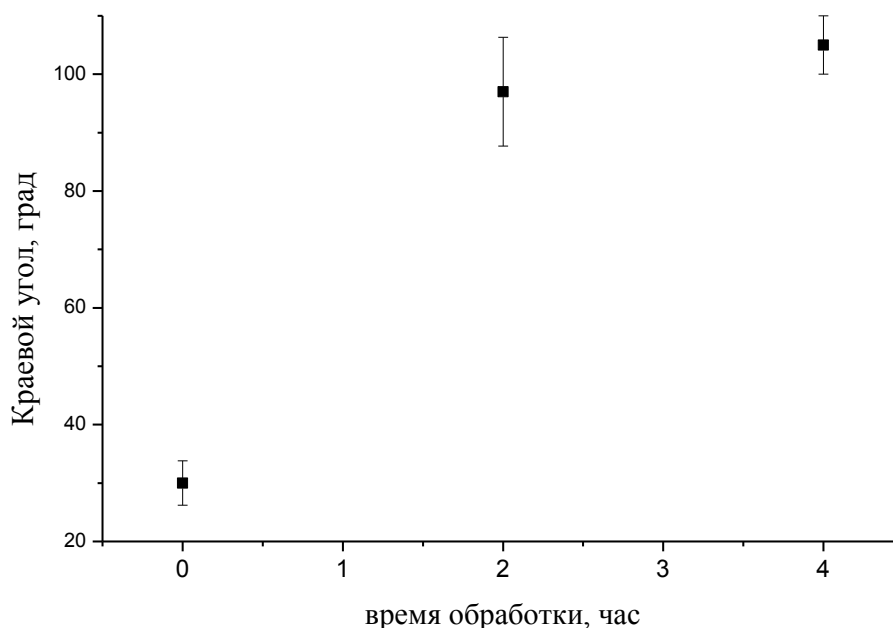


Рисунок 2.10 – Влияние длительности термической обработки при температуре 80 °C на величину краевого угла в канале полимерного чипа (данные для 4-х МФЧ по n=6)

Итак, для получения воспроизводимых результатов измерений после обработки кислородной плазмой необходимо использовать МФЧ после 7 дней хранения при нормальных условиях, либо применять термическую обработку в течение 1 часа при 200 °C или 4 часов при 80 °C для ускорения процесса восстановления гидрофобных свойств.

Определение необходимого (минимального) времени повторной обработки кислородной плазмой каналов гибридных и полимерных микрочипов с целью активации поверхности

В случае, когда после длительного хранения микрочипов, требуется провести модификацию каналов и микроструктур, необходимо активировать поверхность и осуществить повторную плазменную обработку. Поэтому были проведены исследования для оценки необходимого времени повторной обработки микрочипов. Измерения углов смачивания гибридных и полимерных МФЧ проводили сразу после повторной плазменной обработки, длительность обработки составила 90, 180, 360, 600, 720 и 900 сек.

Перед повторной обработкой микрочипы промывали дистиллированной водой и выдерживали при температуре 80 °C в течение 4 часов. Значения краевых углов определяли на основании измерений по 4-м МФЧ (для каждого времени обработки). Во всех случаях, независимо от времени плазменной обработки и конструкции МФЧ, повторная обработка позволяет достигнуть гидрофильных свойств поверхности каналов. Эффективность такой

обработки значительно выше для гибридных микрочипов (ПДМС-стекло), так как гидрофильные свойства поверхности стекла понижают значения углов смачивания (измеренных по мениску). Из зависимостей на Рисунке 2.11 следует, что наименьшие значения углов смачивания наблюдаются при обработке в течение ~600 сек для конструкций ПДМС-стекло и ~720 сек – для чипов ПДМС-ПДМС.

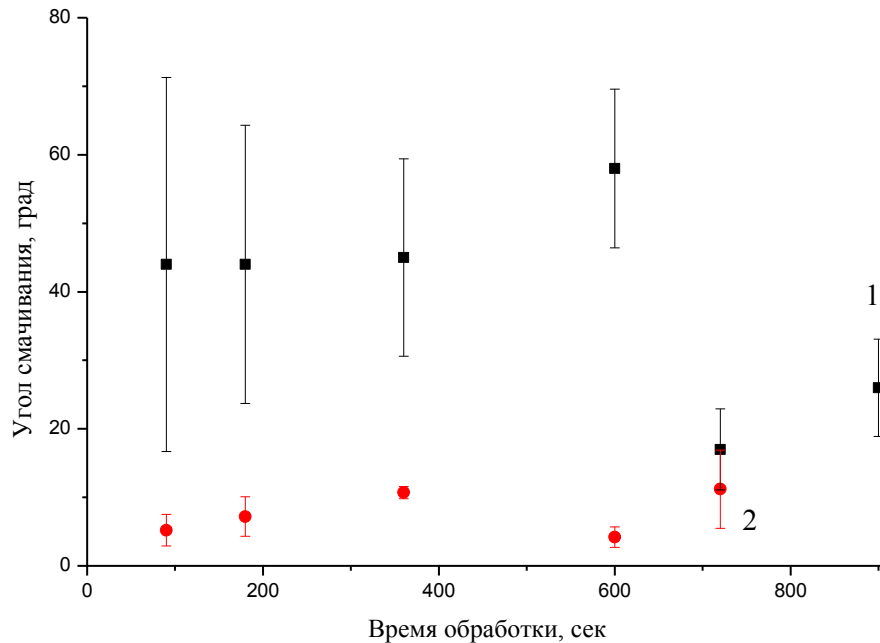


Рисунок 2.11 – Зависимость значений углов смачивания от времени повторной плазменной обработки в среде кислорода для МФЧ: 1 – ПДМС-ПДМС, 2 – ПДМС-стекло

При повторной обработке полимерных микрочипов свыше 20-ти минут наблюдается структурирование поверхности каналов. При движении жидкости по такой поверхности проявляются эффекты, приводящие к локальному образованию капель. Таким образом, суммарная обработка плазмой в среде кислорода не должна превышать указанное время.

2.2.2. Химические и физико-химические методы модификации

Обработка раствором «пиранья»

На основании литературных источников был выбран метод получения гидроксильных групп обработкой раствором «пиранья» (смесь концентрированной серной кислоты и 30% перекиси водорода). По данным приведенным в работе [138] минимальное значение краевого угла составило 27° после 15-ти мин обработки раствором «пиранья» и 15-ти мин выдерживания образца в 1М растворе КОН. В основе получения гидрофильной поверхности лежит следующий механизм: при смешивании серной кислоты и перекиси водорода одним

из продуктов реакции является атомарный кислород. Поэтому при взаимодействии раствора «пиранья» с ПДМС происходит разрыв связей Si–C– (отщепление органических радикалов) с образованием силанольных связей Si–O и появлением гидроксильных групп. Результаты проверки данного подхода приведены в Таблице 2.11.

Таблица 2.11 – Изменение краевого угла ПДМС в зависимости от длительности обработки раствором «пиранья» в соотношении H₂SO₄ (конц.) : H₂O₂ (30%) 3:2

Время обработки, мин	Среднее значение краевого угла ± СКО, град	
	Раствор «пиранья»	Раствор «пиранья»; 1 М КОН
Необработанный образец 107±1 (n=7)		
10	92±1 (n=5)	107±2 (n=6)
20	99±1 (n=8)	105±2 (n=7)
30	98±1 (n=8)	101±1 (n=8)
40	97±1 (n=7)	102±1 (n=6)

Полученные значения краевых углов после выдерживания в растворе «пиранья» от 10 до 40 минут и дополнительной обработки 1М раствором КОН, не соответствуют указанным в цитируемой работе значениям. Последующее выдерживание в растворе щелочи не приводит к значительному изменению свойств поверхности, снижая эффективность обработки раствором «пиранья». В связи с этим было предложено изменить соотношение компонентов раствора H₂SO₄ (конц.) : H₂O₂ (30%) с 3:2 на 3:1, увеличив концентрацию серной кислоты. Выдерживание образца ПДМС в таком растворе в течение 10 мин приводило к помутнению поверхности и появлению микротрещин. Оптимальным режимом обработки (подобранным экспериментально) стало выдерживание в растворе в течение 1-ой мин, при этом угол смачивания составил 93°±1°. Таким образом, не удалось достичь снижения краевого угла за счет изменения соотношения компонентов раствора. Однако это позволило сократить время обработки при работе с агрессивным раствором.

Обработка в кипящей воде

В работе [139] предложен способ увеличения гидрофильности поверхности отвержденного ПДМС Sylgard® 184 путем его обработки в кипящей воде. Время обработки составляло от 30-ти мин до 2-х часов. Авторы считают, что в реакции участвуют избыточные Si-H группы, находящиеся на поверхности отвержденного ПДМС. Идея этих авторов и полученные ими результаты явились отправной точкой для исследований, результаты

которых приведены далее. Было изучено влияние соотношения основа : отвердитель на величину угла смачивания после кипячения образца (Таблица 2.12). Введение избыточного количества отвердителя, содержащего гидридные группы –Н позволяет, предположительно, увеличить число групп –ОН и, следовательно, смачивание поверхности путем реакции гидролиза.

Обработку осуществляли в 2 этапа:

1. введение в состав исходной смеси избытка компонента с гидридными группами;
2. реакция гидролиза, а именно кипячение в дистиллированной воде, которое должно способствовать появлению гидроксильных групп (уменьшению групп –Н).

При этом ожидалось снижение краевого угла. Наиболее существенное изменение было обнаружено для ПДМС (3:1) при кипячении в течение 1-ого часа.

Таблица 2.12 – Изменение краевого угла на поверхности ПДМС в зависимости от соотношения основа : отвердитель и от времени кипячения

Соотношение основа : отвердитель	Среднее значение величины краевого угла±СКО, град.				
	Исходный образец	Время кипячения, час			
		0.5	1	1,5	2
10:1	107±1 (n=7)	104±2 (n=8)	106±1 (n=8)	103±2 (n=7)	105±2 (n=8)
3:1	102±1 (n=7)	96±1 (n=7)	92±1 (n=8)	93±1 (n=8)	94±1 (n=6)

Кроме того, были исследованы следующие физико-химические методы модификации открытых поверхностей ПДМС с предварительной плазменной обработкой:

- 1% водным раствором поливинилового спирта (ПВС) (Sigma-Aldrich Corp., США);
- 3% водным раствором Kolliphor[®] P 188 (Sigma-Aldrich Corp., США);
- 4% раствором 3-(метакрилоилокси)-пропилтриметокси-силана (Sigma-Aldrich Corp., США).

Обработка раствором поливинилового спирта

За основу обработки раствором поливинилового спирта каналов МФЧ была принята методика, описанная в работе [140] и предназначенная для обработки микроканалов для электрофоретического разделения проб. Подобная техника применяется также и для решения задач «капельной» микрофлюидики. Предварительная обработка плазмой в среде кислорода придает не только выраженные гидрофильные свойства, но и вызывает образование на поверхности функциональных групп и свободных радикалов (в т.ч. С-ОН, Si-ОН, СООН и

др.). Таким образом, за счет образования водородных связей происходит адсорбция слоя ПВС из водного раствора на обработанную плазмой поверхность ПДМС.

Полимерные пленки обрабатывали высокочастотной (13,56 МГц) плазмой (при давлении 1 мбар) на установке Denier Zepto (Denier electronic GmbH, Германия) в среде кислорода в течение 1 минуты, помещали в чашку Петри с 1% водным раствором ПВС и выдерживали в течение 10-ти минут при температуре 25 °С. Затем промывали в дистиллированной воде в течение 5-ти минут и помещали в термостат на 15 минут при температуре 110 °С. Далее температура была увеличена до 140 °С, и образцы выдерживали 20 минут для закрепления адсорбированного слоя. Результаты измерений краевых углов представлены в Таблице 2.13 и свидетельствуют о достижении гидрофильных свойств поверхности.

Таблица 2.13 – Зависимость значений краевых углов образца ПДМС после обработки раствором поливинилового спирта от времени хранения

	Сразу после обработки	1 день	3 день	6 день
Средн. знач. ±СКО	61°±2° (n=8)	69°±2° (n=8)	74°±2° (n=7)	80°±1° (n=8)

Обработка раствором Kolliphor® P 188

Обработка аналогичным линейным сополимером поверхности ПДМС описана в работе [141]. В основе механизма закрепления слоя полимера лежит образование свободных радикалов на поверхности ПДМС в процессе плазменной обработки в среде аргона. Некоторые из этих радикалов взаимодействуют с радикалами, образованными в плазме, что приводит к появлению на поверхности функциональных групп. Активированная таким образом поверхность может реагировать с кислородом или влагой, содержащимися в воздухе, образуя SiO₂, Si-OH или Si-CH₂OH группы.

Образцы полимера обрабатывали высокочастотной (13,56 МГц) плазмой (при давлении 1 мбар) на установке Denier Zepto в среде аргона в течение 1-ой минуты, помещали в чашку Петри с 3% водным раствором Kolliphor® и выдерживали в течение 24-х часов при температуре 60 °С. Затем промывали в дистиллированной воде и высушивали при комнатной температуре. Результаты измерений краевого угла после модификации поверхности ПДМС приведены в Таблице 2.14.

Таблица 2.14 – Зависимость значений краевых углов образца ПДМС после обработки раствором Kolliphor® от времени хранения

	Сразу после обработки	1 день	2 день	4 день	12 день
Средн. знач. ±СКО	39°±4° (n=5)	52°±3° (n=6)	60°±3° (n=6)	68°±3° (n=6)	83°±3° (n=6)

Обработка раствором силана

Предварительно образцы ПДМС обрабатывали высокочастотной (13,56 МГц) плазмой (при давлении 1 мбар) на установке Denier Zepco в среде кислорода в течение 1 мин, далее на активированную поверхность наносили 4% раствор 3-(метакрилоилокси)-пропилтриметокси-силана (далее – силана) в водном растворе 20% уксусной кислоты и 80% этанола. Модификация поверхности основана на реакции гидролиза – взаимодействии молекул воды с метокси группами молекул силана с образованием гидроксильных групп. Далее происходит реакция гидроксильных групп на поверхности ПДМС с гидроксильными группами в молекулах силана – пришивка молекул силана к поверхности. Образцы выдерживали в течение 40 минут при комнатной температуре, затем промывали в этиловом спирте и дистиллированной воде и высушивали. Результаты измерения краевого угла образцов ПДМС приведены в Таблице 2.15.

Таблица 2.15 – Зависимость значений краевых углов образца ПДМС после обработки раствором силана от времени хранения

	Сразу после обработки	1 день	3 день	6 день
Средн. знач. ±СКО	59°±2° (n=8)	69°±1° (n=8)	73°±1° (n=8)	77°±2° (n=8)

Итак, все исследованные методы модификации ПДМС с предварительной плазменной обработкой позволяют достигнуть гидрофильных свойств поверхности, но в зависимости от метода обеспечивается разная стабильность свойств во времени. Схожие результаты относительно достигаемого значения краевого угла и стабильности приобретенных гидрофильных свойств наблюдаются при обработке растворами поливинилового спирта и силана. Обработка силаном может применяться в качестве промежуточной стадии для последующего создания функциональных слоев (например, иммобилизации полиакриламидного геля). В случае использования раствора ПВС и образования на поверхности достаточно тонкого слоя, возможно увеличение толщины этого слоя за счет

проведения нескольких последовательных обработок. Перспективным является способ обработки ПДМС с использованием раствора Kolliphor[®], однако приобретаемые свойства при такой обработке являются не стабильными.

2.2.3. Контроль и оценка свойств модифицированных поверхностей ПДМС методами спектроскопии в ближней инфракрасной области

Задачами спектрофотометрических измерений образцов ПДМС в БИК-области после их обработки являлось: 1) определение возможности контроля групп –ОН; 2) выявление спектральных диапазонов, где наблюдаются наибольшие изменения светопоглощения после обработки и модификации материала.

Спектральные измерения пленок ПДМС Sylgard[®] 184 толщиной 1 мм осуществляли на спектрофотометре Hitachi U3410 в области длин волн от 850 до 2500 нм при скорости сканирования 240 нм/мин.

На основании полученных измерений спектральных зависимостей светопропускания образцов были определены минимумы пропускания (максимумы поглощения). Из Таблицы 2.16 и на основании данных работы [123] следует, что наблюдаемые полосы поглощения обертонов метильных групп ($-\text{CH}_3$) отражают состояние их колебательных уровней ($\nu_1 = 2905 \text{ см}^{-1}$, $\nu_2 = 2963 \text{ см}^{-1}$, $\nu_3 = 1263 \text{ см}^{-1}$, $\nu_4 = 1412 \text{ см}^{-1}$). Обертон комбинированных колебаний групп –ОН ($2\nu+\delta$) совпадает с обертоном метильной группы ($3 \nu_1$), что делает невозможным оценку групп –ОН. Кроме того, нет явно выраженного пика, присущего обертоны валентных колебаний –ОН (в области 1450 нм). Если предположить, что этому обертоны соответствует пик пропускания, зарегистрированный на 1480 нм, а подобный сдвиг частот вполне возможен в сложных молекулах, то исходя из данных, полученных при спектральных измерениях после разных видов обработки ПДМС, можно сделать вывод, что метод БИК в данном случае не подходит для оценки групп –ОН.

Таблица 2.16 – Минимумы светопропускания (Т, %) образцов ПДМС при различных методах обработки поверхности

Длина волны, нм	Соответствие поглощ. обертонов метильных групп [123]	Метод обработки образца ПДМС					
		Необр.	O ₂ плазма, 3 мин	Ar плазма, 1 мин	1% p-p ПВС	3% p-p Kol-liphor®	4% p-p силана
2471	2d _a (CH ₃)+ d _s (CH ₃)	22,04	33,21	20,49	23,74	23,0	21,49
2405		27,21	38,89	26,0	29,10	28,2	26,69
2374	v _{as} (CH ₃)+ d _s (CH ₃)	9,75	17,81	8,63	10,85	10,29	9,37
2296	v _{as} (CH ₃)+ d _a (CH ₃)	2,58	6,40	2,09	2,98	2,8	2,43
1976		89,07	90,47	89,53	90,38	89,66	89,02
1850	v _s (CH ₃)+ 2d _s (CH ₃)	84,27	87,54	84,79	85,87	84,94	84,17
1784	v _{as} (CH ₃)+ d _s (CH ₃)+ d _{as} (CH ₃)	80,45	84,77	80,62	82,40	81,28	80,08
1746	2v _s (CH ₃) v _s (CH ₃)+ 2d _{as} (CH ₃)	54,77	65,84	54,0	57,74	56,19	54,4
1700	2v _{as} (CH ₃)	59,82	69,28	58,93	62,71	61,20	59,45
1529	–	93,27	92,46	92,55	94,39	93,37	92,34
1401	v _s (CH ₃)+ 3d _{as} (CH ₃)	87,56	88,59	86,18	88,79	87,7	86,81
1186	3v _s (CH ₃)	87,27	87,55	85,06	88,38	87,02	86,20

Учитывая, что в ПДМС имеется большое число метильных групп (–CH₃), а во всех методах физико-химической обработке происходят трансформации с этими группами, то, по-видимому, качество обработки можно оценивать по изменению данных групп. Если рассмотреть изменение светопропускания обработанных образцов относительно исходного ПДМС (Таблица 2.17), то из полученных данных следует, что наибольшее изменение относительного светопропускания наблюдается на длинах волн 2374 и 2296 нм. Таким образом, на этих длинах волн может быть осуществлен контроль свойств поверхности при ее модификации и получены оценки при сравнении разных методов.

Таблица 2.17 – Относительное изменение светопропускания ($T_{\text{обработ}}/T_{\text{необр}}$) образцов ПДМС при различных методах обработки поверхности

Длина волны, нм	Методы обработки					
	O ₂ плазма, 3 мин	Ar плазма, 1 мин	1% p-p ПВС	3% p-p Kolliphor [®]	4% p-p силана	«Пиранья» 3:1, 1 мин
2471	1,51	0,93	1,08	1,05	0,98	0,98
2405	1,43	0,96	1,07	1,04	0,98	0,98
2374	1,83	0,89	1,12	1,06	0,96	0,99
2296	2,48	0,81	1,16	1,09	0,94	1,03
1746	1,20	0,99	1,05	1,03	0,99	1,01
1700	1,16	0,98	1,05	1,02	0,99	1,00

Следует отметить, что плазменная обработка в среде кислорода (по данным спектрофотометрии) из всех рассмотренных способов наиболее существенно влияет на группы –CH₃.

2.3. Оптические свойства полимерных материалов для микрофлюидных чипов

Применение оптических методов детектирования в микрофлюидных устройствах приводит к необходимости изучения спектральных зависимостей светопропускания материалов, используемых для их создания.

В большинстве методов анализа биологических проб на МФЧ применяются оптические системы детектирования, в частности, в методах ПЦР, секвенирования, иммунного анализа используются флуоресцентные красители. Поэтому важным требованием к материалам МФЧ является минимальный уровень флуоресценции материала на длинах волн эмиссии красителя.

В экспериментах осуществляли измерения светопропускания и фоновой флуоресценции следующих материалов:

- ✓ ПДМС (Sylgard[®] 184) толщиной h=3,0 мм;
- ✓ ПДМС с интегрированной полиолефиновой пленкой (ПО-пленка) (Sarstedt AG & Co., Германия) толщиной h=3,0 мм;
- ✓ ПДМС с интегрированной пленкой циклоолефинового сополимера (ЦОС-пленка) (ZEONEX[®], ZEON EUROPE GmbH, Германия) толщиной h=3,3 мм;
- ✓ пластины из клея-компаунда ПЭО-221К (СПбГТИ(ТУ), Россия) толщиной h=2,3 мм;

- ✓ пластины из клея-компаунда ПЭО-510КЭ-20/0 (СПбГТИ(ТУ), Россия) толщиной $h=2,3$ мм;
- ✓ пластины из эпоксидной смолы Resine Epoxy R123 (SOLOPLAST VOSSCHEMIE, Франция) толщиной $h=2,2$ мм;
- ✓ эластомера Lasil T-4 (Dow Corning) толщиной $h=1,3$ мм;
- ✓ эластомера Lasil T-4 + 10% разбавителя толщиной $h=1,6$ мм;
- ✓ силиконовой композиции КРЕОЛ (ООО «СУРЭЛ», Россия) толщиной $h=1,9$ мм;
- ✓ компаунда Пентэласт®-712 (П-712) марки А (ООО «Силиконовые материалы», Россия) толщиной $h=3,8$ мм;
- ✓ стеклянной пластины марки К8 толщиной $h=1,4$ мм.

2.3.1. Спектральные зависимости светопропускания материалов для микрофлюидных чипов

На Рисунке 2.12 представлены зависимости пропускания, полученные для ПДМС и ПДМС с интегрированными пленками ПО и ЦОС.

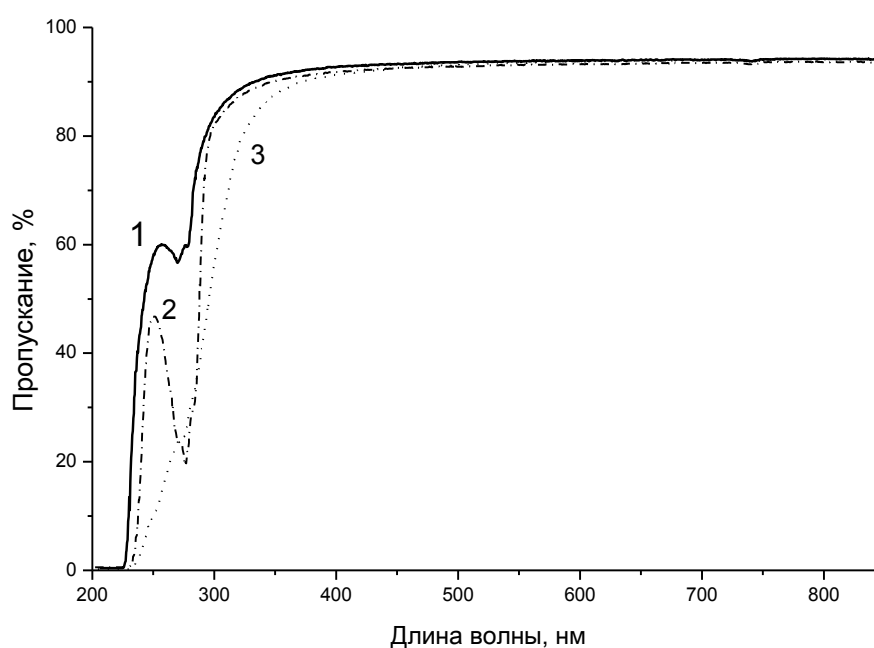


Рисунок 2.12 – Спектральные зависимости светопропускания ПДМС Sylgard® 184 (1) и ПДМС с интегрированными пленками ЦОС (2) и ПО (3)

Если в диапазоне от 200 до 350 нм у образцов ПДМС и ПДМС-ЦОС наблюдается пик поглощения в области длин волн 270-275 нм, то свыше 350 нм зависимость становится монотонно возрастающей, а уровень светопропускания превышает 85%. Таким образом,

интеграция пленок ПО и ЦОС в ПДМС не приводит к существенному изменению спектров пропускания в области длин волн от 400 до 850 нм, где используются основные оптические методы регистрации. Отметим, что измеренный спектр пропускания ПДМС Sylgard® 184 соответствует приведенным в литературных источниках, например, [142].

Область прозрачности у эпоксидных компаундов начинается от 300 нм для ПЭО-510КЭ и ПЭО-221К и от 350 нм для Resine Epoxy R123. Уровень светопропускания свыше 85% наблюдается у ПЭО-510КЭ и ПЭО-221К на длинах волн более 385 нм, у Resine Epoxy R123 – более 445 нм (Рисунок 2.13). ПЭО-510КЭ и ПЭО-221К имеют достаточно хорошее светопропускание в спектральной области от 300 до 800 нм, сравнимое с пропусканием ПДМС. Все указанные материалы могут применяться в конструкциях устройств, ориентированных на оптические методы регистрации в диапазоне от 400 до 850 нм, Resine Epoxy R123 имеет самое низкое светопропускание по сравнению с отечественными компаундами.

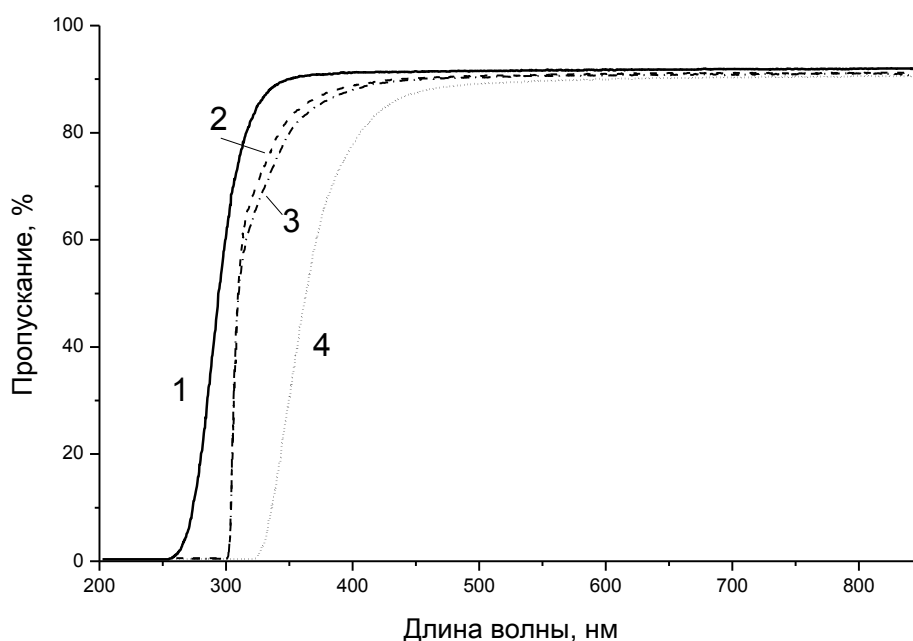


Рисунок 2.13 – Спектральные зависимости светопропускания стекла марки К8 (1) и эпоксидных компаундов: ПЭО-510КЭ (2), ПЭО-221К (3) и Resine R123 (4)

У силиконовой композиции КРЕОЛ пропускание свыше 85% зарегистрировано на длинах волн свыше 300 нм (Рисунок 2.14). Компаунд Пентэласт®-712 представляет собой полимерный материал с высоким рассеянием света, поэтому в видимом диапазоне у него наблюдается низкое светопропускание (не превышает 10%).

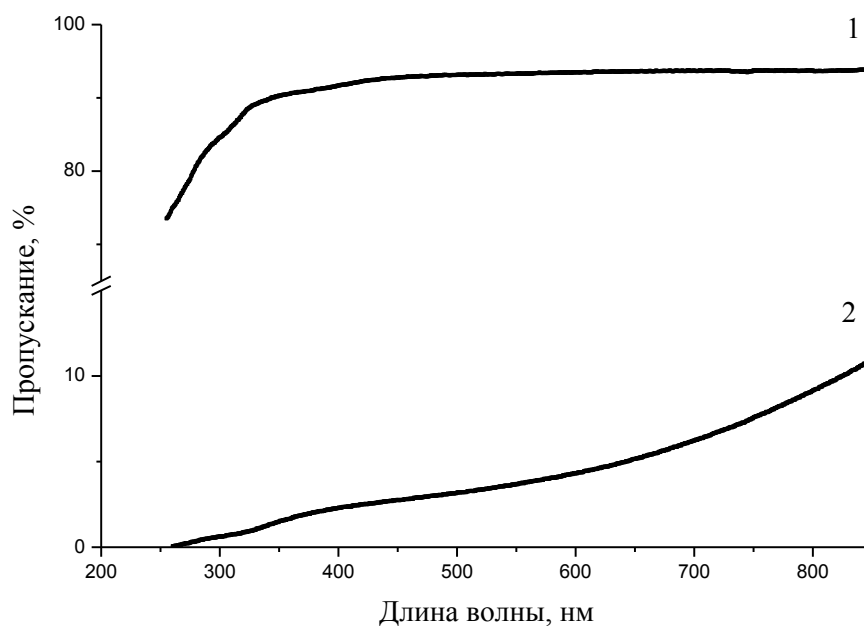


Рисунок 2.14 – Спектральные зависимости светопропускания: 1 – силоксановой композиции КРЕОЛ (10:1,4); 2 – компаунда Пентэласт®-712 (20:1)

Эластомер Lasil T-4 (условия отверждения: 65 °С, 4 часа) на длине волны 300 нм имеет пропускание около 40%, а уровень 85% пропускания наблюдается в районе 540 нм (Рисунок 2.15). Вариация компонентного состава – добавление 10% и 30% силиконового масла-разбавителя практически не влияет на спектральные характеристики.

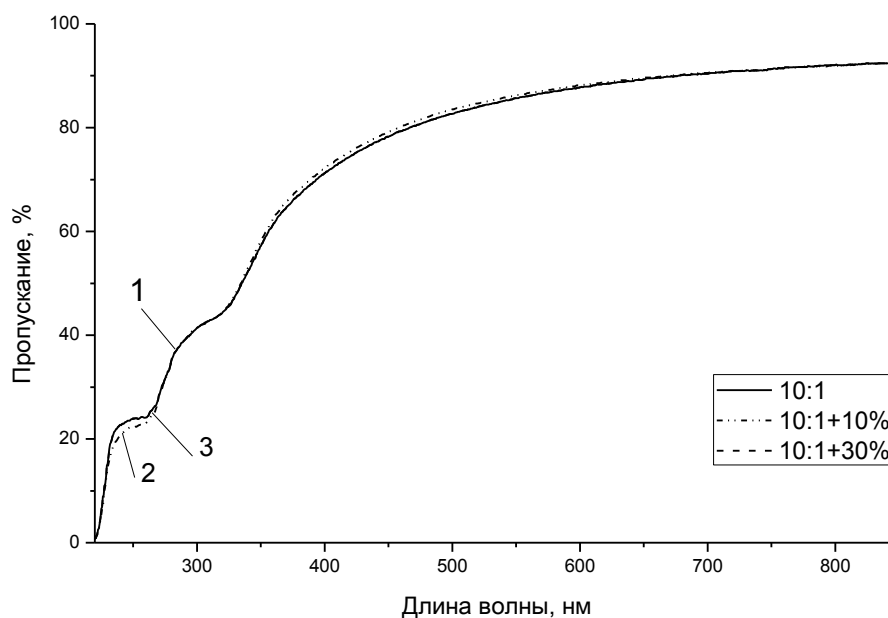


Рисунок 2.15 – Спектральные зависимости светопропускания эластомера Lasil T-4 с разным компонентным составом: 1 – 10:1, 2 – 10:1 + 10% силиконового масла, 3 – 10:1 + 30% силиконового масла

2.3.2. Измерения величины фоновой флуоресценции материалов для микрофлюидных чипов

Флуоресцентные красители, применяемые в методах молекулярной диагностики, можно условно разделить на несколько групп по длине волны возбуждения и диапазону длин волн флуоресценции (Таблица 2.18). Чтобы оценить уровень фоновой флуоресценции материала необходимо измерить его флуоресценцию при возбуждении на длине волны применяемого красителя и сравнить полученную величину с флуоресценцией известного материала, например, кварцевого стекла. Все измеренные спектры были условно разделены на пять групп в соответствии с длинами волн возбуждения λ_{ex} флуорофоров, представленных в Таблице 2.18. Для этих групп были выбраны длины волн регистрации эмиссии λ_{em} . В работе были исследованы группы I – IV.

Таблица 2.18 – Максимумы поглощения и флуоресценции красителей, наиболее часто используемых в методах молекулярной диагностики

Группа	Длины волн возбуждения λ_{ex} и флуоресценции λ_{em} красителей [143]			Длины волн возбуждения λ_{ex} и регистрации флуоресценции λ_{em} (по группам)	
	Флуоресцентные красители	λ_{ex} , нм	λ_{em} , нм	λ_{ex} , нм	λ_{em} , нм
I	5-FAM	492	517	495±5	510
	FITC	494	518		
	SYBR [®] Green I	494	521		
	EvaGreen [®] *	500	530		
II	6-JOE	520	548	525±5	535
	Rhodamine R6G	525	555		
	HEX	530	556		
III	Rhodamine Red	560	580	565±5	575
	5-ROX	567	591		
IV	5-TAMRA	542	568	545±5	555
	Cy-3	550	565		
V	Cy-5	650	670	650±5	655

* Данные из *EvaGreen[®] Fluorescent DNA Stain – Jena Bioscience [144]*

ПДМС Sylgard[®] 184 обладает фоновой флуоресценцией на всех длинах волн возбуждения флуоресцентных красителей. Хотя уровень флуоресценции относительно невысок, но в диапазоне 560-600 нм при возбуждении на длине волны 495 нм наблюдается явный пик (Рисунок 2.16). Интеграция пленок ПО и ЦОС в ПДМС приводит к возрастанию фонового сигнала в 1,5-2 раза.

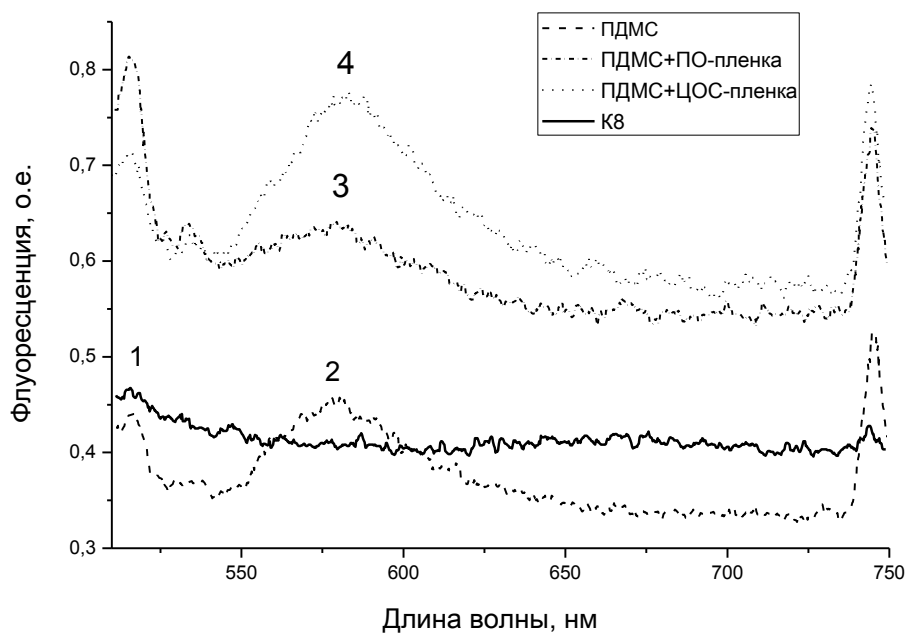


Рисунок 2.16 – Спектры флуоресценции стекла марки К8 (1), ПДМС Sylgard® 184 (2), ПДМС с пленкой ПО (3) и ПДМС с пленкой ЦОС (4), при возбуждении на $\lambda=495$ нм

Спектры флуоресценции эпоксидных компаундов при возбуждении на 495 нм приведены на Рисунке 2.17. Уровень фоновой флуоресценции всех материалов соизмерим. Наблюдается два пика флуоресценции – с невысокой интенсивностью в диапазоне 515-518 нм и с большой интенсивностью в области ~ 605 нм.

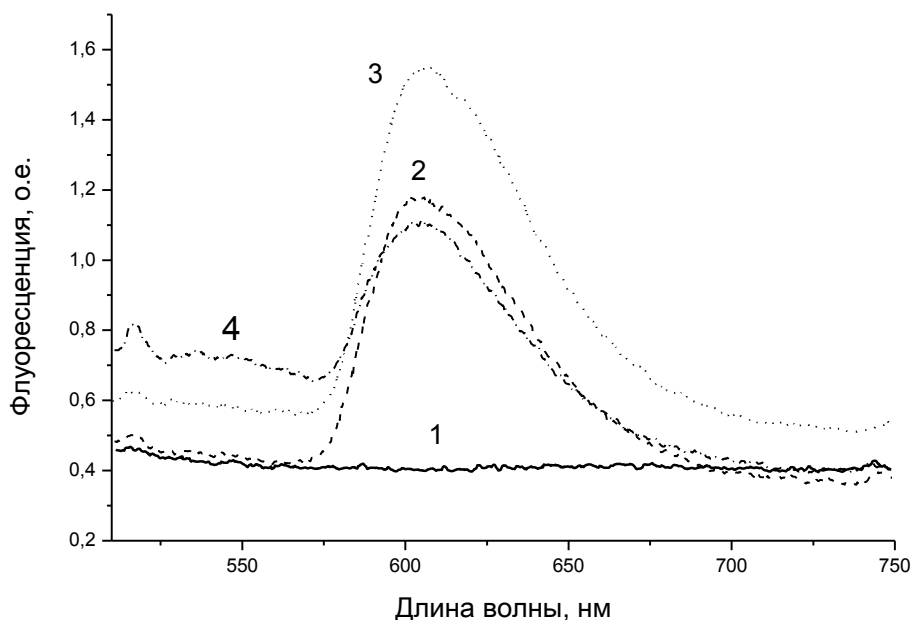


Рисунок 2.17 – Спектры флуоресценции: 1 – стекла марки К8, 2 – компаунда ПЭО-221К, 3 – компаунда ПЭО-510КЭ, 4 – Resine R123 при возбуждении на $\lambda=495$ нм

Измеренные спектры флуоресценции эластомеров и эпоксидных материалов в соответствии с параметрами, указанными в Таблице 18, были использованы при построении ниже приведенных на Рисунках 2.18 – 2.21 гистограмм. В качестве сравнительного образца была выбрана стеклянная пластина марки К8 толщиной $h=1,4$ мм.

Группа I

При возбуждении на длине волны 495 нм наибольшая флуоресценция в спектральном диапазоне 515-518 нм наблюдалась у ПДМС с ПО-пленкой и Resine R123 (Рисунок 2.18). Отметим, что собственная флуоресценция ПДМС Sylgard® 184 в этом диапазоне низка. Интегрирование ПО- и ЦОС-пленок приводит к увеличению фоновой флуоресценции. Наименьшая флуоресценция была выявлена у пластины из ПЭО-221К. Однако возбуждение на этой длине волны привело к появлению дополнительных пиков флуоресценции в диапазоне 578-607 нм у всех изучаемых материалов. Наименьшая флуоресценция наблюдалась у образца ПДМС, а наибольшая – у образца из ПЭО-510КЭ. В этом диапазоне длин волн уровни фоновой флуоресценции образцов из ПЭО-221К и Resine R123 соизмеримы.

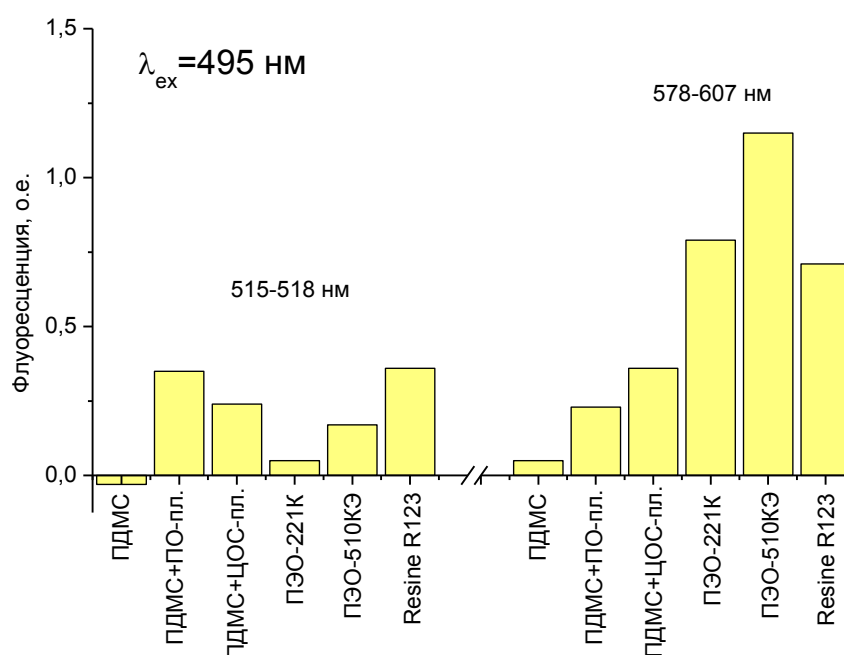


Рисунок 2.18 – Относительная фоновая флуоресценция материалов на $\lambda_{ex} = 495$ нм

Группа II

При возбуждении на 525 нм в области длин волн 547-548 нм была зарегистрирована флуоресценция только у образцов ПДМС с ПО-пленкой и Resine R123 (Рисунок 2.19). В

интервале длин волн 578-608 нм была выявлена фоновая флуоресценция у всех изучаемых материалов. Причем максимальная интенсивность наблюдалась у ПДМС с ЦОС-пленкой и ПЭО-510КЭ, а наименьшая – у образца ПДМС с ПО-пленкой и ПДМС.

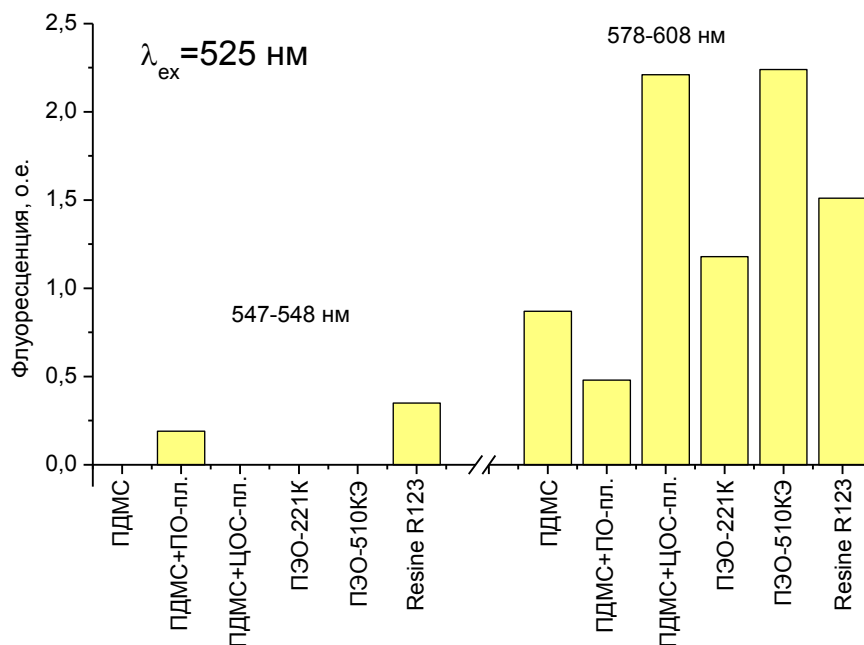


Рисунок 2.19 – Относительная фоновая флуоресценция материалов на $\lambda_{ex} = 525$ нм

Группа III

При возбуждении на длине волны 565 нм наименьшая флуоресценция наблюдалась у образца из ПДМС, наибольшая – у образца из ПЭО-221К (Рисунок 2.20).

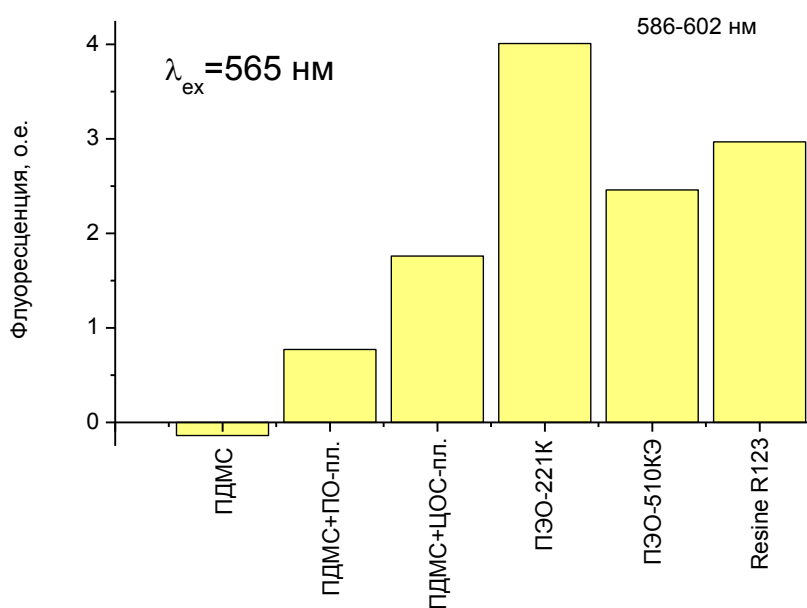


Рисунок 2.20 – Относительная фоновая флуоресценция материалов на $\lambda_{ex} = 565$ нм

Группа IV

При возбуждении на длине волны 545 нм у образца Resine R123 наблюдались два пика фоновой флуоресценции (на длине волны 570 нм и в интервале 573-607 нм). У остальных образцов был выявлен только один пик флуоресценции, причем наибольшее значение – у образца ПДМС с ЦОС-пленкой (Рисунок 2.21). Наименьший уровень флуоресценции в этом интервале зарегистрирован у ПДМС с ПО-пленкой и образца ПЭО-221К.

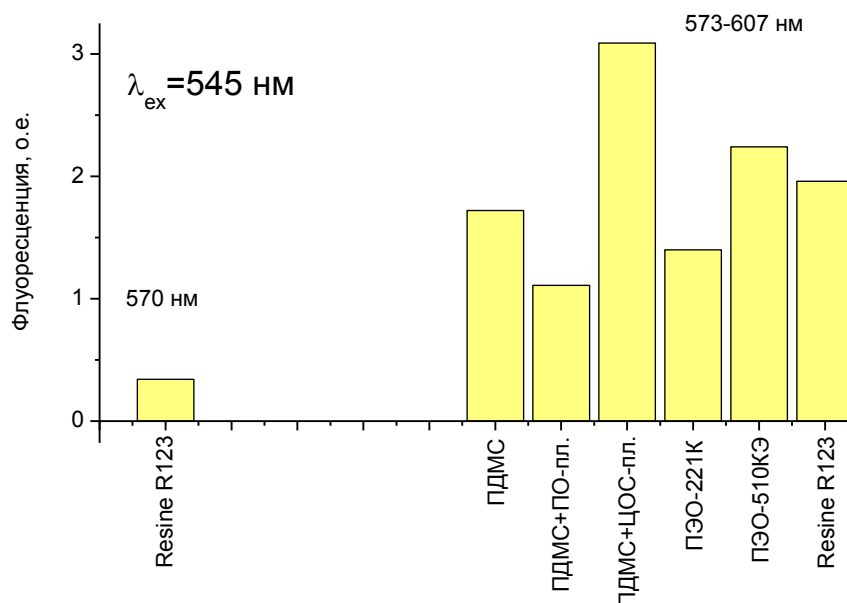


Рисунок 2.21 – Относительная фоновая флуоресценция материалов на $\lambda_{\text{ex}} = 545$ нм

Отдельно изучалась фоновая флуоресценция эластомера Lasil T-4 и сравнивалась с флуоресценцией ПДМС Sylgard® 184. Было выявлено, что Lasil T-4 обладает более высокой фоновой флуоресценцией, чем ПДМС и в отличие от него имеет несколько пиков флуоресценции (например, при возбуждении на длине волны 525 нм – Рисунок 2.22). Полученные данные представлены в Таблице 2.19. В целом интенсивность флуоресценции Lasil T-4 выше, чем у ПДМС, примерно в 1,5-1,6 раз.

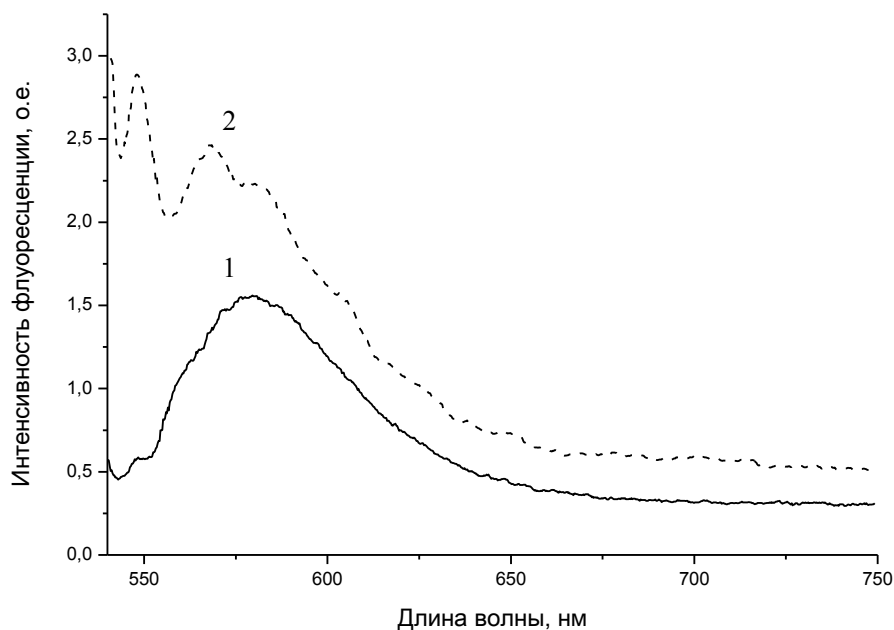


Рисунок 2.22 – Спектры флуоресценции эластомеров ПДМС Sylgard® 184 (1) и Lasil T-4 (2) на длине волны возбуждения 525 нм

Таблица 2.19 – Интенсивность флуоресценции эластомеров Lasil T-4 и ПДМС Sylgard® 184 при возбуждении на длинах волн наиболее часто используемых красителей

λ_{ex} , нм	Lasil T-4 10:1, 65 °С 4 часа		ПДМС 10:1, 65 °С 4 часа	
	Пики флуоресценции, нм	Интенсивность, о.е.	Пики флуоресценции, нм	Интенсивность, о.е.
565	588,8	1,34	589,4	1,17
	608,0	2,68		
545	568,8	3,79	580,0	3,02
	584,2	2,59		
525	567,8	2,47	579,2	1,56
	547,2	2,89		
495	532,8	0,83	532,2	0,55
	551,4	0,76		
	568,0	0,80		

На основании полученных данных была построена Таблица 2.20, в которой отмечены материалы с наименьшей фоновой флуоресценцией при возбуждении на длинах волн наиболее широко используемых красителей в методах молекулярной диагностики. Минимальным уровнем фоновой флуоресценции 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, ПДМС с ПО-пленкой, при возбуждении на 545 нм – Resine R123. Эти данные могут быть полезны при выборе материала для МФЧ, ориентированных на методы исследований с применением флуоресцентных систем детектирования.

Таблица 2.20 – Материалы, обладающие наименьшей фоновой флуоресценцией при возбуждении на длинах волн, соответствующих максимальному поглощению наиболее часто используемых красителей в биологических исследованиях

Группа	Флуорофоры	λ_{ex} , нм	λ_{em} , нм	Материалы с минимальной фоновой флуоресценцией
I	5-FAM, SYBR [®] Green I, EvaGreen [®]	495±5	515-530	ПДМС, ПЭО-221К
II	Rhodamine R6G, 6- JOE, HEX	525±5	540-560	ПДМС, ПДМС+ЦОС-пленка, ПЭО-221К, ПЭО-510КЭ
III	Rhodamine Red, 5- ROX	565±5	575-595	ПДМС, ПДМС+ПО-пленка
IV	Cy-3, 5-TAMRA	545±5	560-570	Resine R123

2.3.3. Определение времени отверждения эпоксидного компаунда ПЭО-221К методами спектроскопии

Применение эпоксидных компаундов при создании МФЧ обусловлено следующими преимуществами этих материалов. Во-первых, они позволяют создавать твердые и прочные конструкции, в которых можно осуществлять манипуляции с потоками жидкости и газа при высоком давлении. Во-вторых, эпоксидные компаунды не обладают паро- и влагопроницаемостью, что является необходимым условием для ряда микрофлюидных приложений. Поверхность эпоксидных материалов также может быть модифицирована и структурирована. Эти материалы могут использоваться как для изготовления мастер-форм и микрочипов, так и для герметизации микрофлюидных устройств. Поскольку процесс отверждения требует временных затрат (например, на отверждение Resine R123 требуется 72 часа), то актуальным является определение условий, позволяющих ускорить этот процесс, например, температуры отверждения. Одной из задач работы являлось изучение возможности контроля отверждения компаунда ПЭО-221К методами БИК-спектроскопии и определение условий, сокращающих время отверждения образца.

В БИК-области имеются полосы, связанные с поглощением эпоксидных и первичных аминов, которые не перекрываются: комбинационная полоса второго обертона эпоксидного кольца с растяжением СН ($\approx 4530 \text{ см}^{-1}$ или 2208 нм) и комбинационная полоса растяжения и изгиба NH ($\approx 4900\text{-}5000 \text{ см}^{-1}$). Механизм реакции полимеризации показывает, что при уменьшении концентрации эпоксидных групп наблюдается уменьшение поглощения (возрастает светопропускание) на $\lambda \approx 4530 \text{ см}^{-1}$, и на $\lambda \approx 6060 \text{ см}^{-1}$ (1650 нм). Таким образом, регистрируя изменение поглощения на длине волны 2208 нм в зависимости от времени отверждения компаунда можно оценивать динамику процесса полимеризации и сравнивать результаты при разных температурах отверждения. Поскольку процесс отверждения начинается при соединении компонентов компаунда – основы и отвердителя, то с целью увеличения точности измерений следует использовать оценки относительного светопоглощения (относительно эпоксидной основы):

$$T = \frac{T_{comp}(t)}{T_{base}}, \quad (2.3)$$

где $T_{comp}(t)$ – светопропускание смеси основы и отвердителя на момент времени t , измеренное в полосе поглощения, соответствующей характеристической частоте (длине волны),

T_{base} – светопропускание эпоксидной основы на этой же длине волны.

Зависимости изменения светопропускания кювет с эпоксидными компаундами измеряли в процессе отверждения при температурах 60 °С и 80 °С от 0 до 240 мин каждые 40 мин на спектрофотометре Hitachi U3410 в области длин волн от 850 до 2500 нм при скорости сканирования 240 нм/мин. В качестве кювет использовалась конструкция из двух стеклянных пластин толщиной 0,17 мм, соединенных между собой U-образной пластиной, в пространство которой помещался компаунд. Длина оптического пути такой кюветы – 2 мм.

Полученные зависимости (Рисунок 2.23) свидетельствуют, что отверждение образца ПЭО-221К при температуре 80 °С происходит примерно за 120 мин (2 часа). Отверждение образца при температуре 60 °С происходит за время не менее 4 часов.

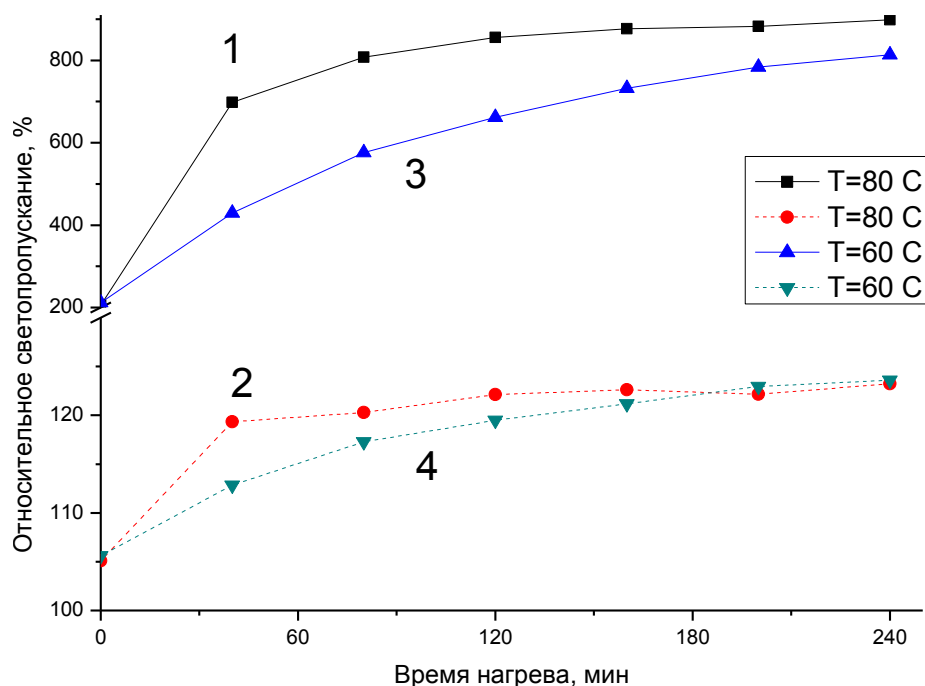


Рисунок 2.23 – Изменение светопропускания образца из компаунда ПЭО-221К в процессе отверждения при температуре 80 °C (1 – на длине волны 2208 нм, 2 – на длине волны 1650 нм) и при температуре 60 °C (3 – на длине волны 2208 нм, 4 – на длине волны 1650 нм)

2.4. Проверка материалов на возможность ингибирования ПЦР

Высокое соотношение площади поверхности к объему микроструктур приводит к повышению вероятности взаимодействия между внутренней поверхностью микрочипа и молекулами реакционной смеси, что отражается на эффективности реакции вплоть до ее прекращения (ингибирования). Предположительно механизм ингибирования обуславливается двумя основными факторами: физической адсорбцией и химическим взаимодействием компонентов смеси с материалом микрочипа. При выборе материала микрочиповых устройств для ПЦР предпочтение следует отдавать материалам, не влияющим на эффективность реакции. Поэтому необходимо было подтвердить, что предполагаемые для создания микрочипов материалы не ингибируют реакцию.

В лаборатории «Информационно-измерительных био- и хемосенсорных микросистем» ИАП РАН (к.т.н. Тупик А.Н., н.с. Рудницкая Г.Е.) были исследованы следующие материалы: ПДМС Sylgard[®] 184, оптический однокомпонентный УФ-клей Permabond UV630, эпоксидный клей-компаунд ПЭО-221К, пленка циклоолефина Zeonor Film[®] ZF14-188, пленка полиэтилентерефталата (DuPont, США).

Исследуемые материалы помещали в пробирку при проведении ПЦР в реальном времени, используя в качестве сравнения пробирку с ПЦР-смесью без добавок. В экспериментах использовался амплификатор нуклеиновых кислот АНК-32 (ИАП РАН, Россия), специфичные праймеры с зондами (ООО «ДНК-Синтез», Россия) и реакционная смесь М-428 «ПЦР-Микс» (ЗАО «Синтол», Россия). В качестве мишени применяли синтезированный фрагмент ДНК гена домашнего хозяйства GAPDH длиной 226 пар оснований (п.о.) в концентрации 10^5 копий/мкл. Величину порогового цикла (C_t) определяли с применением программного обеспечения АНК-32 по трем-пяти повторам. Если разница средних величин порогового цикла в пробирках с образцом и в пробирках без добавок больше 1,0 цикла ПЦР-РВ, то считалось, что образцы ингибируют реакцию.

Результаты экспериментов показали, что все исследуемые материалы не ингибируют реакцию при проведении ПЦР в реальном времени.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 2

Оценки модуля упругости E эластичных материалов микроскопическим тестом отличаются от оценок, полученных при использовании макроскопического теста. Во всех случаях значения оценок микроскопического теста, полученных для образцов ПДМС Sylgard[®] 184, Lasil T-4 (10:1) и Пентэласт[®]-712 (20:1, 72 ч), выше, чем макроскопического. Можно полагать, что это связано с особенностями наноизмерений, в частности с правильностью выбора режимов измерений, жесткости зонда, учетом других факторов. При создании функциональных элементов микрометровых размеров более адекватной является оценка, полученная при использовании макроскопических тестов. На основе макроскопических тестов для образца Lasil T-4 (10:1) получено значение модуля упругости – 1,91 МПа, для образца Пентэласт[®]-712 (20:1, 72 ч) – 1,43 МПа.

Оценка свойств смачивания поверхности эластомеров и эпоксидных компаундов методом лежащей капли показала, что эластомерные материалы (ПДМС, КРЕОЛ и Пентэласт[®]-712) в исходном состоянии (после полимеризации) обладают гидрофобными свойствами. Эпоксидные материалы обладают лучшим смачиванием поверхности ($\Theta=78-85^\circ$). Таким образом, эпоксидные материалы вполне можно применять *без дополнительной обработки* в микрофлюидных чипах, предназначенных для создания эмульсий «масло-в-воде». Эластомерные материалы *без дополнительной обработки* могут использоваться в МФЧ для формирования макроэмульсий «вода-в-масле». Плазменная обработка в среде кислорода или аргона приводит к гидрофилизации поверхности эластомеров.

Исследования по изучению влияния соотношения компонентов основа : отвердитель (ПДМС Sylgard[®] 184) на смачивание поверхности до и после обработки кислородной плазмой показали, что через 2 часа после обработки у образцов с соотношением основа : отвердитель 10:1 и 20:1 наблюдался наименьший угол смачивания. Восстановление гидрофобных свойств при нормальных условиях происходит быстрее у образцов соотношением основа : отвердитель 3:1, 5:1 и 20:1. Термическая обработка при 200 °С в течение 1 часа позволяет восстановить гидрофобные свойства всех образцов ($\Theta > 92^\circ$), а для восстановления исходных свойств каналов готового МФЧ необходимо выдержать его при температуре ~80 °С, по крайней мере, в течение 4 часов.

Проверка возможности придания поверхности гидрофильных свойств при обработке ПДМС раствором «пиранья», а также сочетание данного раствора с последующей обработкой в 1 М растворе КОН показали, что полученные значения краевых углов, не достигают указанных в работе [138]. Экспериментально было продемонстрировано, что обработка раствором «пиранья» соединяемых пластин может быть применена для герметизации МФЧ из ПДМС и стекла.

Способы обработки поверхности ПДМС (Sylgard[®] 184) 1% водным раствором поливинилового спирта; 3% водным раствором Kolliphor[®] P 188; 4% водно-спиртовым раствором 3-(метакрилоилокси)-пропилтриметокси-силана позволяют достигнуть гидрофильных свойств поверхности, но в зависимости от выбранного способа обеспечивается разная стабильность приобретаемых свойств во времени. Применение химии силанов позволяет обеспечить стабильность гидрофильных свойств поверхности (по крайней мере, 6 дней) и может быть использована для последующего создания функциональных слоев.

Метод БИК-спектрометрии может применяться для контроля способов обработки ПДМС, поскольку в материале имеется большое число метильных групп ($-\text{CH}_3$), а во всех методах физико-химической обработки происходят трансформации с этими группами. Анализ спектров светопропускания в зависимости от разных вариантов обработки поверхности ПДМС показал, что наибольшее изменение светопропускания (относительно исходного образца) наблюдается на длинах волн 2374 и 2296 нм. Таким образом, эти длины волн могут использоваться при сравнении методов обработки поверхности ПДМС.

Исследования спектральных зависимостей светопропускания материалов показали, что интеграция пленок ПО и ЦОС в ПДМС не приводит к существенному изменению пропускания в области длин волн от 400 до 850 нм. Для композиции КРЕОЛ пропускание более 85% зарегистрировано при длинах волн свыше 300 нм, у эластомера Lasil T-4

пропускание 85% наблюдается от 540 нм. Уровень светопропускания свыше 85% наблюдается у эпоксидных компаундов ПЭО-510КЭ и ПЭО-221К на длинах волн более 385 нм, у Resine R123 – свыше 445 нм. Компаунды ПЭО-510КЭ и ПЭО-221К имеют светопропускание в области от 300 до 800 нм, сравнимое с пропусканием ПДМС. Все исследованные материалы и конструкции, за исключением Пентэласт®-712, могут применяться для микрофлюидных устройств, ориентированных на оптические методы регистрации в диапазоне от 400 до 850 нм.

Оценка уровня фоновой флуоресценции материалов при 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 пленкой ЦОС, ПЭО-221К и ПЭО-510КЭ, при возбуждении на 565 нм – ПДМС, ПДМС с пленкой ПО, при возбуждении на 545 нм – Resine R123. Эти данные могут использоваться при выборе материала МФЧ с оптической системой детектирования.

Применение эпоксидных компаундов для МФЧ позволяет создавать твердые и прочные конструкции, в которых можно управлять потоками жидкости и газа при высоком давлении, к тому же эпоксидные материалы не обладают паропроницаемостью. Контроль отверждения эпоксидных компаундов может проводиться методами БИК-спектроскопии по изменению поглощения на длинах волн, соответствующих поглощению эпоксидных групп и первичных аминов. Полученные в результате исследований отверждения ПЭО-221К спектральные зависимости относительного светопропускания (на длинах волн 2208 нм и 1650 нм) при температурах 60 и 80 °С свидетельствуют, что в случае выдержки образца при температуре 80 °С отверждение происходит примерно за 120 мин, а при температуре 60 °С – за время не менее 4 часов. Повышенная температура отверждения не влияет на оптические свойства материала.

Таким образом, полученные результаты проведенных исследований оптических и физико-механических свойств материалов полимеров, позволяет сделать вывод о перспективности применения эпоксидного компаунда ПЭО-221К и эластомера Lasil T-4 для конструкций микрочипов при их оперативном изготовлении.

3. МОДИФИКАЦИЯ МЕТОДА «МЯГКОЙ» ЛИТОГРАФИИ

Поскольку в работе рассматривается возможность получения реплик от мастер-форм (шаблонов) методом отливки, то термин «мягкая» литография будем в дальнейшем применять именно в этом контексте. При отливке используется сочетание эластичного и твердого материалов. Мастер-форма может быть создана как из эластичного, так и твердого материалов и, соответственно, реплики для МФЧ могут быть получены из твердых и эластичных материалов.

Традиционный метод фотолитографии в резистах, нанесенных на кремниевую подложку, позволяет изготовить мастер-форму с которой может быть получено ограниченное число реплик, примерно 50-70 штук. При отработке новых методик анализа, такое число изделий не достаточно для набора необходимой статистики. Создание дополнительных мастер-форм связано с определенными затратами, так как их изготовление требует применения высокоточных технологий и условий чистых помещений. Кроме того, повторно созданная мастер-форма будет отличаться от ранее изготовленной, так как существуют технологические погрешности при формировании микроструктур, разброс толщин фоторезиста при нанесении слоя и другие погрешности. Поэтому актуальными являются: 1) определение возможности и способов продления ресурса исходной мастер-формы; 2) поиск альтернативных способов создания мастер-форм для изготовления МФЧ.

Одним из вариантов увеличения ресурсов исходной негативной мастер-формы из кремния и фоторезиста (Si/SU-8) является получение промежуточных эластомерных реплик, которые используются для создания твердых мастер-форм из эпоксидных компаундов (Рисунок 3.1, а). С этих мастер-форм затем формируются реплики для МФЧ из эластомеров.

Существует также возможность применения позитивной мастер-формы (Si/SU-8), когда с нее формируются эластомерные мастер-формы для изготовления твердых реплик для МФЧ (Рисунок 3.1, б). Такой подход расширяет возможности метода, позволяя изготавливать МФЧ из твердых материалов.



Рисунок 3.1 – Стадии изготовления отпечатков структур для МФЧ из эластомерных материалов и эпоксидных компаундов в зависимости от исходной кремниевой мастер-формы: а – на основе негативного фоторезиста, б – на основе положительного фоторезиста

Основные стадии изготовления МФЧ с использованием «мягкой» литографии поясняются на Рисунке 3.2. Мастер-форму, расположенную в чашке Петри, заливали жидким раствором ПДМС (Рисунок 3.2, 1). В исследованиях применяли двухкомпонентный набор Sylgard[®] 184, состоящий из основы и отвердителя, которые смешивали в необходимой пропорции по инструкции производителя. Затем осуществляли дегазацию полимера для устранения растворенного газа. После этого происходило отверждение полимера в течение 4 часов при 65 °С (Рисунок 3.2, 2). Полученные реплики отделяли от мастер-формы (Рисунок 3.2, 3), в них формировали отверстия для гидравлических интерфейсов (капилляров) (Рисунок 3.2, 4). Герметизацию микроструктур осуществляли при соединении ПДМС-реплики с защитной пластиной из ПДМС или стекла (Рисунок 3.2, 6) после обработки соединяемых элементов высокочастотной плазмой (13,56 МГц) в среде кислорода (Рисунок 3.2, 5) на установке Denier Zepto (Denier electronic GmbH, Германия).

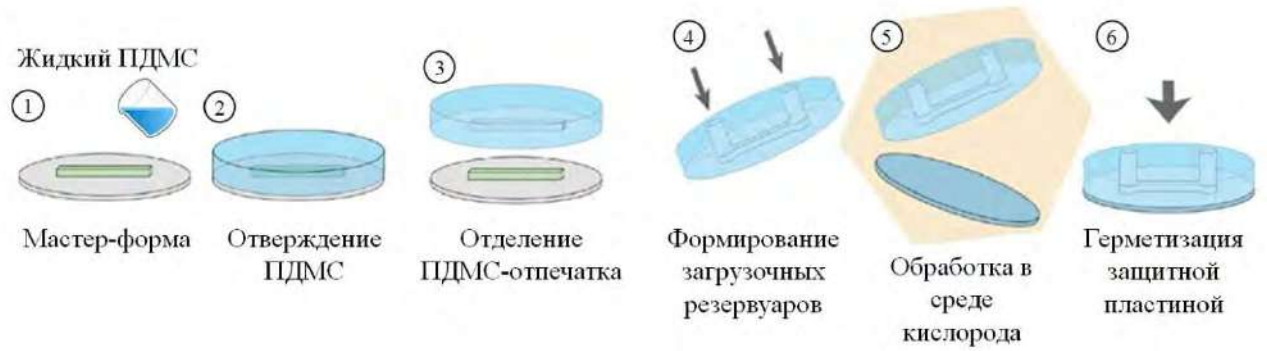


Рисунок 3.2 – Основные стадии изготовления микрофлюидного чипа из полидиметилсилоксана методом «мягкой» литографии

Предлагаемые подходы по модификации метода «мягкой» литографии основаны на использовании разных материалов мастер-форм: а) кремния со слоем фоторезиста (Si/SU8) и б) металлов. На Рисунке 3.3 приведены основные стадии получения реплик из эластомерных материалов и эпоксидных компаундов на основе указанных мастер-форм. Такой подход с одной стороны предполагает увеличение количества стадий изготовления, но при этом расширяет возможности традиционного метода и существенно увеличивает ресурс исходной мастер-формы из кремния и фоторезиста. В случае применения металлической мастер-формы число стадий не увеличивается. В этом состоит модификация метода традиционной «мягкой» литографии.



Рисунок 3.3 – Модификация метода «мягкой» литографии

3.1. Изготовление мастер-формы из кремния и фоторезиста методами фотолитографии

В СПб НИ АУ РАН были изготовлены мастер-формы из кремния и фоторезиста SU-8 методом фотолитографии: 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 для амплификации нуклеиновых кислот. Эскиз топологии мастер-формы с тестовыми структурами приведен на Рисунке 3.4, с реакционными камерами – на Рисунке 3.5.

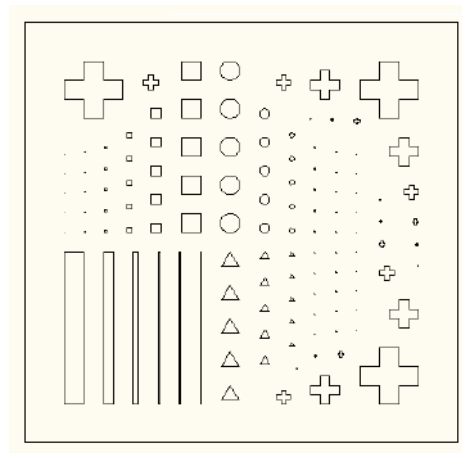


Рисунок 3.4 – Топология мастер-формы с тестовыми структурами

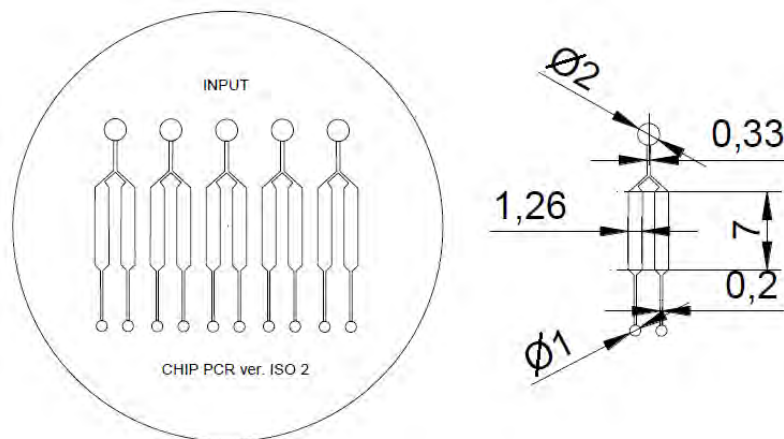


Рисунок 3.5 – Эскиз топологии мастер-формы с 5-ю парами реакционных камер для амплификации нуклеиновых кислот

Стандартная процедура изготовления мастер-формы заключается в создании микроструктур на поверхности УФ-чувствительного резиста методом фотолитографии.

Наиболее распространенным резистом для мастер-форм является негативный фоторезист SU-8 (MicroChem Inc., США) на основе эпоксидной смолы, в котором можно сформировать многослойные микроструктуры высотой от 1 до 500 мкм с аспектным соотношением более 10 (отношение толщины резиста к минимальному латеральному размеру структуры) [145].

Изготовление фотошаблона осуществлялось на установке лазерной литографии DWL 66FS (Heidelberg Instruments Mikrotechnik GmbH, Германия) с разрешением ± 1 мкм. Заготовками для фотошаблонов являлись стеклянные пластины толщиной 1 мм со слоем хрома (~100 нм) и фоторезиста AZ 1505 (Microchemicals GmbH, Германия) толщиной ~800 нм. Для формирования микроструктур на кремниевой подложке использовали резисты SU-8 2025 и SU-8 2075 (MicroChem Corp., США), которые наносили на подложку с помощью центрифуги Delta 6 RC (SUSS MicroTec, Германия), а затем подвергали отжигу при температуре 95 °С в течение 7-60 мин в зависимости от толщины слоя. Экспонирование нанесенного на кремниевую подложку резиста SU-8 проводили методом контактной фотолитографии на установке MJB4 (SUSS MicroTec, Германия) на длине волны 365 нм. После экспонирования следовал отжиг подложки при температуре 95 °С в течение 7-20 мин, а далее – обработка резиста в проявителе SU-8 Developer (MicroChem, США) в течение 1-20 мин с последующей промывкой подложки в изопропиловом спирте. Придание механической прочности слою фоторезиста SU-8 осуществлялось при термическом отжиге (170 °С в течение 5 мин). Подробно процесс изготовления мастер-форм изложен в работе [146]. Высоту полученных микроструктур контролировали на профилометре XP-1 (Ambios Technology Inc., США). Изображения мастер-форм из Si/SU-8 приведены на Рисунке 3.6.

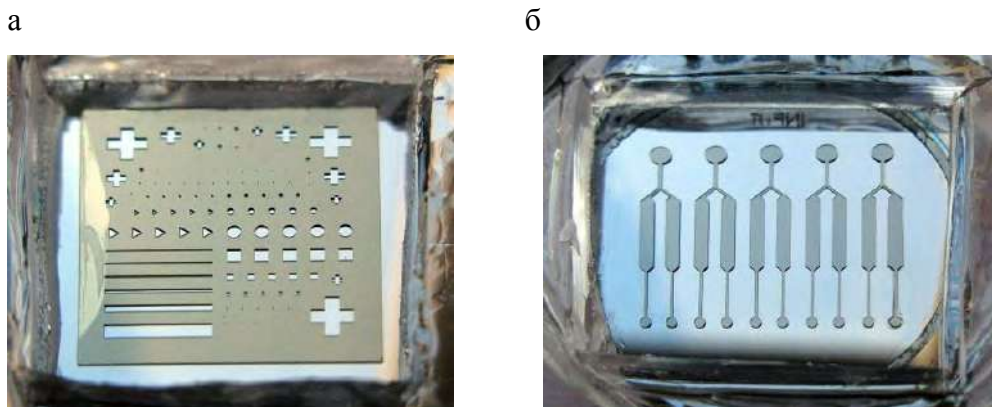


Рисунок 3.6 – Изображения мастер-форм Si/SU-8, изготовленных методом фотолитографии:
 а – с тестовыми структурами (размер 28x28 мм²); б – с реакционными камерами
 (размер 32x28 мм²)

3.2. Изготовление мастер-форм из эластомерного материала и эпоксидных смол по технологии «мягкой» литографии

Для получения заготовок МФЧ из твердых материалов (например, из фотоотверждаемых композиций, эпоксидных компаундов, термопластов) используются «вторичные» эластичные мастер-формы, полученные от исходной твердой мастер-формы (например, из кремния и позитивного резиста). Для формирования заготовок из компаундов отечественного производства (ПЭО-221К, ПЭО-510КЭ-20/0) была изготовлена «вторичная» эластичная мастер-форма из ПДМС Sylgard® 184, содержащая 5 пар реакционных камер (Рисунок 3.7, а).

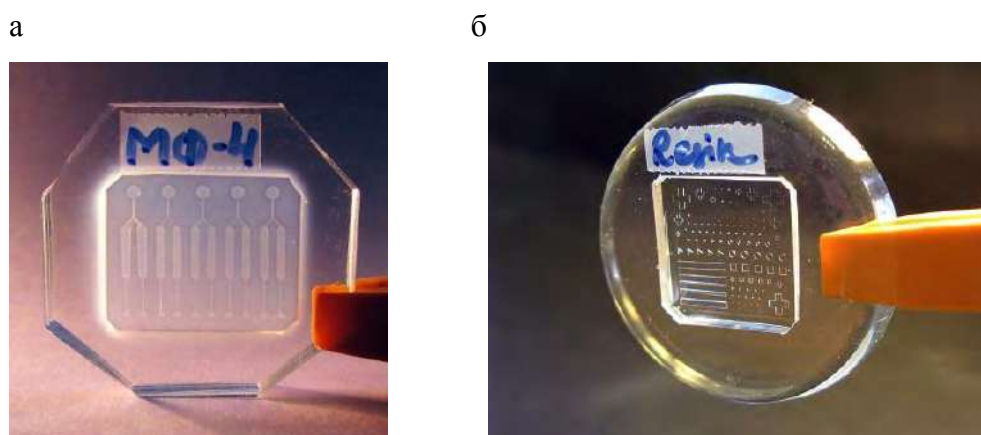


Рисунок 3.7 – Изображения мастер-форм, изготовленных методом «мягкой» литографии:

- а – из ПДМС с реакционными камерами для амплификации (размер 43x41 мм²);
- б – из эпоксидной смолы Resine Epoxy R123 с тестовыми структурами (Ø47 мм)

Особенностью изготовления данной мастер-формы являлась не прямое получение реплики штампа из кремния и фоторезиста, а использование дополнительного «промежуточного» отпечатка в ПДМС – инверсии исходной кремниевой мастер-формы. Такой подход может применяться при отсутствии мастер-формы на основе позитивного резиста. Для отделения двух реплик из одинаковых (или родственных) материалов необходимо применять разделительные слои или проводить обработку поверхности с целью уменьшения сил сцепления шаблона и реплики. Готовую эластичную мастер-форму следует обработать гидрофобизирующим реагентом – силаном или, как это было выполнено в работе, водоотталкивающим агентом Aquapel (PPG Industries, США). Для продления срока службы эластичной мастер-формы можно использовать вместо ПДМС более вязкие полимерные композиции, например, компаунд Пентэласт®-750 марки А (ООО «Силиконовые Материалы», Россия) или силиконовую резину Lasil T или T-4 (Dow Corning, Германия).

Также в качестве разделительного слоя для мастер-форм может применяться силиконовое масло (которое может использоваться и в качестве разбавителя для уменьшения вязкости смеси жидкой двухкомпонентной силиконовой резины, а также для повышения ее эластичности). После каждых 10-ти отливок (реплик) из таких материалов как полиуретан, полиэфирная и эпоксидная смола, силиконовую форму следует очистить, промыть водой с мылом, высушить, смазать силиконовой жидкостью и вытереть. Такие процедуры существенно восстанавливают разделительные свойства силиконовой формы [147].

За счет того, что ПДМС обладает пористой структурой и при использовании некоторых материалов для реплик (клеи-компаунды, эпоксидные смолы) частично впитывает их компоненты, может происходить деформация структур и самого шаблона в процессе эксплуатации. В какой-то мере этот эффект можно устранить, выбрав соответствующую толщину для мастер-формы. От одной мастер-формы из ПДМС можно получить не менее 20 реплик из эпоксидной смолы.

Другой подход заключается в использовании «вторичных» мастер-форм из клеев-компаундов и эпоксидных компаундов с целью сохранения от повреждений и разрушения исходной кремниевой мастер-формы, а также снижения стоимости получаемых МФЧ. При этом от исходной мастер-формы из кремния и фоторезиста формируется промежуточная ПДМС-реплика, которая затем заливается эпоксидным компаундом. Полученная эпоксидная мастер-форма служит для последующей репликации микроструктур в эластичных материалах. После изготовления мастер-формы необходимо осуществить обработку поверхности с целью уменьшения адгезии к полимерным композициям.

Данный подход применялся при изготовлении «вторичных» мастер-форм из эпоксидных компаундов с тестовыми структурами:

1. из клея-компаунда ПЭО-221К;
2. из клея-компаунда ПЭО-510КЭ-20/0;
3. из эпоксидной смолы Resine Epoxy R123 (Рисунок 3.7, б).

Результаты измерений рельефа поверхности компаунда ПЭО-221К, полученные на сканирующем ближнепольном оптическом микроскопе (СБОМ) ИНТЕГРА Соларис (ЗАО «НТ МДТ», Россия) в режиме поперечных сил, размер изображения $10 \times 10 \text{ мкм}^2$, показали, что при формировании отпечатка от мастер-формы из ПДМС (исходная мастер-форма из кремния и фоторезиста) образуется гладкая, оптически прозрачная поверхность с шероховатостью $R_a \approx 1-2 \text{ нм}$ (Таблица 3.1), а при формировании отпечатка от ПДМС-реплики, полученной от металлической мастер-формы, изготовленной методом лазерной полировки, наблюдается шероховатость поверхности, близкая к шероховатости

металлической мастер-формы, $R_a \approx 305$ нм. Здесь и далее в таблицах приведены значения: R_y – наибольшей высоты профиля, R_a – среднего арифметического отклонения профиля; R_z – высоты неровностей по десяти точкам, измеренных в пределах базовой длины. Оценки качества обработки могут быть проведены по величине R_a (поскольку R_a и R_z – величины взаимосвязанные, приблизительные соотношения $R_a \approx 0,25R_z$ при $R_z \geq 8$ мкм, $R_a \approx 0,2R_z$ при $R_z < 8$ мкм).

Таблица 3.1 – Изображения и характеристики поверхности образцов ПЭО-221К. (СБОМ ИНТЕГРА Соларис, режиме поперечных сил, размер изображения 10×10 мкм²)

Изображение	Характеристики
Поверхность на границе раздела (ПЭО-221К) – воздух	
	R_y 15,7 нм R_z 7,7 нм R_a 1,1 нм
Поверхность на границе раздела (ПЭО-221К) – ПДМС	
	R_y 34,3 нм R_z 15,6 нм R_a 2,0 нм
Поверхность на границе раздела (ПЭО-221К) – ПДМС (отпечаток от металлической мастер-формы)	
	R_y 2477,6 нм R_z 1243,1 нм R_a 305,3 нм

3.3. Изготовление мастер-форм из металлов методом лазерной микрообработки

Лазерная микрообработка материалов – высокотехнологичный метод, который динамично развивается в настоящее время и обладает рядом преимуществ, в частности,

высокой скоростью формирования микроразмерных структур на подложке, хорошей воспроизводимостью изготавливаемых изделий и т.д. Методом лазерной микрообработки можно формировать непосредственно структуры микрочипа в полимерных материалах или изготавливать структуры в твердых подложках (например, металлических) для мастер-форм. Металлические мастер-формы позволяют расширить ассортимент материалов для реплик, формировать микроструктуры в твердых термопластичных полимерах.

Изготовление мастер-форм с использованием методов лазерной микрообработки позволяет существенно (в несколько раз) уменьшить трудоемкость изготовления (по сравнению с методом фотолитографии) и снизить стоимость исследований. При этом размеры формируемых структур и шероховатость поверхности (на данный момент времени) уступают кремниевым технологиям: воспроизводимыми являются структуры размеров от 30-50 мкм, а шероховатость поверхности может составлять несколько микрометров. Лазерная полировка позволяет улучшить качество поверхности и при определенных технологических возможностях достигнуть шероховатости поверхности $R_a = 0,05-0,3$ мкм [148]. В процессе полировки лазерное излучение с высокой плотностью мощности перемещается над поверхностью, расплавляет тонкий поверхностный слой, сглаживание которого осуществляется за счет поверхностного натяжения. Применяется лазерная полировка с непрерывным (макро-полировка) и импульсным (микро-полировка) излучением. Типичные скорости обработки поверхности при лазерном полировании ~ 1 мин/см² для макро-полировки и $\sim 3,3$ с/см² для микро-полировки.

Лазерная микро-полировка с импульсным излучением разработана для уменьшения микро-шероховатости [149]. Наиболее важными параметрами, влияющими на шероховатость поверхности, являются плотность мощности, т.е. распределение интенсивности и длительность импульса [150]. Распределение интенсивности должно быть однородным, а длительность импульса как можно больше для получения низкой шероховатости поверхности полировки. Предполагается, что применение дополнительного лазерного луча для предварительного нагрева поверхности приводит к снижению шероховатости поверхности по сравнению с технологией однолучевой лазерной шлифовки.

В качестве материалов для мастер-форм были рассмотрены варианты применения латунных, алюминиевых и стальных сплавов, для которых хорошо отработаны методы лазерной микрообработки. Основными элементами в латунных сплавах являются медь и цинк. Для повышения износостойкости, упрочнения поверхности, придания химической стойкости на латунную поверхность можно нанести защитный слой хрома или никеля, что позволяет увеличить ресурс мастер-формы и снизить шероховатость поверхности.

Стальные сплавы обладают высокой прочностью, для их финишной обработки существуют доступные коммерческие технологии, в частности электролитно-плазменная полировка (например, [151]), позволяющая получить высокий класс чистоты поверхности для изделий из нержавеющей стали.

3.3.1. Изготовление мастер-форм из латуни методом лазерной гравировки и полировки

В ООО «Лазерный центр» (Санкт-Петербург, Россия) были изготовлены мастер-формы из латуни ЛС59-1 и Л60 (Рисунок 3.8) с использованием метода лазерной гравировки и полировки на установке Минимаркер20А4 [152] со специализированным иттербиевым импульсным волоконным лазером IPG Photonics (НТО ИРЭ Полус, Россия) с длиной волны 1,064 мкм и мощностью 20 Вт.

Изготовление осуществляли в режимах: 1) гравировки рельефа при скорости перемещения луча по поверхности 300 мм/сек, частоте следования импульсов 30 кГц и мощности 18 Вт; 2) полировки при скорости перемещения луча по поверхности 1000 мм/сек, частоте следования импульсов 100 кГц и мощности 15 Вт.

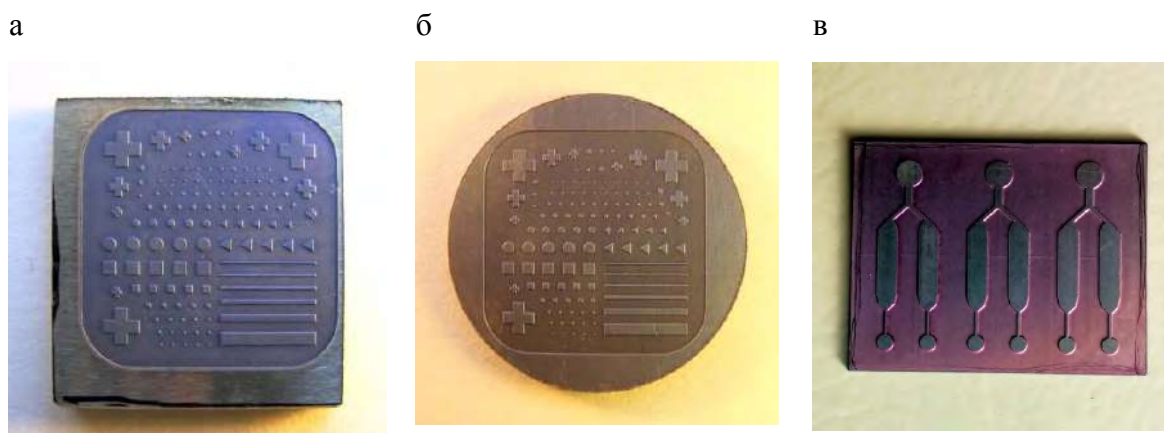


Рисунок 3.8 – Изображения мастер-форм с тестовыми структурами и структурами для реакционных камер: а – латунь Л60 (размер 25x27 мм²); б – латунь ЛС59-1 (Ø30 мм); в – латунь ЛС59-1 (размер 22x28 мм²)

В Таблице 3.2 представлены данные, полученные при измерении поверхности тестовых мастер-форм из латуни ЛС59-1 на профилометре ХР-1 (Ambios Technology Inc., США) в двух перпендикулярных направлениях (Раг и Ort) в основании (Bottom) мастер-формы и на поверхности сформированных структур (Тор). Полученные при измерениях данные свидетельствуют о наличии перепада высот в сформированных структурах, которые могут быть обусловлены неоднородностью толщины исходной заготовки. Кроме того,

наблюдаемые регулярные перепады высот, по-видимому, обусловлены движением лазерного луча по поверхности. Для измеренных мастер-форм значение Ra варьируется от 322 нм до 1440 нм.

Таблица 3.2 – Шероховатость поверхности латунной мастер-формы ЛС59-1, полученной методом лазерной гравировки и полировки

Область измерений	Ra, A				Примечание
	Образец 1	Образец 2	Образец 3	Образец 4	
Top Par	4280	14400	13859	10045	Измерения проводились для 4 образцов, в двух перпендикулярных направлениях (paral, orth) на базовой длине 1 мм, на нижней (Bottom) и верхней (Top) поверхностях структур
Top Ort	5605	6120	4356	7980	
Bottom Par	5198	6806	12197	11820	
Bottom Ort	5458	3216	6629	8034	

Для изучения топологических особенностей поверхности на наноразмерном уровне были проведены измерения мастер-форм на СБОМ ИНТЕГРА Соларис. Измерения проводились на нижнем (основание) и верхнем уровнях обработанных поверхностей для мастер-формы с реакционными камерами (Таблица 3.3) и мастер-формы с тестовыми структурами (Таблица 3.4). Средняя шероховатость поверхности, измеренная на участке $50 \times 50 \text{ мкм}^2$ составила от 224 нм до 303 нм.

Таблица 3.3 – Изображения и характеристики поверхности мастер-формы из сплава ЛС59-1 (с реакционными камерами). Режим поперечных сил, СБОМ ИНТЕГРА Соларис. Размер изображений 50x50 мкм²

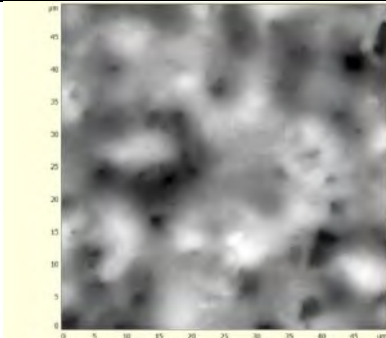
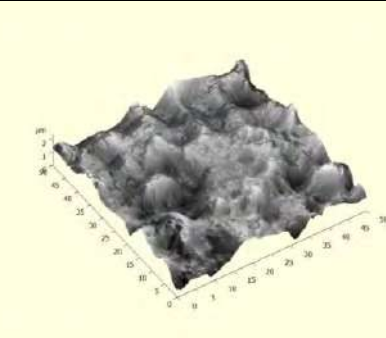
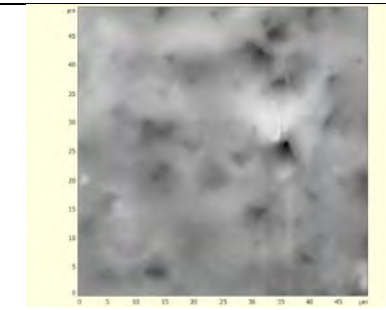
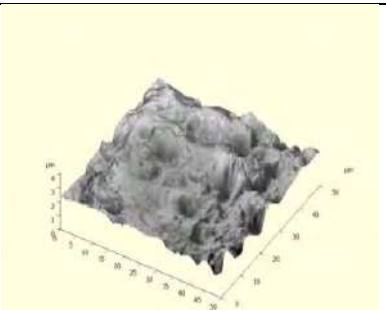
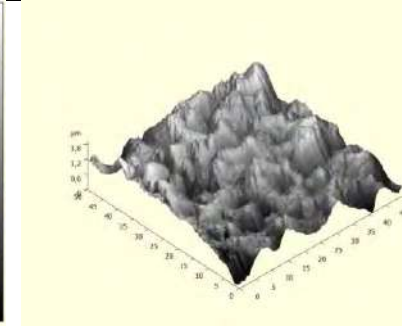
Изображения поверхности		Характеристики поверхности	
Нижняя поверхность мастер-формы			
		Ry	2392,7 нм
		Rz	1197,0 нм
		Ra	303,0 нм
Верхняя поверхность мастер-формы			
		Ry	4154,9 нм
		Rz	2110,4 нм
		Ra	285,2 нм

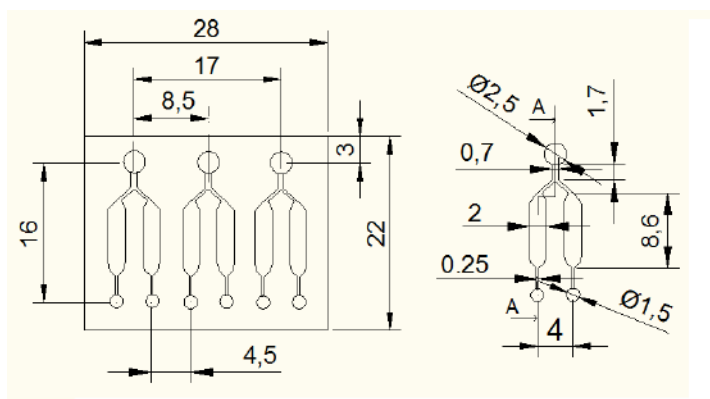
Таблица 3.4 – Изображения и характеристики поверхности мастер-формы из сплава ЛС59-1 (с тестовыми структурами). Режим поперечных сил, СБОМ ИНТЕГРА Соларис. Размер изображений 50x50 мкм²

Изображения поверхности		Характеристики поверхности	
Нижняя поверхность мастер-формы			
		Ry	2409,8 нм
		Rz	1207,8 нм
		Ra	274,2 нм
Верхняя поверхность мастер-формы			
		Ry	1946,3 нм
		Rz	977,8 нм
		Ra	223,6 нм

3.3.2. Изготовление мастер-форм из металла методом лазерной гравировки

Вариант мастер-формы для микрофлюидных чипов, предназначенных для амплификации нуклеиновых кислот в жидкости с тремя парами реакционных камер, был выполнен из алюминиевого сплава АМг6 с помощью установки лазерной гравировки «Штрих 013» [153] в АО «Научные Приборы» (Санкт-Петербург, Россия) (Рисунок 3.9). Характеристики установки: волоконный импульсный иттербиевый лазер с диодной накачкой; длина волны излучения: 1,05-1,07 мкм; частота следования импульсов: 50-1000 кГц; режимы гравировки: растровый, векторный, 3D; разрешение до 5000 dpi (~5 мкм). Время обработки на установке составило около 25 минут, без учета времени на изготовление заготовок. Верхняя поверхность заготовки была отполирована механическим способом. При лазерной гравировке формируемая поверхность имела шероховатость, которая оценивалась в несколько мкм.

а



б

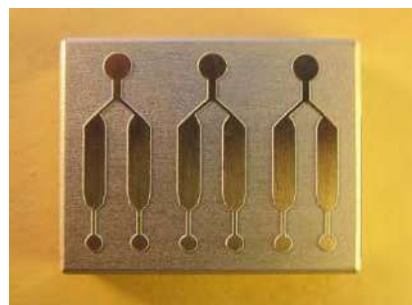
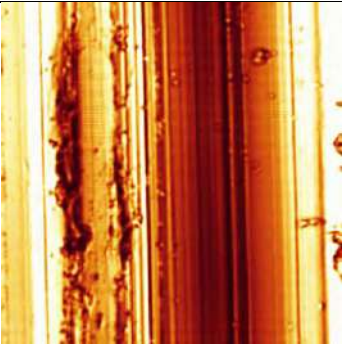
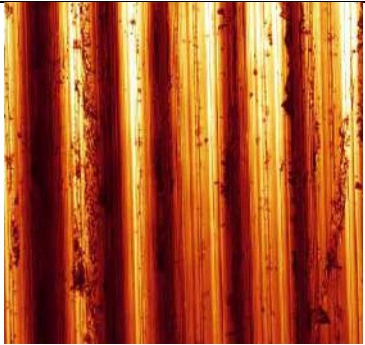
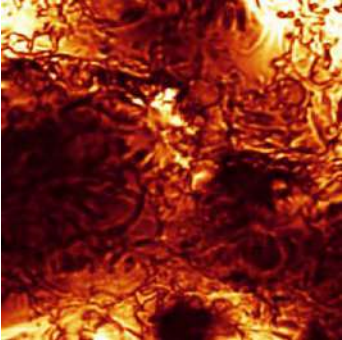
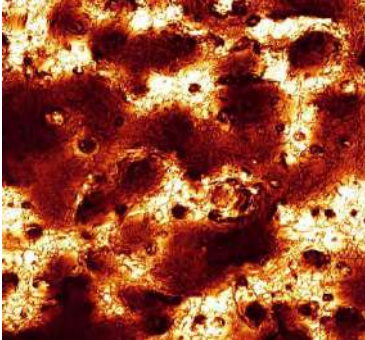


Рисунок 3.9 – а – Эскиз топологии мастер-формы МФЧ с реакционными камерами;
 б – изображение мастер-формы, изготовленной из сплава АМг-6 методом лазерной гравировки (размер 28x22 мм²), высота структур ~150 мкм

Изображения поверхности алюминиевой мастер-формы, полученное на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе (КЛСМ) Leica TCS SL в режиме отраженного света при сканировании на длине волны 488 нм приведено в Таблице 3.5. На изображении верхней поверхности наблюдаются следы механической обработки в виде полос, а на изображениях нижней поверхности – структуры, образованные при лазерной гравировке.

Для уменьшения шероховатости поверхности металлическая мастер-форма может быть подвергнута полировке. Поскольку профиль формы сложный, то круг возможных вариантов полировки сужается – электронно-лучевая, химическая, электрохимическая и электролитно-плазменная обработка поверхности.

Таблица 3.5 – Изображения поверхности мастер-формы из сплава АМг-6 (КЛСМ Leica TCS SL, 488 нм, объектив FLUOTAR HCX PL 50^x x0,55)

Размер области сканирования	
50x50 мкм ²	200x200 мкм ²
Верхняя поверхность (механическая обработка)	
	
Нижняя поверхность (лазерная гравировка)	
	

Методом лазерной гравировки также была изготовлена мастер-форма из стали марки 40Х13 (Рисунок 3.10). При лазерной обработке на формируемой поверхности образуется слой окалины, который оказывает негативное влияние на качество формируемых реплик. Этот слой снимается при электро-химической или электролитно-плазменной полировках.



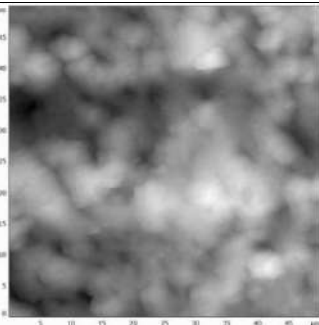
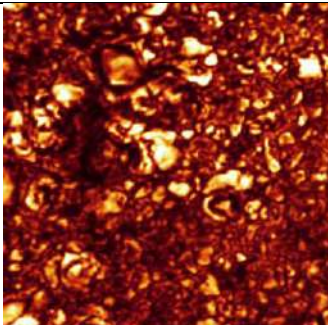
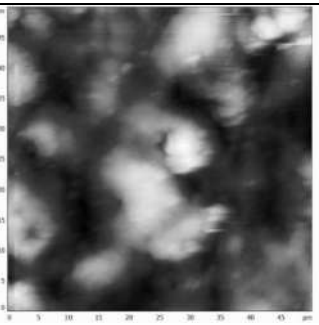
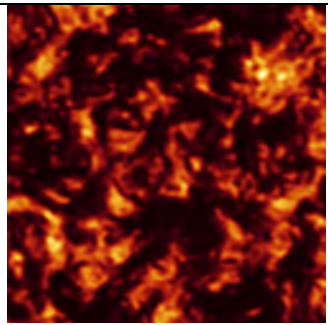
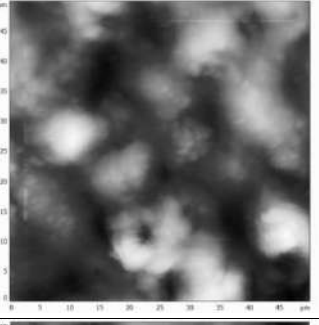
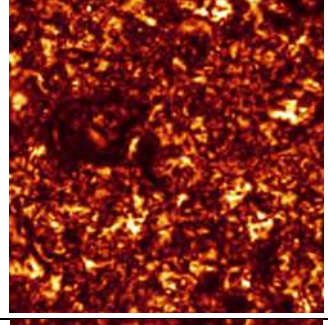
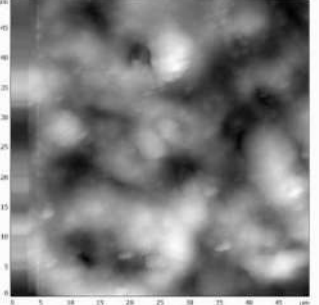
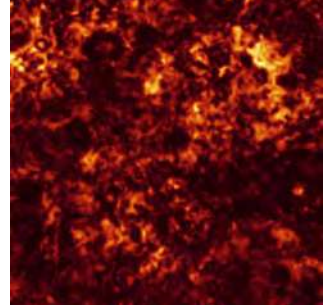
Рисунок 3.10 – Изображение мастер-формы из стали 40Х13, изготовленной методом лазерной гравировки (размер 28x22 мм²), высота структур ~150 мкм

3.3.3. Электронно-лучевая обработка мастер-формы из латуни ЛС59-1

Электронно-лучевые технологии модификации поверхности материалов основаны на эффектах, наблюдающихся при взаимодействии электронных пучков с атомами и электронами твердого тела. Воздействие потоков энергии на материал при производстве изделий с точной геометрией и размерами приводит к оплавлению, закалке поверхностных слоев расплава и термомеханической обработке материала. При этом происходят изменения состава, структуры и свойств приповерхностного слоя, механических и физико-химических свойств материала. Электронно-лучевая обработка приводит к созданию неравновесных структурно-фазовых состояний, недостижимых при использовании традиционных технологий. Электронно-лучевые технологии позволяют провести модификацию поверхности материала без изменения объемных свойств, обрабатывать локальные участки поверхности с минимальными воздействиями на геометрию образца и термическими напряжениями. К параметрам, определяющим результат воздействия на материалы, относят мощность (плотность мощности) падающего потока, его характер (импульсный, непрерывный), время воздействия на образец, характеристики среды, в которой осуществляется обработка образца, и температура образца. Поток энергии приводит к нагреву и оплавлению металлической поверхности образца, имплантации атомов, изменению элементного и фазового состава поверхностного слоя, изменению топографии поверхности и т.д.

В экспериментах по радиационной обработке металлических мастер-форм ускоренными электронами на воздухе (ускоритель электронов РТЭ-1В) изучалась возможность снижения неоднородности и шероховатости поверхности мастер-формы из ЛС59-1. Поглощенные дозы составили 300 и 500 КГр. До и после обработки поверхность мастер-формы исследовалась на КЛСМ Leica TCS SL (режим отраженного света, длина волны 488 нм, объектив FLUOTAR HCX PL 50^x x0,55), СБОМ ИНТЕГРА Соларис (режим поперечных сил) и растровом электронном микроскопе Quanta Inspect с приставкой рентгеновского микроанализа EDAX (фирмы FEI). Результаты отдельных измерений представлены в Таблице 3.6.

Таблица 3.6 – Изображения и характеристики поверхности мастер-формы из латуни LC59-1 до и после лучевой обработки, полученные на СБОМ ИНТЕГРА Соларис и КЛСМ Leica TCS SL. Размер изображений 50x50 мкм²

СБОМ ИНТЕГРА Соларис		КЛСМ Leica TCS SL	
Исходный образец			
	Ry 2608,4 нм Rz 1300,5 нм Ra 324,5 нм		
Электронно-лучевая обработка 300 КГр			
	Ry 2329,7 нм Rz 1164,7 нм Ra 332,8 нм		
Электронно-лучевая обработка 500 КГр			
	Ry 2452,0 нм Rz 1231,7 нм Ra 308,01 нм		
	Ry 1809,7 нм Rz 902,1 нм Ra 279,7 нм		

Полученные результаты свидетельствуют, что при электронно-лучевом воздействии наблюдается снижение шероховатости поверхности с $Ra = 325$ нм (до обработки) до $Ra = 280-308$ нм (после обработки 500 КГр). В Таблице 3.6 представлены примеры

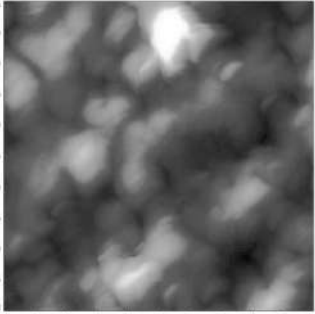
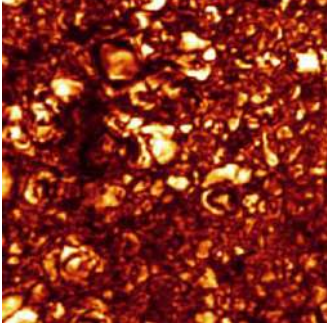
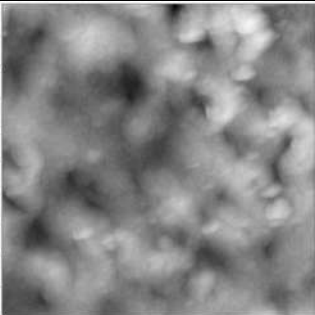
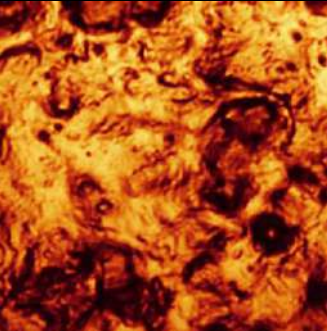
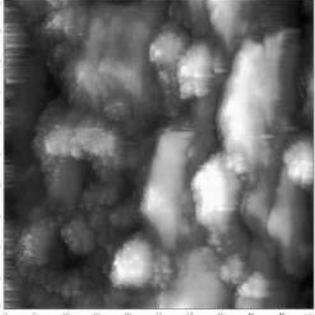
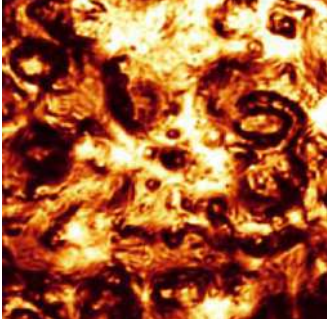
измерений, которые проводились, по крайней мере, на 3-4 участках поверхности. При всех измерениях для дозы 500 КГр наблюдалась *тенденция* к снижению шероховатости. На изображениях, полученных на КЛСМ, выявлено изменение структуры поверхности уже при 300 КГр. Электронно-лучевое воздействие приводит к модификации поверхности, изменению фазового и элементного состава, что следует из электронных спектров, представленных на Рисунках Б.1 – Б.3 Приложения Б. Так воздействие электронных потоков с высокой энергией приводит к появлению С и α -Си.

3.3.4. Исследование возможности улучшения качества поверхности металлических мастер-форм методами магнетронного напыления и электролитно-плазменного полирования

Нанесение слоя хрома методом магнетронного напыления

Снижение шероховатости металлической мастер-формы после лазерной полировки может быть достигнуто за счет нанесения на поверхность защитного слоя хрома или никеля. С помощью установки высокочастотного магнетронного напыления Auto 500 RF (Woc Edwards, Великобритания) в Лаборатории возобновляемых источников энергии СПб НИ АУ РАН (к.ф.-м.н. Мухин И.С.) на поверхность латунной мастер-формы ЛС59-1 с тестовыми структурами было нанесено покрытие хрома толщиной около 100 нм. Измерения рельефа поверхности мастер-формы, проведенные на СБОМ ИНТЕГРА Соларис в режиме поперечных сил, свидетельствуют об уменьшении средней шероховатости до величины ~ 182-237 нм (Таблица 3.7). Изображения поверхности мастер-формы, полученные на КЛСМ Leica TCS SL в режиме отраженного света (488 нм, объектив FLUOTAR HCX PL 50^x x0,55) также свидетельствуют об изменении рельефа поверхности – сглаживании неоднородностей.

Таблица 3.7 – Изображения и характеристики поверхности мастер-формы ЛС59-1 с тестовыми структурами после напыления слоя хрома ~100 нм. Размер изображений 50x50 мкм²

СБОМ ИНТЕГРА Соларис		КЛСМ Leica TCS SL	
Исходный образец			
	Ry 2409,8 нм Rz 1207,8 нм Ra 294,5 нм		
После нанесения слоя хрома (100 нм)			
	Ry 2237,0 нм Rz 1137,9 нм Ra 236,9 нм		
	Ry 1311,1 нм Rz 646,7 нм Ra 181,9 нм		

Электролитно-плазменная обработка поверхности

Одной из современных технологий полировки поверхности является электролитно-плазменная полировка, позволяющая при соответствующей подготовке изделия достигнуть качества зеркальной поверхности на металлических образцах. Данный метод позволяет обрабатывать изделия со сложной поверхностью и микроразмерными структурами.

При электролитно-плазменной полировке обрабатываемое изделие является анодом, а катодом – пространство рабочей ванны с электролитом. При напряжении свыше 200 В вокруг анода образуется паро-плазменная оболочка и на обрабатываемой поверхности наблюдаются импульсные электрические микроразряды. Комплексное воздействие на

поверхность изделия химически активной среды и электрических разрядов приводит к очистке и полированию поверхности [154]. Такой вид обработки также выгоден с точки зрения безопасности производства, так как при обработке поверхностей металлов используются водные растворы солей с концентрацией ниже 10%.

В Санкт-Петербурге доступной оказалась технология электролитно-плазменной полировки нержавеющей стали (ООО «АЦИА» – Ассоциация центров инжиниринга и автоматизации) и для проверки этой технологии были изготовлены мастер-формы из нержавеющей стали 40X13 в АО «Научные Приборы». Полировку проводили в течение 8 мин при стандартных условиях. Изображения мастер-формы до и после полировки приведены на Рисунке 3.11.

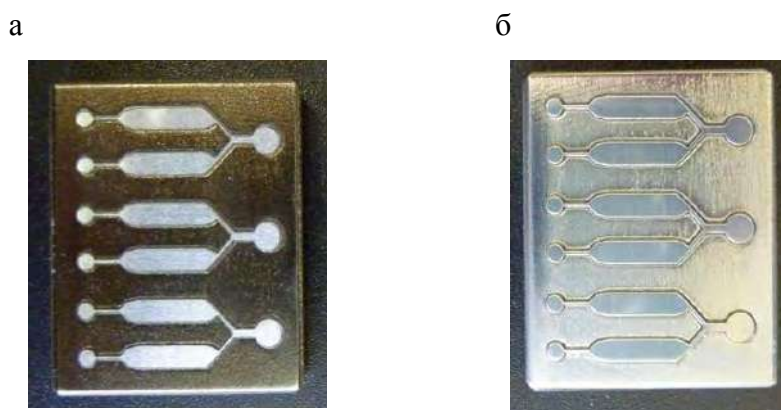


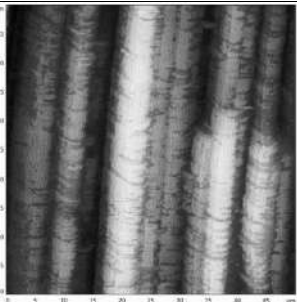
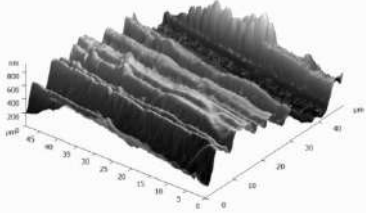
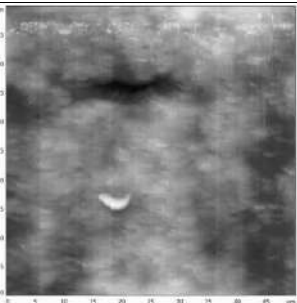
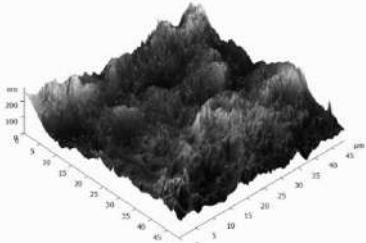
Рисунок 3.11 – Изображения мастер-формы из нержавеющей стали 40X13 до (а) и после (б) электролитно-плазменной полировки

С использованием индикатора часового типа ИЧ 0-10 (ГОСТ 577-68) были проведены измерения высоты структур мастер-формы до и после полировки. До полировки высота составила $H_{init} = 195 \pm 5$ мкм, после – $H_{pol} = 208 \pm 5$ мкм. Такой эффект можно объяснить тем, что, по-видимому, обработка поверхности, подверженной термическому влиянию лазерного излучения, происходит более интенсивно, чем обработанная механически. Однако для более определенных выводов необходимо проведение дополнительных исследований. Для устранения неравномерности такой обработки следует либо все поверхности одинаково обработать и/или выбрать режимы лазерной обработки без образования слоя окалины.

Рельеф поверхности мастер-формы из стали до и после электролитно-плазменной обработки был изучен с помощью СБОМ ИНТЕГРА Соларис, результаты измерений представлены в Таблице 3.8. Отметим, что в связи с большой шероховатостью поверхности после лазерной обработки нижнюю поверхность мастер-формы измерить методом СБОМ не удалось – шероховатость поверхности превышала $Ra > 1500$ нм. В Таблице 3.8 приведены

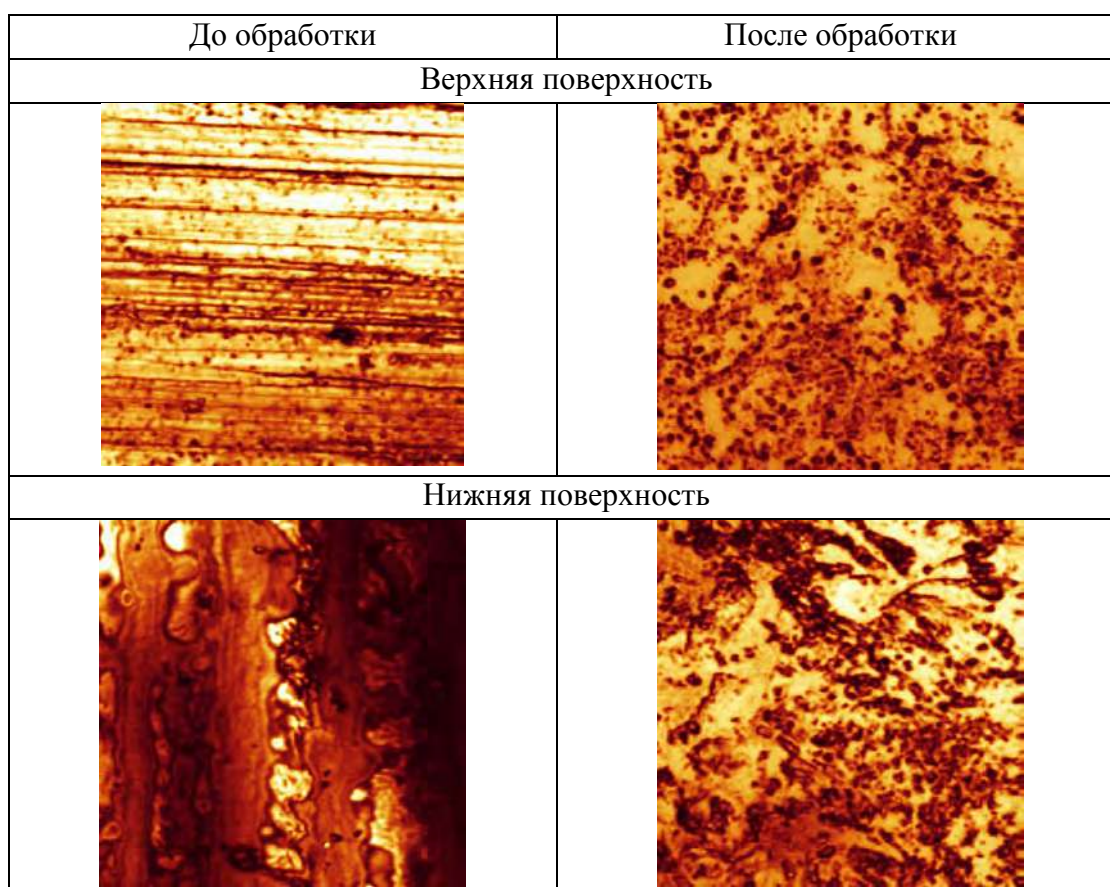
данные для исходного образца, измеренные на поверхности подвергнутой механической полировке. После электролитно-плазменной обработки шероховатость поверхности $Ra = 33-50$ нм, что в несколько раз меньше, чем исходная величина. После обработки практически не наблюдается регулярность (волнистость) структур, обусловленная как механической обработкой, так и перемещением лазерного луча.

Таблица 3.8 – Изображения и характеристики поверхности мастер-формы из стали 40X13 до и после электролитно-плазменной полировки. СБОМ ИНТЕГРА Соларис, режим поперечных сил. Размер изображений 50×50 мкм²

Изображения		Характеристики
Исходный образец		
		R_{max} 739,2 нм Rz 369,0 нм Ra 174,8 нм
После электролитно-плазменной полировки		
		R_{max} 697,5 нм Rz 349,1 нм Ra 46,2 нм

Изображение поверхности мастер-формы из нержавеющей стали 40X13 до и после электролитно-плазменной обработки, полученные на КЛСМ Leica TCS SL и приведенные в Таблице 3.9, также свидетельствуют об изменении рельефа поверхности – сглаживании и появлении новой структуры на поверхности.

Таблица 3.9 – Изображение поверхности мастер-формы из стали 40X13 до и после электролитно-плазменной обработки (КЛСМ Leica TCS SL, 488 нм, объектив FLUOTAR HCX PL 50^x x0,55, размер изображений 50x50 мкм²)



3.4. Контроль функционально-значимых размеров микроструктур мастер-форм и реплик

Важной характеристикой при использовании мастер-форм является точность репликации микроструктур. Вариант получения отпечатка (реплики) ПДМС с мастер-формы из Si/SU-8 достаточно хорошо изучен. В данной работе исследовались структуры, полученные в:

1. мастер-форме из латуни Л60;
2. отпечатке ПДМС Sylgard[®] 184 от мастер-формы из латуни Л60;
3. мастер-форме из латуни ЛС59-1;
4. отпечатке ПДМС Sylgard[®] 184 от мастер-формы из латуни ЛС59-1;
5. отпечатке ПДМС Sylgard[®] 184 от мастер-формы из Si/SU-8;
6. мастер-форме из ПЭО-221К;
7. отпечатке ПДМС Sylgard[®] 184 от мастер-формы из ПЭО-221К №1;

8. отпечатке ПДМС Sylgard[®] 184 от мастер-формы из ПЭО-221К №10;
9. мастер-форме из ПЭО-510КЭ-20/0;
10. отпечатке ПДМС Sylgard[®] 184 от мастер-формы из ПЭО-510КЭ-20/0;
11. мастер-форме из Resine R123;
12. отпечатке ПДМС Sylgard[®] 184 от мастер-формы из Resine R123.

Мастер-формы поз. 6, 9 и 11 были получены с использованием промежуточной эластичной реплики из ПДМС Sylgard[®] 184. Результаты измерений микроструктур в мастер-формах и получаемых с них реплик представлены в Таблице В.1 Приложения В. Измерения проводили с использованием оптического микроскопа Leica DM4000 В LED (объектив 10x/0.30 Leica 506505). Полученные данные использовались при построении нижеприведенных графиков соответствия размеров.

Мастер-формы, изготовленные из металлических сплавов, представляют собой массив выпуклых микроструктур. В реплике эти структуры формируют каналы, «глухие» отверстия в виде конусов, треугольников и т.д. Этим объясняется различие в размерах исходной мастер-формы и отпечатка: размер отпечатка несколько больше. Следует отметить, что отклонение в размерах структур для металлических мастер-форм может являться своеобразной характеристикой воспроизводимости технологии изготовления этих структур. Линейные структуры (каналы, полосы) могут быть изготовлены методом лазерной микрообработки с отклонением около (± 2 мкм) для размеров 50-250 мкм в латунных сплавах (Л60 и ЛС59-1), 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 (кругов) (с диаметром от 90 мкм). Формирование прямоугольных и треугольных структур удовлетворительного качества методом лазерной микрообработки наблюдалось только для размеров свыше 140-150 мкм. Отметим, что ПДМС-реплики достаточно хорошо «повторяют» структуры мастер-формы, о чем свидетельствуют изображения, приведенные в Таблице В.1 Приложения В и на зависимостях, представленных на Рисунках 3.12 и 3.13.

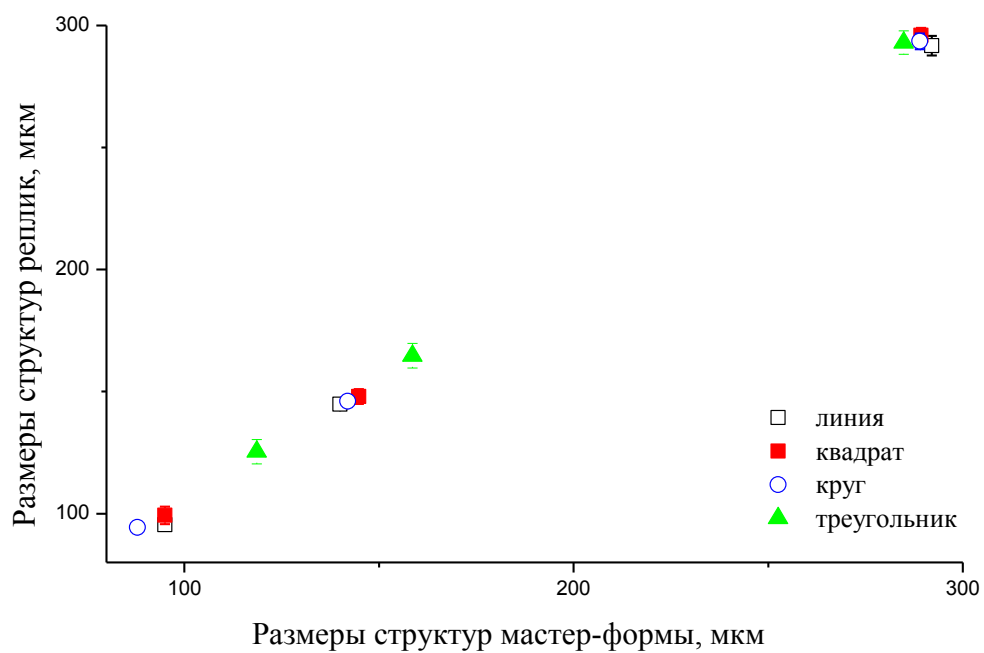


Рисунок 3.12 – Соответствие размеров микроструктур отпечатка ПДМС размерам мастер-формы из сплава Л60

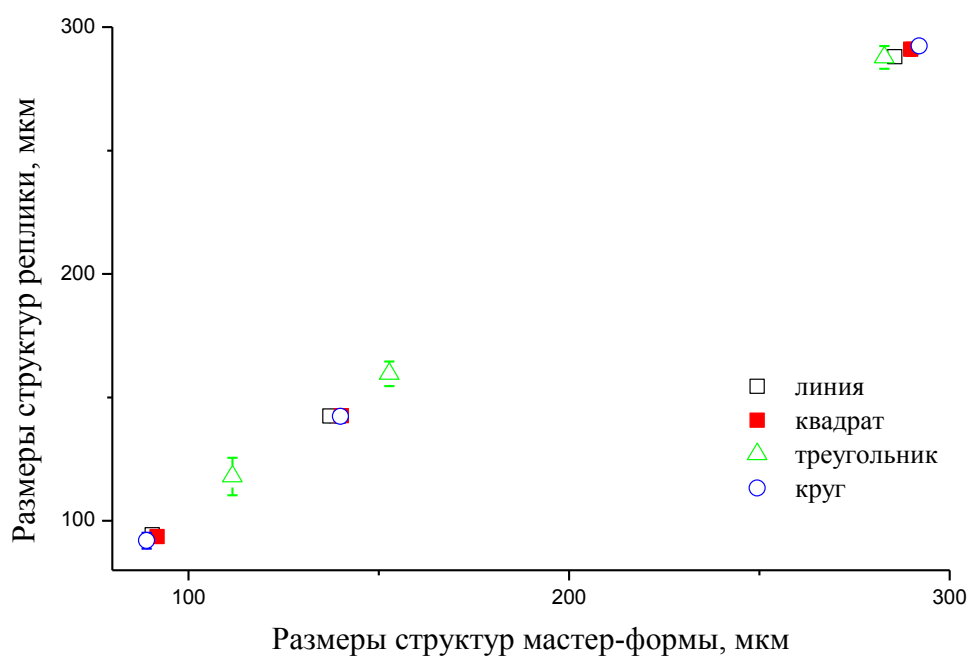


Рисунок 3.13 – Соответствие размеров микроструктур отпечатка ПДМС размерам мастер-формы из сплава ЛС59-1

Для оценки качества получаемых в ПДМС-отпечатке структур была построена зависимость отклонения размеров формируемых структур от соответствующих размеров в мастер-форме из ЛС59-1 (Рисунок 3.14). По оси ординат отложена разность:

$$y = S_{Rj} - S_{MFj}, \quad (4.1)$$

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

На зависимости (Рисунок 3.14) приведен разброс значений, наблюдаемых для каждой структуры. Из полученных данных следует, что мастер-формы из сплавов латуни наиболее подходят для МФЧ с простой топологией, содержащей линейные каналы, цилиндрические структуры (круги) с размерами от 90 мкм и структуры «квадрат».

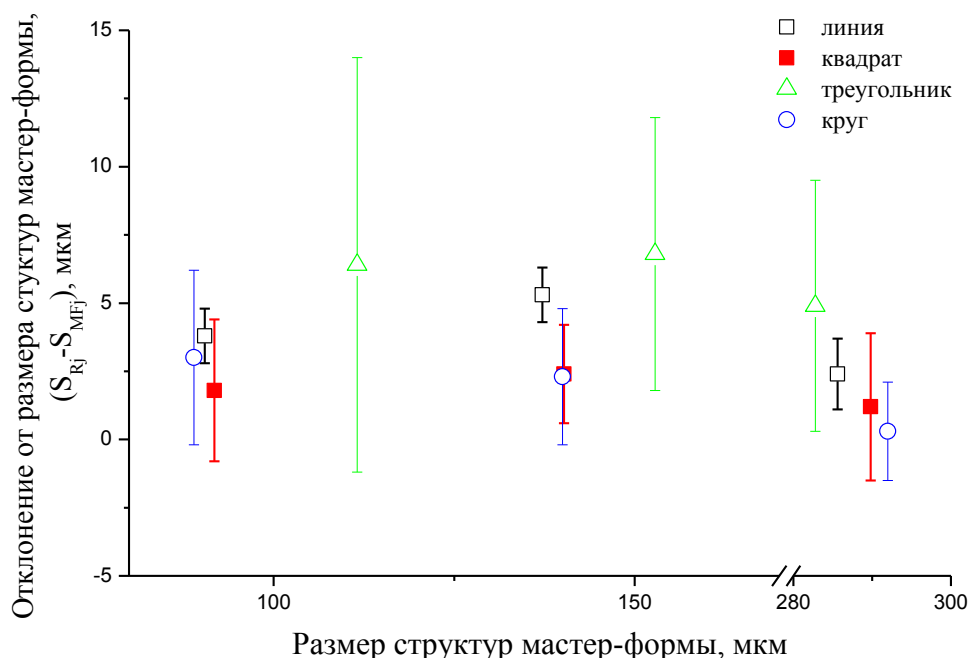


Рисунок 3.14 – Отклонения размеров микроструктур отпечатка ПДМС от соответствующих размеров структур мастер-формы из ЛС59-1

Следующие микроструктуры формировались с исходной мастер-формы (Si/SU8) с применением промежуточной эластичной реплики. Структуры в мастер-формах из ПЭО-221К, ПЭО-510КЭ, Resine R123 представляют углубления, а реплики получаемые с этих структур – выступы.

Качество мастер-формы из ПЭО-510КЭ можно оценить, как отличное, т.к. среднее квадратическое отклонение (СКО) размеров структур находится в пределах ± 1 мкм. Размеры реплики достаточно хорошо соответствуют размерам мастер-формы (Рисунок 3.15).

Линейные структуры шириной 25 мкм и 50 мкм и протяженностью свыше нескольких мм в ПДМС-реплике не удалось изготовить хорошего качества – они представляли волнообразную неравномерную линию (Таблица В.1 Приложения В). Только полоса шириной 100 мкм получилась близкой к исходному размеру и с наименьшими отклонениями. На поверхности сформированных структур наблюдается волнистость: по-видимому, эти эффекты обусловлены взаимодействием материала мастер-формы и ПДМС при его отверждении. Возможно, использование разделительных слоев позволит устранить или минимизировать влияние подобных эффектов.

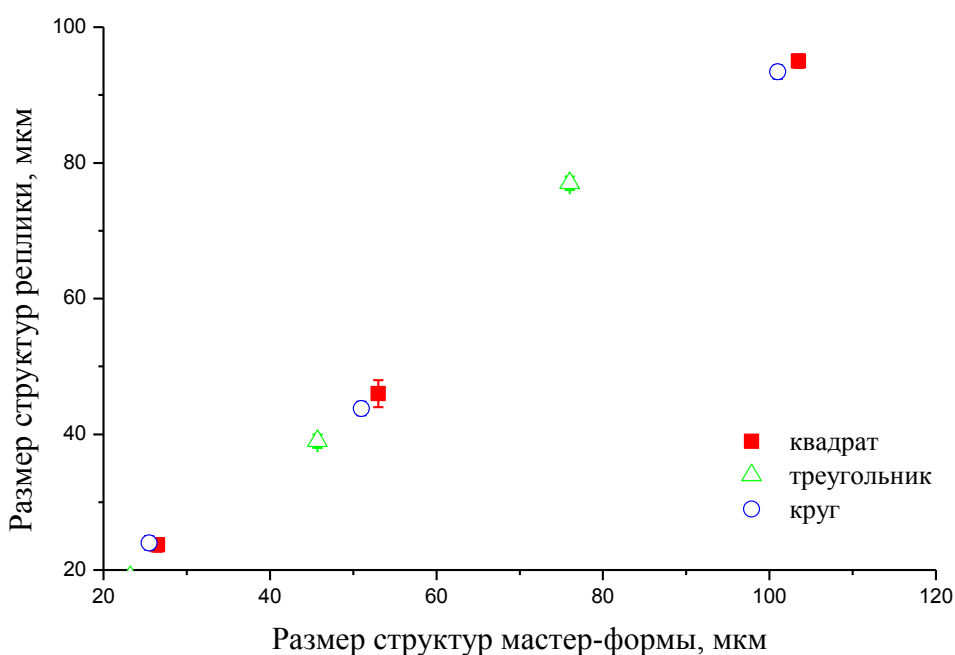


Рисунок 3.15 – Соответствие размеров микроструктур отпечатка ПДМС размерам мастер-формы из ПЭО-510КЭ

По качеству мастер-форма из Resine R123 не уступает предыдущей (ПЭО-510КЭ). Размеры структур реплики также достаточно хорошо совпадают с соответствующими размерами в мастер-форме (Рисунок 3.16). В данном случае в ПДМС хорошо формируются линейные и прямоугольные структуры, но структуры «треугольник» удовлетворительного качества получить не удалось. Наблюдались проблемы при изготовлении цилиндрических структур диаметром ~ 20 мкм.

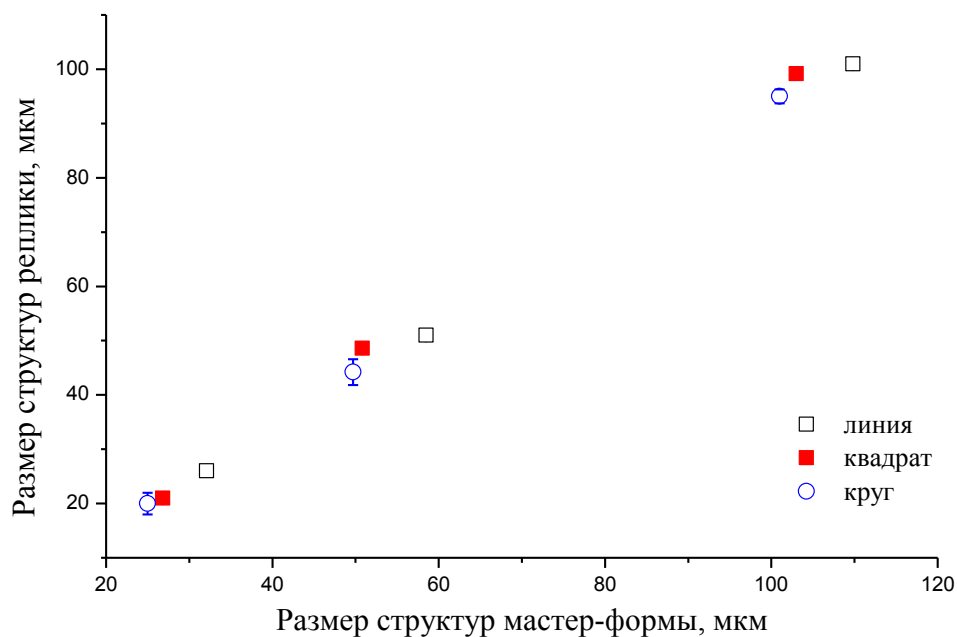


Рисунок 3.16 – Соответствие размеров микроструктур отпечатка ПДМС размерам мастер-формы из Resine R123

На Рисунке 3.17 приведена зависимость соответствия размеров микроструктур мастер-формы из ПЭО-221К размерам отпечатка ПДМС Sylgard® 184 (полученного от мастер-формы из Si/SU-8 и являющегося «промежуточной» формой для ПЭО-221К).

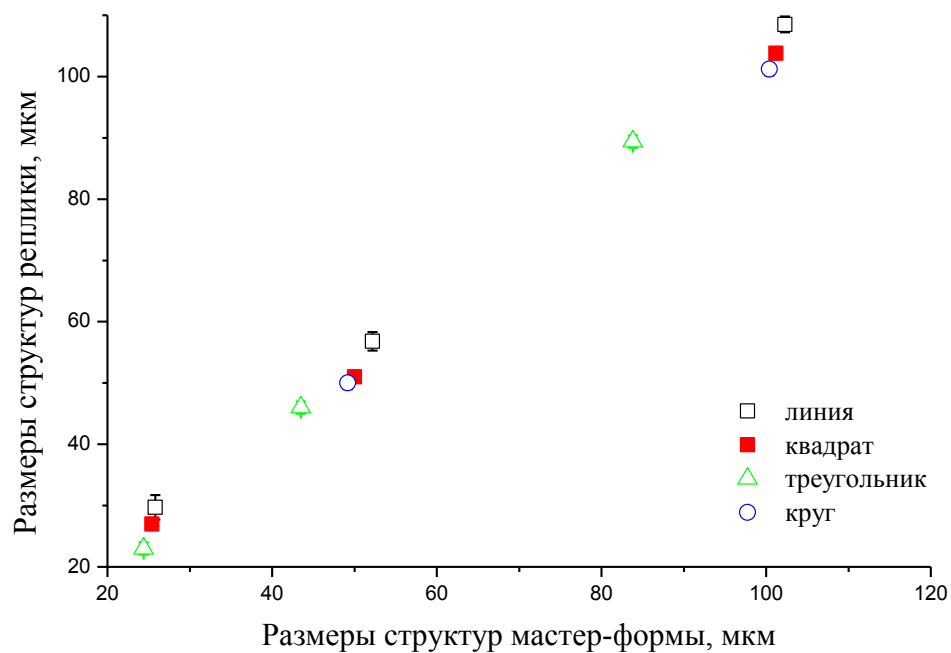


Рисунок 3.17 – Соответствие размеров микроструктур мастер-формы из ПЭО-221К размерам отпечатка ПДМС

При изготовлении мастер-формы из ПЭО-221К максимальные отклонения от размеров отпечатка ПДМС (Рисунок 3.18) наблюдались для цилиндрических структур малого диаметра (менее 25 мкм), наибольшее СКО – у линейных структур шириной 25 мкм. Линейные структуры шириной свыше 100 мкм формировались с отклонением размеров на +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.

В идеальном случае размеры структур реплики должны быть идентичны размерам соответствующих структур шаблона (мастер-формы), т.е. должна наблюдаться линейная зависимость получаемых размеров с коэффициентом пропорциональности 1. Отклонение от такой зависимости определяется способом и условиями репликации, используемыми материалами мастер-формы и реплики. Таким образом, характеристики отклонения размеров микроструктур реплики от размеров шаблона могут рассматриваться как интегральная характеристика способа репликации при сравнении различных методов.

Анализ размеров отпечатков линейных микроструктур в ПДМС от мастер-формы из ПЭО-221К (Рисунок 3.19) показал, что хотя для мастер-формы и наблюдаются отклонения от базовой ширины (для 25 мкм – от ~ 3 до ~ 7 мкм, для 50 мкм – от ~5 до ~8 мкм, для 100 мкм – от ~7 до ~10 мкм), но формируемые с ПДМС-реплики имеют отклонения менее 5 мкм и меньшее СКО, чем для мастер-формы. Причем 1-ая и 10-ая реплики имеют примерно одинаковое СКО, а отклонение от базового размера не превышает 3 мкм для выбранной линейки размеров: 25, 50 и 100 мкм. Таким образом, можно заключить, что использование мастер-формы из компаунда ПЭО-221К позволяет получать отпечатки микроструктур в ПДМС, подходящие для практического использования в МФЧ.

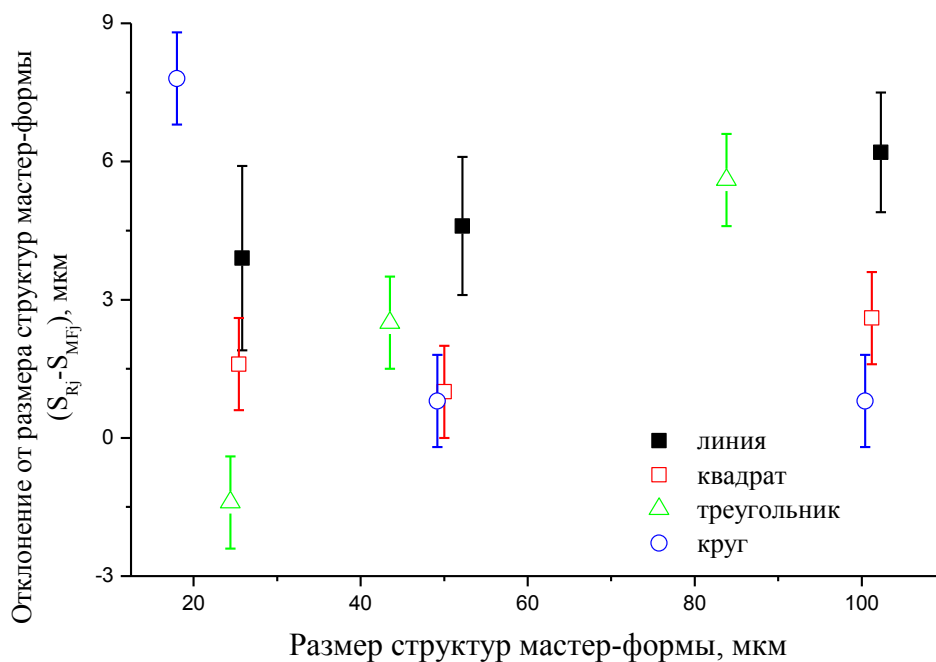


Рисунок 3.18 – Отклонения размеров микроструктур мастер-формы из ПЭО-221К от соответствующих размеров структур отпечатка из ПДМС

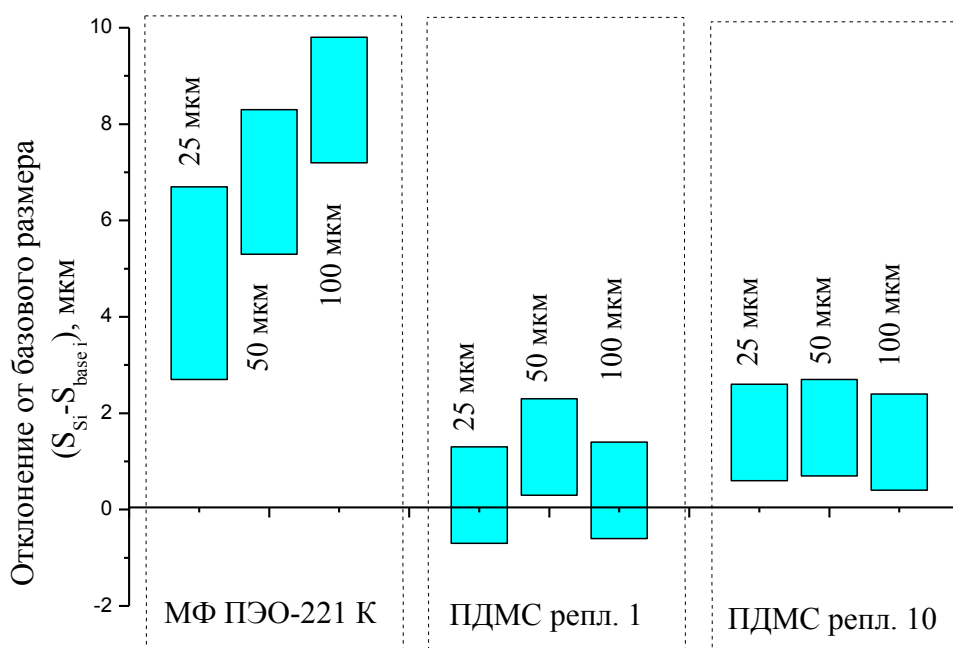


Рисунок 3.19 – Отклонения ширины линейной структуры мастер-формы из ПЭО-221К и ПДМС-реплик (1-ый и 10-ый отпечаток) от базового размера (25, 50 и 100 мкм)

3.5. Способы герметизации и контроль герметичности микрофлюидных устройств

ПДМС имеет высокую адгезию к стеклу и кремнию, поэтому обратимая герметизация микроструктур в этом полимере может осуществляться при помощи ван-дер-Ваальсовых сил. Однако такой способ связывания не рассчитан для создания МФЧ, предназначенных для работы в условиях изменения температуры или при перепадах давления в каналах чипа.

3.5.1. Герметизация микрофлюидных устройств

Необратимая герметизация может быть достигнута при обработке плазмой в среде кислорода или после химической обработки соединяемых поверхностей реплики и защитной пластины (ПДМС с ПДМС, ПДМС со стеклянной пластиной или ПММА).

Для создания герметичного соединения между стеклянной подложкой и ПДМС-отпечатком были выбраны следующие способы:

1. *Обработка в растворе «пиранья» H_2SO_4 (конц.): H_2O_2 (30%) в соотношении 3:1:*

выдерживание стекла в этом растворе в течение 10 мин приводит к тому, что поверхность материала становится супергидрофильной. Для полимера время обработки было подобрано экспериментально и составило 1 мин, т.к. при увеличении длительности обработки поверхность становилась матовой. Пластины обоих материалов обрабатывались в растворе указанное время, промывались в воде, высушивались и соединялись. Далее выдерживались 12 часов при комнатной температуре.

2. *Плазменная обработка:*

стеклянные подложки и ПДМС-реплики обрабатывали высокочастотной плазмой (13,56 МГц) в выбранной среде (аргона или кислорода при давлении ~1 мбар) в течение 3,5 и 1,5 минут соответственно. Использовалась плазменная установка Diener Zepto (Германия). После обработки стеклянная (или полимерная) подложка и ПДМС-отпечаток сразу же соединялись друг с другом, образуя неразъемное соединение.

Для герметизации МФЧ из эпоксидной смолы и стеклянной подложки использовали метод, описанный в работе [155]. Перед склеиванием отпечаток и подложку обрабатывали в этиловом спирте и высушивали. Далее на стеклянную пластину помещали отпечаток со структурами из ПЭО-221К и в образовавшийся технологический зазор вводили клеевой раствор при комнатной температуре. Затем отверждали клей под действием УФ-излучения ртутной лампы ДРШ-250 в течение 20 мин. Для «приработки» клеевого соединения герметизированные устройства выдерживали в течение 24 часов при комнатной температуре. Для склеивания использовали фотоотверждаемый клей Permabond UV630 (Permabond®)

Engineering Adhesives). Таким образом были изготовлены МФЧ, содержащие 5 пар реакционных камер.

3.5.2. Контроль герметичности микрофлюидного чипа оптическими методами

Для визуальной оценки качества соединения на границе раздела полимер-полимер, использовался метод оптической микроскопии. Соединенные детали разрезались, а срезы пластин ПДМС-ПДМС (Sylgard[®] 184) и ПДМС-Пентэласт[®]-712 изучались при помощи оптического инвертированного микроскопа Carl Zeiss Axio Obwerver.D1m (Германия) (Таблицы 3.10 и 3.11). Негерметичное соединение получали при контакте пластин друг с другом и выдерживании их в течение 4-5 часов при комнатной температуре, герметичное соединение – путем плазменной обработки пластин в среде кислорода, соединении их и выдерживании при 65 °С в течение 1 часа.

В случае негерметичного соединения на оптических изображениях явно видна граница контакта между пластинами. При герметичном соединении эта граница почти неразличима, особенно для одинаковых материалов. При соединении разных полимеров можно подобрать условия освещения исследуемой области, при которых разные материалы будут по-разному визуализироваться, но, тем не менее, четкой линии раздела между полимерами не наблюдалось.

Таблица 3.10 – Изображения сечений в местах соединения двух пленок ПДМС Sylgard® 184, полученные на оптическом микроскопе Carl Zeiss Axio Obwerver.D1m

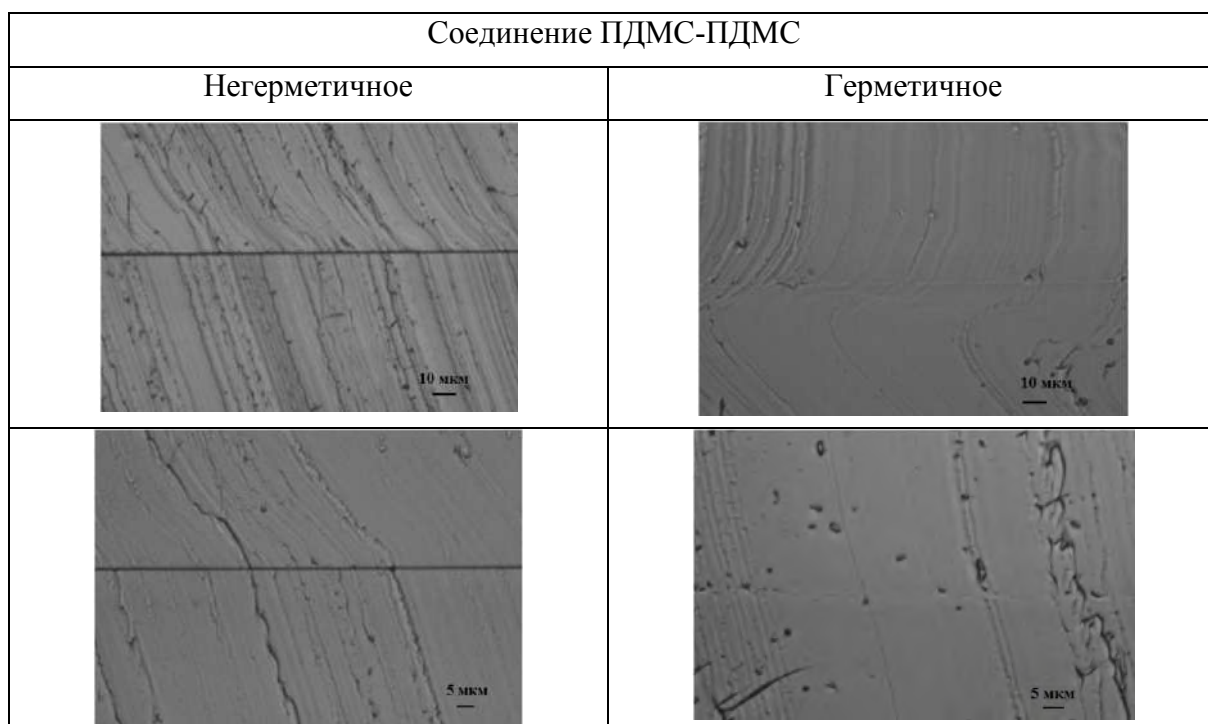
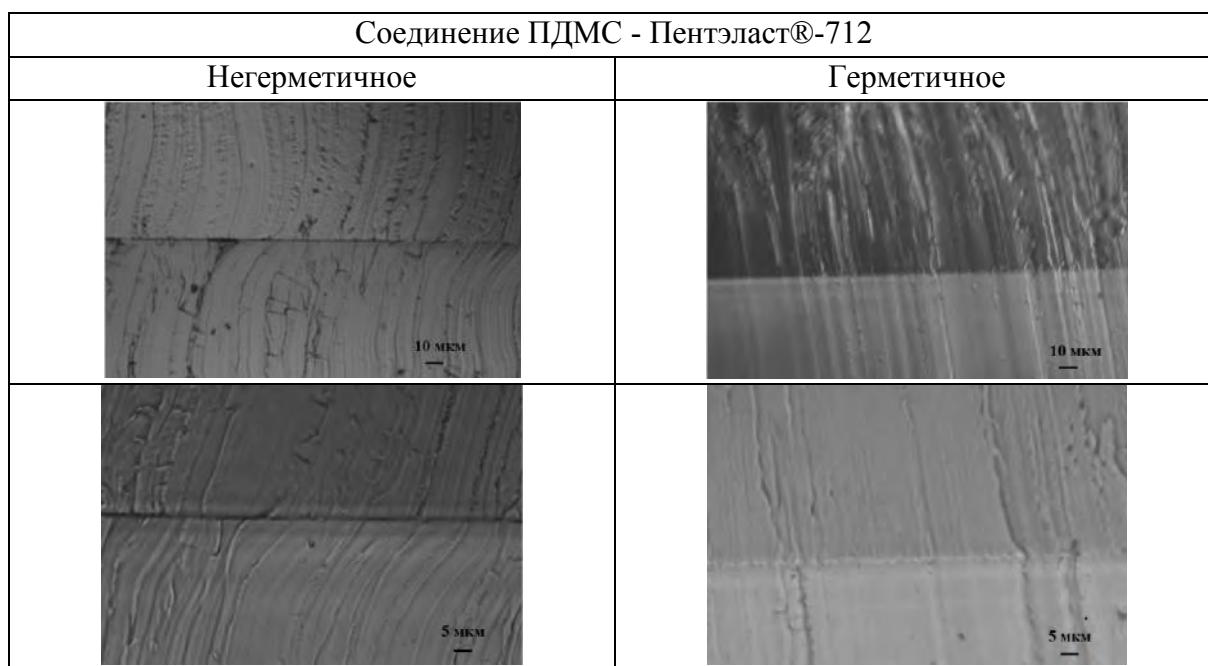


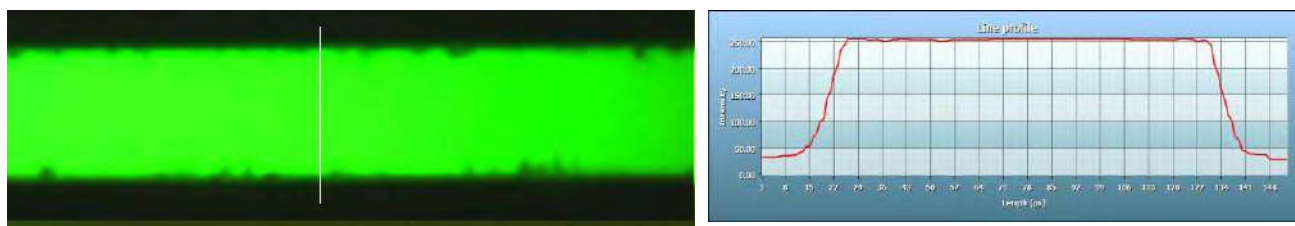
Таблица 3.11 – Изображения сечений в местах соединения полимерных пленок ПДМС Sylgard® 184 и Пентэласт®-712, полученные на оптическом микроскопе Carl Zeiss Axio Obwerver.D1m



Вариант проверки герметичности готовой конструкции МФЧ заключался в следующем: каналы МФЧ заполняли раствором флуоресцеина и на КЛСМ Leica TCS SL при возбуждении на длине волны 488 нм осуществляли регистрацию изображений (в диапазоне 520-560 нм) фрагментов каналов, заполненных раствором флуоресцеина. После этого устройство помещали на 3 часа в сушильный шкаф с температурой 90 °С, а затем снова проводили регистрацию изображений каналов с раствором флуоресцеина. Анализ распределения интенсивности флуоресценции по полученным изображениям осуществлялся с использованием программы HCSImageLive Hamamatsu Corp.

Из полученных изображений и анализа распределения интенсивности флуоресценции (Рисунок 3.20) следует, что после температурного воздействия сохраняется четкая граница раздела сред жидкость – стенки микроканала, при этом не меняется ширина области флуоресценции (распределение интенсивности флуоресценции по сечению), что свидетельствует о сохранении герметичности канала МФЧ.

а



б

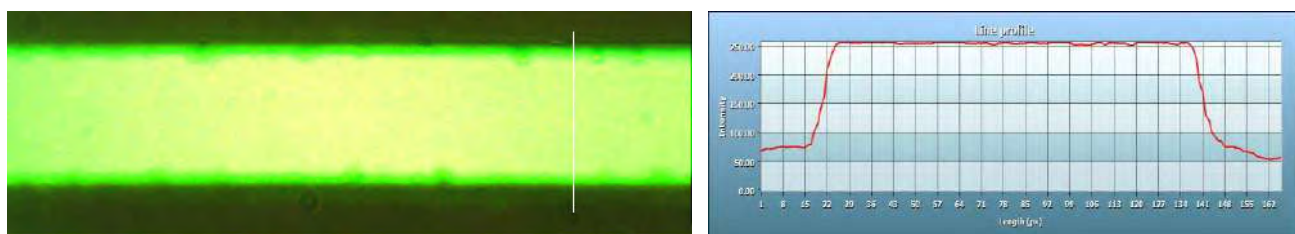


Рисунок 3.20 – Изображения фрагментов каналов с раствором флуоресцеина, полученные на КЛСМ Leica TCS SL в режиме измерений флуоресценции и распределение интенсивности флуоресценции по сечению канала (белая линия): а – до температурного воздействия; б – после выдерживания при 90 °С в течение 3 часов.

3.5.3. Проверка герметичности микрофлюидного чипа при температурном режиме изотермической амплификации

Так как в рамках данной работы исследовалась возможность изготовления МФЧ для изотермической амплификации нуклеиновых кислот, то необходимой являлась проверка

испаряемости буферного раствора из реакционной камеры при создании температурного режима, соответствующего условиям амплификации. Одновременно изучалась возможность предотвращения испарения жидкости через гидравлические интерфейсы (резервуары для загрузки пробы) МФЧ.

Для проверки испаряемости буферного раствора из реакционных камер МФЧ были изготовлены 4 варианта гибридных конструкций из следующих материалов: ПДМС – стекло; ПДМС (с ПО-пленкой) – стекло; эластомер Lasil T-4 – стекло; эпоксидного компаунда ПЭО-221К – стекло.

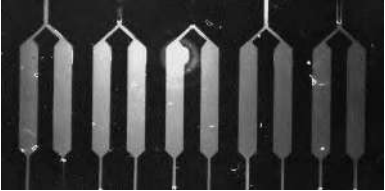

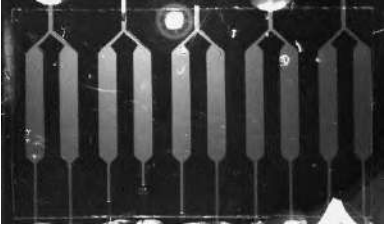
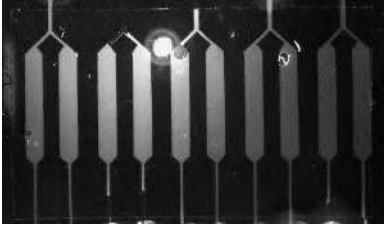


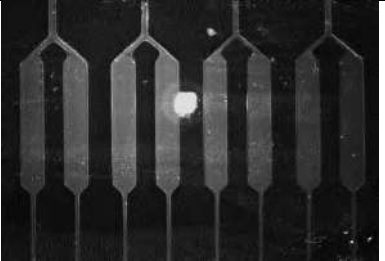
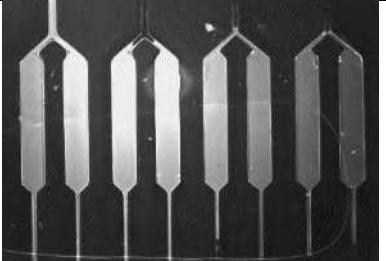
МФЧ изготавливали методом «мягкой» литографии и соединяли со стеклянной подложкой после плазменной обработки в среде кислорода в течение 1,5 мин при использовании реплик из эластомеров, а в случае эпоксидного отпечатка – с помощью фотоотверждаемого клея.

Реакционные камеры МФЧ заполняли 0,01 М боратным буферным раствором (рН 9,18) с добавлением красителя FITC в концентрации 10^{-4} . Затем загрузочные резервуары чипов из эластомерных материалов герметизировали композицией Пентэласт®-712 с соотношением основа : отвердитель 10:2, а резервуары МФЧ из эпоксидной смолы заполняли минеральным маслом.

После герметизации загрузочных резервуаров осуществляли регистрацию изображений флуоресценции раствора в реакционных камерах МФЧ (Таблица 3.12). Затем МФЧ помещали в термокамеру и выдерживали при температуре 65° в течение 1 часа (имитация температурного режима изотермической амплификации), после чего повторно осуществляли регистрацию изображений флуоресценции.

Полученные результаты свидетельствуют, что все исследуемые конструкции пригодны для проведения изотермической амплификации нуклеиновых кислот в данном температурном режиме. Качество герметизации загрузочных резервуаров указанными методами можно считать удовлетворительным. Наименьшие потери пробы (по результатам визуальной оценки изображений) зафиксированы в микрочипах (ПЭО-221К – стекло) и (ПДМС с ПО-пленкой – стекло).

Таблица 3.12 – Изображения реакционных камер микрофлюидных чипов различных конструкций до и после температурного воздействия (светлые области соответствуют заполненным раствором реакционным камерам, а затемнения означают испарение раствора)

Конструкция	Условия эксперимента	
	Без температурного воздействия	После 1 час при 65 °С
ПДМС-стекло		
ПДМС с ПО-пленкой-стекло		
Lasil T-4-стекло		
ПЭО-221К-стекло		

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3

Ресурс мастер-формы из кремния и фоторезиста может быть существенно увеличен за счет получения твердых дополнительных мастер-форм из эпоксидных компаундов через промежуточную (дополнительную) реплику из эластичного материала. Кроме того, использование мастер-форм из эластичных материалов позволяет изготавливать «твердые» отпечатки из клеев-компаундов и эпоксидных смол, что расширяет возможности «мягкой» литографии.

Лазерные технологии микрообработки материалов являются относительно дешевыми и позволяют за короткое время изготовить мастер-форму из металла для метода «мягкой» литографии, что дает возможность увеличить максимально возможное число получаемых полимерных реплик. Использование существующих коммерческих систем не позволяет формировать структуры размером менее 15-25 мкм, при этом шероховатость обработанной поверхности составляет несколько микрометров. Лазерная полировка позволяет снизить шероховатость в несколько раз, что декларируется зарубежными фирмами. В рамках данных исследований удалось достигнуть шероховатости на уровне $R_a \sim 0,8-1,2$ мкм, что подходит для решения большинства практических задач, если необходимо сформировать структуры с размерами свыше 50 мкм.

Для уменьшения шероховатости поверхности металлическая мастер-форма может быть подвергнута электронно-лучевой, химической, электрохимической и электролитно-плазменной обработке. В последнем случае существует возможность получения наиболее высокого качества поверхности (шероховатость до $R_a \sim 0,01$ мкм [154]) при высокой производительности оборудования [151]. При электролитно-плазменной обработке мастер-формы из стали 40X13 величина $R_a = 33-50$ нм, что в несколько раз меньше в сравнении с исходной шероховатостью. Оптимизация условий и параметров обработки позволит в перспективе получить мастер-форму высокого качества.

Учитывая вышеизложенное, можно полагать, что сочетание технологий лазерной микрообработки с последующей электролитно-плазменной обработкой позволяет изготавливать сложные микроструктуры для относительно недорогих мастер-форм из металла с низкой шероховатостью поверхности. Металлические мастер-формы также могут быть использованы при изготовлении реплик из термопластичных материалов методом прессования.

СКО размеров одинаковых микроструктур мастер-формы может являться важной характеристикой при сравнении технологии или способа изготовления структур.

В идеальном случае размеры структур реплики должны быть идентичны размерам соответствующих структур шаблона (мастер-формы), т.е. должна наблюдаться линейная зависимость получаемых размеров с коэффициентом пропорциональности 1. Отклонение от такой зависимости определяется способом и условиями репликации, а также используемыми материалами мастер-формы и реплики. Таким образом, характеристики отклонения размеров микроструктур реплики от размеров шаблона могут рассматриваться как интегральная характеристика способа репликации при сравнении различных методов.

Анализ размеров отпечатков линейных микроструктур в ПДМС с мастер-формы из ПЭО-221К показал, что формируемые ПДМС-реплики имеют отклонения не более 5 мкм и меньшее СКО, чем для мастер-формы. Реплики, полученные при первом и десятом отпечатке, имеют примерно одинаковое СКО, а отклонение ширины от выбранного размера не превышает 3 мкм (для размеров: 25, 50 и 100 мкм). Таким образом, использование мастер-формы из компаунда ПЭО-221К позволяет получать отпечатки микроструктур в ПДМС, подходящие для практического использования в МФЧ.

Результаты проверки испаряемости модельного раствора из реакционных камер МФЧ, изготовленных с применением материалов: ПДМС-стекло, ПДМС с пленкой ПО – стекло, эластомер Lasil T-4 – стекло, компаунд ПЭО-221К – стекло при имитации температурного режима изотермической амплификации (65 °С, 1 час), показали, что практически все исследуемые конструкции пригодны для изотермической амплификации нуклеиновых кислот. Качество герметизации загрузочных резервуаров композицией Пентэласт®-712 для микрочипов из ПДМС и минеральным маслом для МФЧ из ПЭО-221К можно считать удовлетворительным, наименьшие потери пробы (по результатам визуальной оценки изображений) зафиксированы в микрочипах (ПЭО-221К – стекло) и (ПДМС с ПО-пленкой – стекло).

В Таблице 3.13 приведено сравнение методов изготовления мастер-форм по таким параметрам, как материалы, время изготовления, дополнительная обработка, применяемые материалы для заготовок микрофлюидных устройств.

Таблица 3.13 – Сравнение методов изготовления мастер-форм для микрофлюидных устройств

Метод изготовления	Материал	Время изготовления (в часах)	Дополнительная обработка	Материалы для реплик	Примечание
Фотолитография	Кремний, фоторезист	6-8	Силанизация	Эластомеры (ПДМС)	Ограниченное число реплик (~50 шт.), хрупкость, высокая стоимость
Лазерное микро изготовление и полировка	Металл (медь, латунь, сталь и др.), керамика	~0,5-1	Не требуется	Эластомеры (ПДМС) Термопласты (термопрессование)	Ограничения по размерам формируемых структур (более 100 мкм), шероховатость поверхности Ra ~0,8-1,2 мкм, (Ra=0,05-0,3 мкм по данным [148])
Лазерная гравировка	Металл (алюминий)	~0,5	Не требуется	Эластомеры (ПДМС) Термопласты (термопрессование)	Ограничения по размерам формируемых структур, шероховатость поверхности Ra ~2-5 мкм
Методы «мягкой» литографии	Клей-компанд (ПЭО-221К)	~4-5 (+2,5)*	Гидрофобизация	Эластомеры (ПДМС)	Ограничение при изготовлении каналов (ширина не менее 40-50 мкм на длине порядка нескольких мм)
	Клей-компанд (ПЭО-510КЭ-20/0)	~6-7 (+2,5)*	Гидрофобизация	Эластомеры (ПДМС)	Ограничение при изготовлении каналов (ширина не менее 40-50 мкм на длине порядка нескольких мм)
	Эпоксидная смола (Resine Epoxy R123)	72 (+2,5)*	Гидрофобизация	Эластомеры (ПДМС)	Ограничение при изготовлении каналов (ширина не менее 40-50 мкм на длине порядка нескольких мм)
	Эластомер (ПДМС)	~2-3 (+2,5)*	Гидрофобизация или обработка силиконовым маслом	Клеи-компаунды, эпоксидные смолы	Возможность получения заготовок в твердых материалах без использования термопресса (отливка по шаблону)

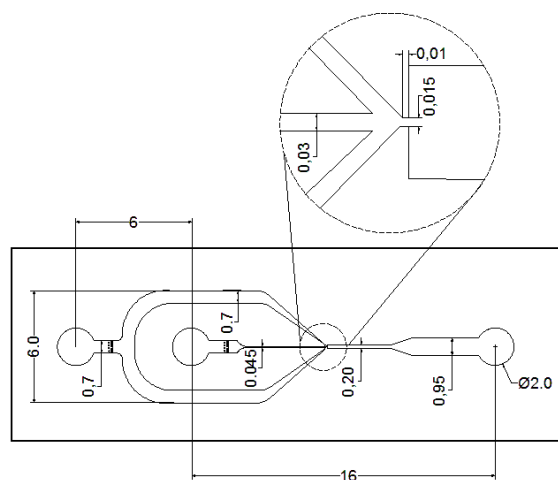
*время, необходимое на изготовление «промежуточной» мастер-формы

4. ПРОВЕРКА РАБОТОСПОСОБНОСТИ МИКРОФЛЮИДНЫХ ЧИПОВ ПРИ АМПЛИФИКАЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И РАЗДЕЛЕНИИ СМЕСИ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

4.1. Микрофлюидные чипы для амплификации нуклеиновых кислот

МФЧ с генератором макроэмульсии «вода-в-масле» (принцип – фокусировка потока) были изготовлены методом «мягкой» литографии. Герметизацию чипов проводили путем соединения ПДМС-реплики с защитной пленкой из ПДМС после обработки высокочастотной плазмой (13,56 МГц) в среде кислорода в течение 1 минуты на установке Denier Zepto. Далее МФЧ выдерживали 6 часов при 80 °С для восстановления гидрофобных свойств, что является необходимым условием устойчивой генерации эмульсии. Эскиз топологии МФЧ и фрагмент изображения ПДМС-реплики приведены на Рисунке 4.1. Ширина центрального канала для водной (дискретной) фазы 30,5 мкм (Рисунок 4.1, б), для масляной (непрерывной) ~ 31 мкм и 34 мкм для верхнего и нижнего подводящих каналов соответственно, ширина апертуры генератора капель ~ 16 мкм, реакционной камеры ~ 200,0 мкм, глубина каналов ~ 37 мкм.

а



б

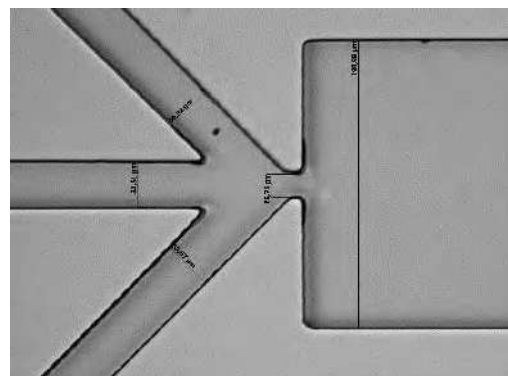


Рисунок 4.1 – а – Эскиз топологии МФЧ для формирования макроэмульсии; б – увеличенное изображение генератора капель в ПДМС-реплике (микроскоп Axio Observer.D1m, Carl Zeiss, Германия)

4.1.1. Обработка рабочей поверхности гибридного микрофлюидного чипа для генерации эмульсии

Формирование однократной эмульсии «вода-в-масле» означает, что в качестве дискретной фазы используется буферный раствор (далее в экспериментах использовали ПЦР-смесь, содержащую ДНК-мишень), а в качестве непрерывной – минеральное масло. Поэтому необходимо обеспечить несмачивание поверхности каналов дискретной фазой и смачивание непрерывной.

В конструкции гибридного МФЧ, состоящего из ПДМС-реплики со стеклянной пластиной (ПДМС-стекло), после обработки плазмой (при создании герметичного соединения), необходимо придать поверхности гидрофобные свойства. Наиболее часто используемыми методами обработки для получения гидрофобных свойств является модификация поверхности при помощи коммерчески доступных водоотталкивающих агентов, например, Aquapel (PPG Industries, США), а также силанизация.

Значения углов смачивания воды на поверхности ПДМС и стекла должны удовлетворять условию: $\Theta > 92^\circ$, где Θ – краевой угол [24].

В качестве реагентов для обработки каналов МФЧ были выбраны:

- водоотталкивающий агент Aquapel;
- трихлор(октадецил)силан (Sigma-Aldrich Corp., США).

Изучение свойств смачивания открытых поверхностей материалов после модификации указанными реагентами проводилась на специально подготовленных пленках из ПДМС размером $24 \times 24 \times 2$ мм³ и покровных стеклах размером $24 \times 48 \times 0,18$ мм³, прошедших предварительную очистку. Часть образцов была обработана кислородной плазмой с целью активации поверхности, имитирующей условия герметизации. Изучение свойств смачивания в микроканалах проводилась на тестовом МФЧ с двумя каналами шириной ~ 110 мкм, глубиной ~ 43 мкм.

Для использования раствора силана необходимо было выбрать его концентрацию и подобрать растворитель. В случае 4% раствора силана в водно-спиртовой смеси наблюдалось выпадение осадка, а при использовании изопропилового спирта и снижении концентрации силана до 1% имела место недостаточная гидрофобность $\Theta \ll 90^\circ$.

В результате экспериментов была выбрана следующая методика обработки МФЧ водоотталкивающим агентом Aquapel, выполняемая в четыре этапа.

Первым этапом является повторная активация поверхности уже герметизированных МФЧ из ПДМС-стекло (после их хранения, если модификация не осуществляется сразу после герметизации) при помощи кислородной плазмы в течение 1,5 мин (см. Раздел 2.3.3).


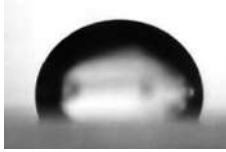


На втором этапе каналы МФЧ заполняют гидрофобизирующим агентом на 1 мин.

После этого промывают каналы изопропиловым спиртом и дистиллированной водой для удаления остатков реагента.

Заключительным этапом является просушивание каналов МФЧ воздухом или инертным газом для удаления остатков жидкости.

Для изучения свойств смачивания были проведены измерения краевого угла на модифицированных поверхностях методом лежащей капли и по профилю мениска воды в тестовом канале МФЧ. Результаты представлены в Таблицах 4.1 и 4.2.

Таблица 4.1 – Измерение краевого угла методом лежащей капли

Материал	Необработанные образцы	Гидрофобизация с помощью Aquapel
ПДМС		
	$\theta = 107^{\circ} \pm 1^{\circ} (n=7)$	$\theta = 103^{\circ} \pm 3^{\circ} (n=7)$
Стекло		
	$\theta = 34^{\circ} \pm 3^{\circ} (n=7)$	$\theta = 93^{\circ} \pm 2^{\circ} (n=7)$

Полученные результаты свидетельствуют о том, что гидрофобизирующий агент Aquapel обеспечивает необходимые для формирования эмульсии «вода-в-масле» водоотталкивающие свойства поверхности канала МФЧ.

Таблица 4.2 – Измерение краевого угла по профилю мениска воды в канале МФЧ (ПДМС-стекло)

Стадия обработки и результат	Изображение мениска
1. До обработки: $126^{\circ} \pm 4^{\circ}$ (n=5)	
2. После O ₂ плазмы: $30^{\circ} \pm 6^{\circ}$ (n=5)	
3. Гидрофобизация: $135^{\circ} \pm 1^{\circ}$ (n=5)	

4.1.2. Экспериментальная установка на базе оптического микроскопа для регистрации процесса формирования эмульсии

На базе конфокального лазерного сканирующего микроскопа Leica TCS SL со скоростной ПЗС-камерой с прогрессивной разверткой Pike F421B (Allied Vision Technologies GmbH, Германия) была создана экспериментальная установка для регистрации процесса формирования макроэмульсий (капель диаметром 20-70 мкм) на МФЧ (Рисунок 4.2). Регистрация проводилась в просвечивающем режиме.

Использовались следующие режимы формирования капель:

1. Режим постоянного давления.
2. Режим фиксированного расхода фаз.

В первом случае применялись открытые шприцы (без поршня), содержащие непрерывную и дискретную фазы, закрепленные на штативе на разных уровнях. Достоинством этого режима является возможность оперативного подбора режима формирования капель (т.к. за счет изменения высоты расположения шприцев можно быстро регулировать давление в каналах МФЧ) и простота выполнения. Недостатком являлась низкая скорость генерации капель и влияние условий окружающей среды (атмосферное давление, потенциальная возможность засорения) на результаты эксперимента.

Для второго режима использовали шприцевые насосы 11plus и PHD 2000 Programmable Harvard Apparatus (Harvard Bioscience, Inc., Великобритания). С их помощью можно значительно повысить скорость генерации и добиться стабильного и воспроизводимого режима

формирования капель. Наличие двух отдельных насосов позволяет в широких пределах варьировать расходы дискретной и непрерывной фаз. В отличие от существующих пневматических систем с контроллерами давления, позволяющих создавать постоянное давление и независимо управлять расходом фаз, применяемая система является более стабильной, поскольку изменения гидравлического сопротивления в каналах в процессе формирования капель не оказывают существенного влияния на условия генерации.

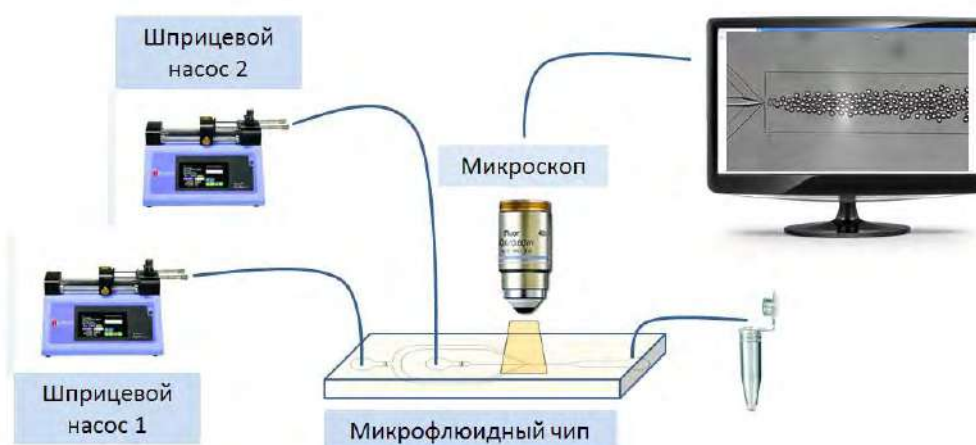


Рисунок 4.2 – Схематичное изображение экспериментальной установки на базе конфокального лазерного сканирующего микроскопа

4.1.3. Определение условий стабильной генерации капель

В экспериментах использовались МФЧ с генератором макроэмульсии В/М, основанном на принципе фокусировки потока. Для непрерывной фазы применялось минеральное масло BioXtra (Sigma-Aldrich Corp., США) с плотностью 0.82-0.88 г/мл при 25 °С с добавлением поверхностно-активных веществ (ПАВ) (по весу): Span[®] 80 (Sigma-Aldrich Corp., США), Brij 35 (Sigma-Aldrich Corp.) и ABIL EM 180 (Evonik Industries, Германия). Изучались следующие сочетания минерального масла и ПАВ:

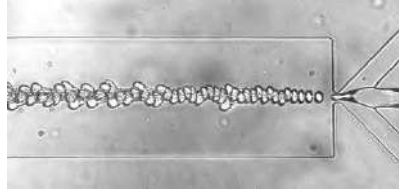

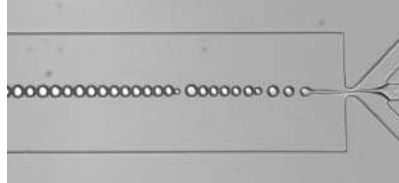

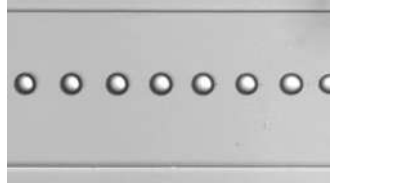
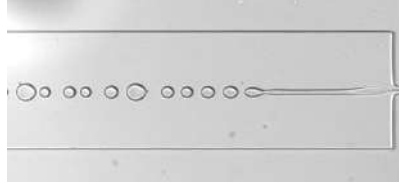
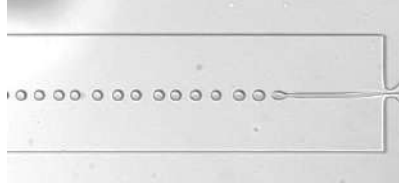
- ✓ мин. масло + 1,5% Span[®] 80 + 0,5% Brij 35;
- ✓ мин. масло + 5% Span[®] 80 + 0,5% Brij 35;
- ✓ мин. масло + 2% Span[®] 80;
- ✓ мин. масло + 4% Span[®] 80;
- ✓ мин. масло + 3% ABIL EM 180;
- ✓ мин. масло + 4% ABIL EM 180.

В качестве дискретной фазы был выбран модельный буферный раствор, имитирующий ПЦР-смесь по составу, вязкости и рН. Состав буферного раствора: 50 мМ Tris-HCl (рН 8,6),

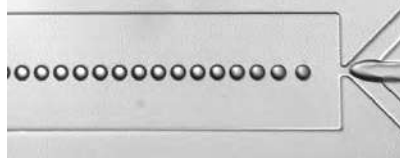
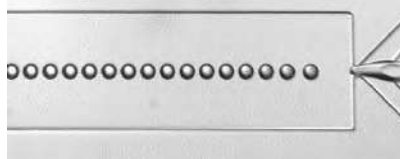
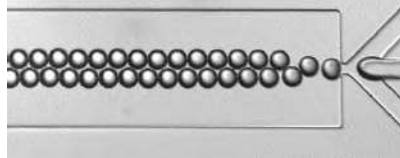
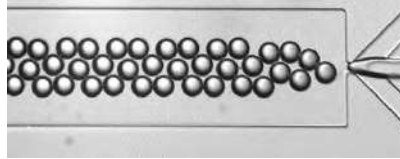
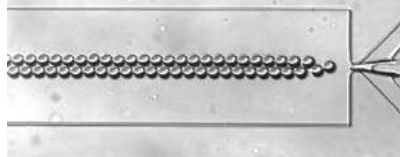
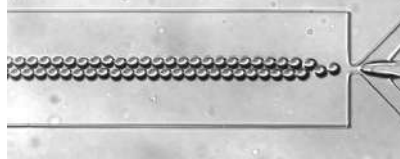


50 мМ КСl, 1,5 мМ MgCl₂, 0,1% Tween 20 (Sigma-Aldrich Corp., США), 1 мг/мл БСА (бычий сывороточный альбумин).

Результаты экспериментов по изучению условий формирования и стабильности генерации капель во времени приведены в Таблице 4.3.

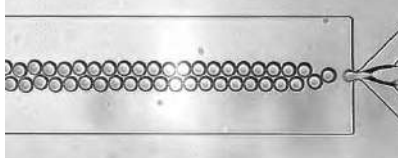
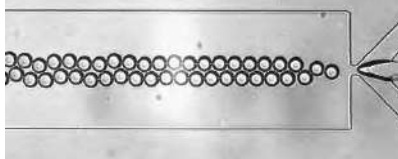
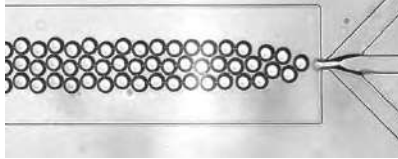
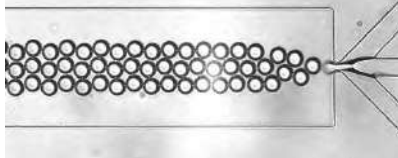
Таблица 4.3 – Сравнение режимов генерации капель

Состав непрерывной фазы	Условия эксперимента	Среднее значение диаметра капель, мкм; ±СКО		Оптическое изображение
Мин. масло + 1,5% Span® 80 + 0,5% Brij 35 (режим 1)	плотность масла принята 838 кг/м ³ Р _М =4069 Па Р _{воды} = 2060 Па			
Мин. масло + 5% Span® 80 + 0,5% Brij 35 (режим 1)	Р _М =3288 Па Р _{воды} =1470 Па	0 сек	26,2±2,5 ±9,7% (n=18)	
		25 сек	21,0±3,6 ±17,4% (n=35)	
Мин. масло + 2% Span® 80 (режим 1)	Р _М = 863 Па Р _{воды} =569 Па	0 мин	20,4±3,0 ±14,5% (n=18)	
		7 мин	24,5±1,2 ±4,9% (n=18)	
Мин. масло + 4% Span® 80 (режим 1)	Р _М =4110 Па Р _{воды} =2490 Па	0 мин	22,4±3,1 ±14,0% (n=20)	
		3 мин	17,7±0,9 ±5,3% (n=20)	

Продолжение Таблицы 4.3

Состав непрерывной фазы	Условия эксперимента	Среднее значение диаметра капель, мкм; ±СКО		Оптическое изображение
Мин. масло + 3% АВІL EM 180 (режим 1)	Р _м =2754 Па Р _{воды} =2300 Па	0 мин	24,7±0,5; ±2,2% (n=20)	
		7 мин	24,4±0,7; ±2,9% (n=20)	
	Р _м =2754 Па Р _{воды} =2590 Па	0 мин	32,4±0,5; ±1,5% (n=20)	
		3 мин	35,1±0,5; ±1,5% (n=20)	
Мин. масло + 4% АВІL EM 180 (режим 1)	Р _м =4069 Па Р _{воды} =2940 Па	0 мин	20,3±0,7; ±3,5% (n=20)	
		11 мин	20,3±0,8; ±4,1% (n=20)	
	Р _м =4069 Па Р _{воды} =3330 Па	0 мин	27,2±0,9; ±3,4% (n=20)	
		2 мин	27,9±1,0; ±3,5% (n=20)	

Продолжение Таблицы 4.3

Состав непрерывной фазы	Условия эксперимента	Среднее значение диаметра капель, мкм; \pm СКО		Оптическое изображение
Мин. масло + 3% АВИЛ ЕМ 180 (режим 2)	Расход масла и буфера 0,03 мкл/мин	0 мин	25,8 \pm 0,4; \pm 1,6% (n=20)	
		2 мин	25,3 \pm 0,4; \pm 1,6% (n=20)	
	Расход масла 0,05 мкл/мин; буфера – 0,15 мкл/мин	0 мин	27,8 \pm 0,3; \pm 1,2% (n=20)	
		17 мин	28,0 \pm 0,5; \pm 1,7% (n=20)	

Согласно данным, приведенным в Таблице 4.3, при использовании ПАВ Span[®] 80 и Brij 35 с различными концентрациями наблюдаются нестабильные гидродинамические условия формирования капель: для 5% Span[®] 80 спустя 25 с происходит уменьшение среднего размера капель, а затем генерация и вовсе прекращается.

Добавление в минеральное масло Span[®] 80 не позволило добиться стабильного режима генерации: в случае 2%-ой концентрации ПАВ происходит постепенное увеличение размеров капель с течением времени, а при 4%, наоборот, наблюдается уменьшение среднего диаметра.

Стабильные и воспроизводимые результаты формирования капель были получены при использовании АВИЛ ЕМ 180 с концентрациями 3% и 4% как в режиме постоянного давления, так и в режиме фиксированного расхода фаз.

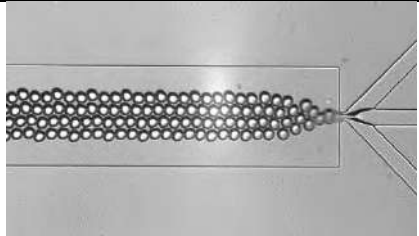
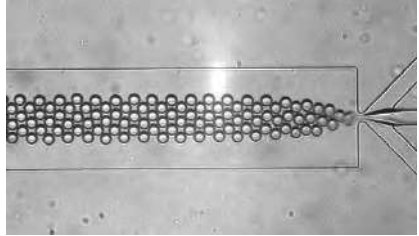
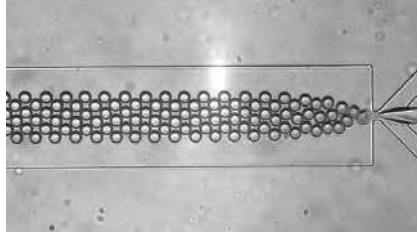
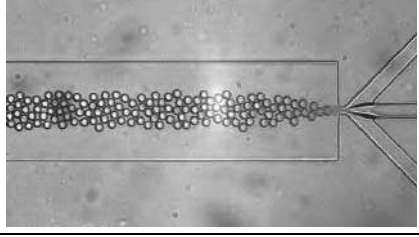
Таким образом была показана принципиальная возможность стабильного получения капель разного диаметра при различных условиях генерации. Для повышения скорости генерации капель использовали шприцевые насосы. Экспериментально были определены скорости подачи расходуемых фаз, которые составили $\sim 0,03$ мкл/мин.

Далее была проведена серия контрольных экспериментов по формированию капель с применением растворов:

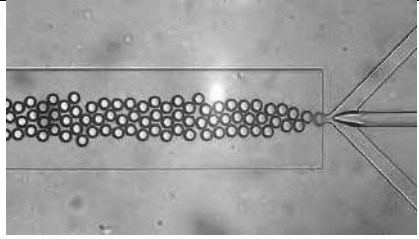
- ✓ буферного раствора №1 (дискретная фаза): 20 мМ Tris-HCl (pH 8,6), 50 мМ KCl, 1,5 мМ MgCl₂, 1 мг/мл БСА;
- ✓ аналогичного по составу буферного раствора №2 с pH 8,3;
- ✓ непрерывной фазы – мин. масло + 5% Span[®] 80 + 0,5% Brij[®] L4.

Результаты экспериментов по генерации капель в режиме контролируемого расхода фаз представлены в Таблице 4.4.

Таблица 4.4 – Сравнение режимов генерации капель

Составы фаз	Условия эксперимента		Среднее значение диаметра капель, мкм; ±СКО	Оптическое изображение
Растворы: Буферн. р-р №1 Мин. масло + 5% Span [®] 80 + 0,5% Brij [®] L4	Расход масла 1,0 мкл/мин; буфера – 0,07 мкл/мин	0 мин	37,6±1,0; ±2,8% (n=20)	
		15 мин	36,6±1,2; ±3,2% (n=20)	—
Растворы: Буферн. р-р №2 Мин. масло + 5% Span [®] 80 + 0,5% Brij [®] L4	Расход масла 0,8 мкл/мин; буфера – 0,06 мкл/мин	0 мин	38,8±1,0; ±2,5% (n=20)	
		10 мин	39,0±1,0; ±2,5% (n=20)	
Растворы: Буферн. р-р №2 Мин. масло + 5% Span [®] 80 + 0,5% Brij [®] L4	Расход масла 0,8 мкл/мин; буфера – 0,06 мкл/мин	0 мин	28,4±1,1; ±4,0% (n=20)	
		10 мин	32,3±1,0; ±2,7% (n=20)	—

Продолжение Таблицы 4.4

Составы фаз	Условия эксперимента		Среднее значение диаметра капель ±СКО	Оптическое изображение
Растворы: Буферн. р-р №2 Мин. масло + 5% Span [®] 80 + 0,5% Brij [®] L4	Расход масла 0,6 мкл/мин; буфера – 0,06 мкл/мин	0 мин	38,3±1,1 мкм; ±3,0% (n=20)	
		10 мин	39,8±1,0 мкм; ±2,3% (n=20)	—

Полученные результаты свидетельствуют, что применение сочетания 5% Span[®] 80 + 0,5% Brij[®] L4 и подбор условий эксперимента (расход масла и буферного раствора) позволяет добиться устойчивой генерации капель заданных размеров.

4.1.4. Экспериментальные исследования температурной и временной стабильности капель

В экспериментах изучались варианты с использованием разных ПАВ: а) ABIL EM 180, а также б) сочетания Span[®] 80 и Brij[®] L4. В первом случае применяли минеральное масло с добавлением 4% ABIL EM 180 и реакционную смесь для проведения ПЦР (ЗАО «Синтол») в качестве дискретной фазы. При этом расход масляной (непрерывной) фазы составлял 0,6 мкл/мин, водной (дискретной) – 0,01 мкл/мин. После генерации капли регистрировались с помощью оптического микроскопа на участке широкого канала МФЧ (0,96 мм), а затем отводились с помощью капилляра в стандартные пропиленовые пробирки для ПЦР. Пробирки выдерживали в течение 30 минут при 60 °С.

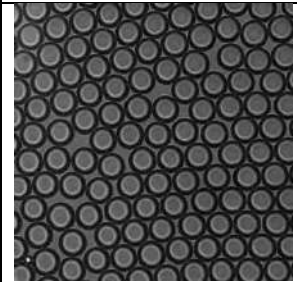
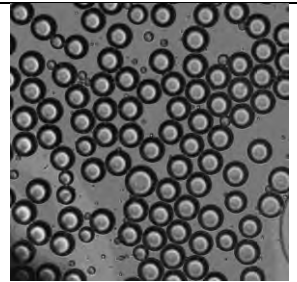
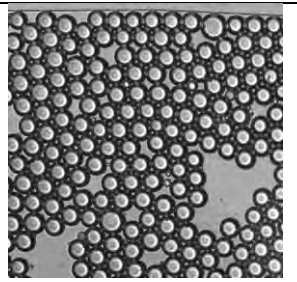
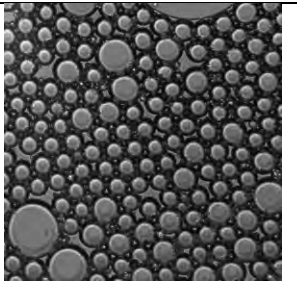
Во втором случае использовали раствор минерального масла с 5% Span[®] 80 и 0,5% Brij[®] L4 с аналогичной реакционной смесью. Скорость масляной фазы составила 0,6 мкл/мин, водной – 0,03 мкл/мин. Капли также собирали в пробирки и выдерживали 35 минут при 65 °С.

Затем, с помощью автоматических одноканальных пипеток, капли переносились в МФЧ из ПДМС, в котором была сформирована реакционная камера диаметром 14 мм. Изображения капель в реакционной камере регистрировались на оптическом микроскопе. В процессе

переноса капель пипетками наблюдались механические воздействия на макроэмульсии, приводящие к разрушению некоторого числа капель.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о температурной устойчивости капель (Таблица 4.5), что позволяет реализовать метод изотермической амплификации в капле.

Таблица 4.5 – 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, мкм			
63,6±2,1 (n=40)	58,3±1,5 (n=40)	47,5±2,2 (n=40)	49,2±2,6 (n=40)

4.1.5. Амплификация нуклеиновых кислот на прототипах микрофлюидного чипа

Для экспериментальных исследований были изготовлены МФЧ с двумя топологиями: 1 – с генератором капель для изотермической амплификации; 2 – с десятью реакционными камерами для проведения ПЦР в жидкости.

В первом случае реплики со структурами герметизировали пленкой ПДМС Sylgard[®] 184, во втором случае – стеклянной пластиной.

Конструкция МФЧ (Рисунок 4.3, а) с генератором капель обеспечивала «упаковку» пробы в изолированные капли диаметром 20-70 мкм в среде минерального масла. Использовали минеральное масло BioXtra с добавлением ПАВ 5% Span[®] 80 и 0,5% Brij[®] L4 по массе, а в качестве дискретной фазы – реакцию смесь IsoAmp[®] II Universal tHDA Kit (BioHelix Corporation, США) для геликазы-зависимой изотермической амплификации. Ранее было выявлено (Раздел 4.1.4), что сочетание данных ПАВ обеспечивает термостабильность капель. В качестве мишени использовали кДНК гена домашнего хозяйства GAPDH, амплификацию проводили в течение 1 часа при 65 °С. В экспериментах также оценивалось влияние

используемых ПАВ на флуоресценцию красителя EvaGreen[®], поскольку известно, что некоторые ПАВ могут приводить к тушению флуоресценции. Регистрацию результатов амплификации осуществляли по сигналу флуоресценции в потоке капель (объем каждой капли ~29 нл) на КЛСМ Leica TCS SL. Условия детектирования: возбуждение на 488 нм, регистрация – в диапазоне 510-530 нм (Рисунок 4.3, б).

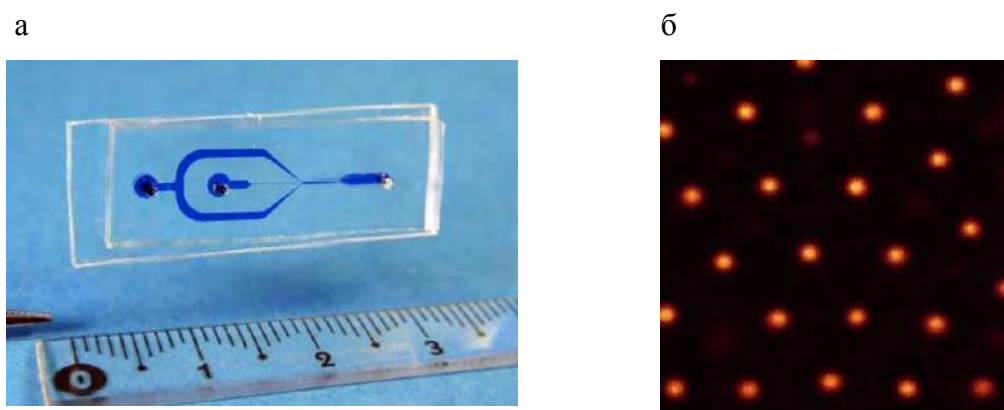


Рисунок 4.3 – а – Изображение МФЧ с генератором капель для изотермической амплификации; б – изображение потока эмульсии после амплификации, полученное на КЛСМ в режиме флуоресценции. Размер кадра 100 x 100 мкм²

Полученные данные: а) подтверждают возможность регистрации результатов амплификации в транспортном потоке; б) свидетельствуют о том, что используемое сочетание ПАВ не оказывает влияние на флуоресценцию используемого красителя EvaGreen[®].

Вторая конструкция МФЧ содержала пять пар реакционных камер глубиной ~160 мкм (4 – для реакционной смеси, 1 – для отрицательного контроля), с объемом каждой камеры ~1,4 мкл (Рисунок 4.4, а). Особенность конструкции заключалась в интеграции полиолефиновой пленки (Sarstedt AG & Co., Германия) в ПДМС-реплику для предотвращения испарения жидкости через материал при нагреве. Результаты измерения автофлуоресценции ПДМС с полиолефиновой пленкой показали, что конструкция не обладает собственной флуоресценцией при возбуждении на длине волны 650 нм и регистрации в диапазоне 655-750 нм, что необходимо при использовании флуоресцентного красителя Cy-5 (Разделы 2.3.1 и 2.3.2).

После заполнения камер реакционной смесью загрузочные резервуары герметизировались компаундом Пентэласт[®]-712 марки А, который отверждался на первой стадии нагрева МФЧ (см. Раздел 3.6). ПЦР проводили по технологии TaqMan, применяли специфичные праймеры и зонд Cy-5 (ООО «ДНК-Синтез», Россия) и реакционную смесь М-428 «ПЦР-Микс» (ЗАО «Синтол», Россия). В качестве мишени использовали синтезированный фрагмент кДНК гена домашнего хозяйства GAPDH длиной 226 п.о. в концентрации

10^5 копий/мкл. Результаты ПЦР регистрировали на КЛСМ Leica TCS SL в режиме регистрации флуоресценции в диапазоне 650-670 нм при возбуждении на 633 нм (Рисунок 4.4, б).

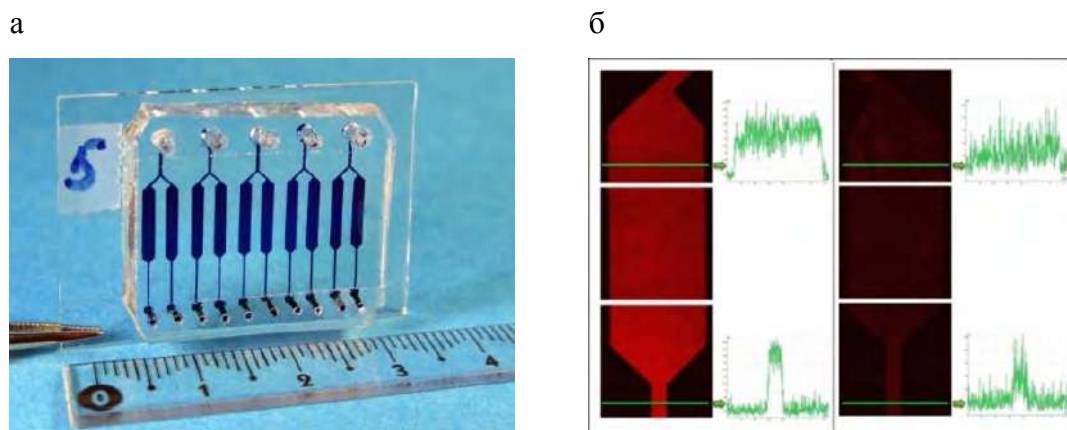


Рисунок 4.4 – а – Изображение МФЧ для ПЦР в жидкости с десятью реакционными камерами и интегрированной ПО-пленкой; б – изображения фрагментов реакционных камер после проведения ПЦР с мишенью кДНК (слева); без мишени, отрицательный контроль (справа), полученные на КЛСМ в режиме измерения флуоресценции. Справа от изображений – интенсивности сигналов флуоресценции в реакционной камере и подводящих каналах.

Размер каждого фрагмента $1,5 \times 1,5 \text{ мм}^2$

Полученные данные свидетельствуют: а) о возможности применения компаунда Пентэласт[®]-712 для герметизации каналов ввода пробы; б) об эффективности применения полиолефиновой пленки, предотвращающей испарение образца из реакционной камеры.

4.2. Микрофлюидные чипы для электрофоретического разделения нуклеиновых кислот

Важным направлением биологических и медицинских исследований является изучение генетических мутаций и полиморфизмов, которые могут изменять функции гена и являться причиной наследственных болезней и других заболеваний. В современных исследованиях для анализа фрагментов ДНК применяются методы: капиллярного электрофореза [156] и электрофореза на МФЧ [157-159], масс-спектрометрии с электрофорезом на МФЧ [160]; гибридизационного анализа на микрочипе («биочипе») [161]. Электрофорез на микрочипе позволяет проводить анализ проб малых объемов с высокой производительностью и быстродействием на устройствах, которые могут быть встроены в другие системы [162].

Электрофоретические методы анализа основаны на отличиях в движении заряженных и незаряженных частиц, находящихся в жидкой или газообразной среде, под действием электрического поля. Капиллярный электрофорез является разновидностью электрофоретических методов и используется как метод анализа компонентов сложной пробы, основанный на электромиграции заряженных частиц и электроосмотическом потоке.

Одной из задач данной работы являлось создание прототипа гибридного (стеклянно-полимерного) МФЧ для экспресс-анализа фрагментов ДНК методом электрофореза. При этом важными вопросами, требующими разработки, были выбор и отработка технологий изготовления микрочипа и способов модификации его рабочих поверхностей, доступных в условиях исследовательских лабораторий.

Стабилизация электроосмотического потока важна для получения воспроизводимых результатов электрофоретического разделения. Методами химической модификации поверхности можно уменьшить или даже обратить поток в противоположном направлении.

4.2.1. Изготовление гибридных микрофлюидных чипов для электрофоретического разделения проб

Для экспериментов была выбрана универсальная топология, объединяющая в себе топологии Т-инжектора и простого креста (Рисунок 4.5). Для изготовления МФЧ применялись материалы: стекло марки Крон 8 (ГОСТ 3514-76, Россия) и ПДМС Sylgard[®] 184.

С учетом приборных особенностей (имеющейся системы детектирования, размеров области детектирования, расположения рабочих электродов и требуемой длины сепарационного канала) были выбраны соответствующие размеры МФЧ, которые явились основой для топологии мастер-формы, приведенной на Рисунке 4.5. Мастер-форма изготавливалась в соответствии со стандартными процедурами фотолитографии в Санкт-Петербургском национальном исследовательском Академическом университете РАН (к.ф.-м.н. Букатин А.С.).

Реплики МФЧ для электрофоретического разделения пробы изготавливались по ранее описанной в Главе 3 методике. Герметизация осуществлялась с применением плазменной обработки соединяемых элементов: защитной стеклянной пластины ($60 \times 15 \times 1,5$ мм³) и ПДМС-реплики с микроразмерными структурами. Глубина структур в полимерной реплике составила ~ 19 мкм, ширина каналов ~ 60 мкм, диаметр резервуаров для ввода пробы – 2 мм.

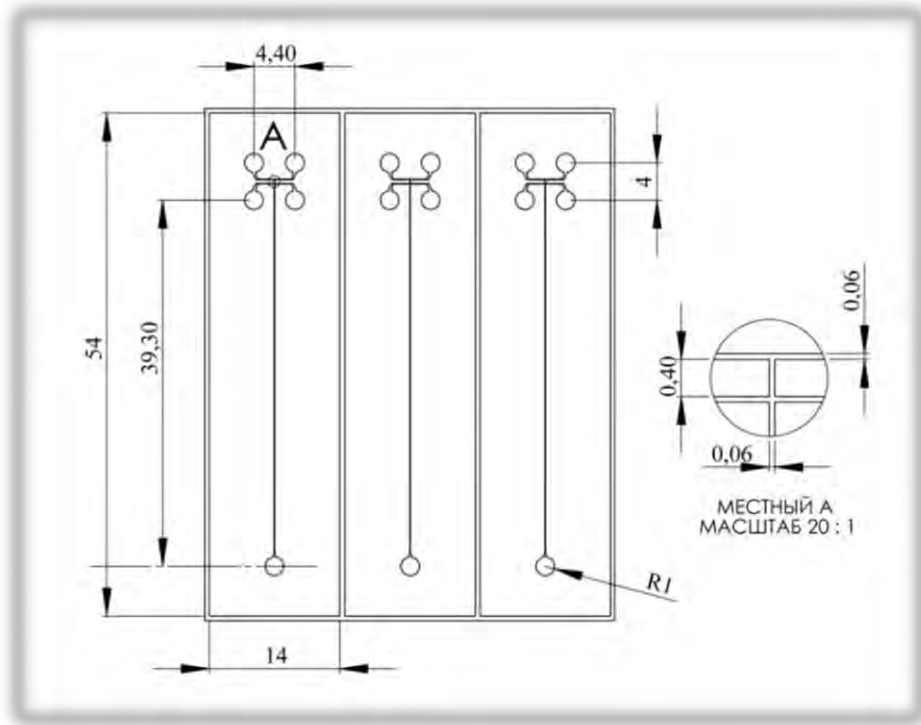


Рисунок 4.5 – Эскиз топологии мастер-формы для изготовления трех ПДМС-реplik, размеры приведены в мм

Изображение стеклянno-полимерного МФЧ для электрофоретического разделения пробы приведено на Рисунке 4.6. При проведении электрофореза резервуары Д служат для загрузки пробы и буферного раствора, резервуар В является сливным, а при измерении электроосмотической подвижности загрузочным является резервуар В.



Рисунок 4.6 – Изображение стеклянno-полимерного МФЧ: А – стеклянная подложка, Б – полимерная пленка, Г – сепарационный канал, В и Д – резервуары для загрузки пробы и буферного раствора

4.2.2. Определение электроосмотической подвижности в микрофлюидных чипах

Электроосмотическую подвижность (ЭОП) оценивали по методу, описанному в работе [163] и основанному на регистрации зависимости изменения тока во времени.

Измерения проводились в следующей последовательности:

1. с помощью шприца через сливной резервуар осуществлялось заполнение буферным раствором (С) сепарационного канала и остальных резервуаров;
2. на электроды подавалось напряжение;
3. после стабилизации тока производилась замена раствора в сливном резервуаре на разбавленный в 2 раза буферный раствор (С/2);
4. на электроды подавали напряжение и проводили мониторинг изменения величины тока.

При электрофорезе буферного раствора, когда сливной резервуар заполнен раствором с концентрацией (С/2), а сепарационный канал раствором (С), разбавленный буфер вытесняет из канала концентрированный за счет электроосмотического потока. При этом изменение проводимости жидкости (при разбавлении) приводит к линейной зависимости уменьшения величины тока во времени. Типичный характер изменения тока при электрофорезе буферного раствора приведен на Рисунке 4.7.

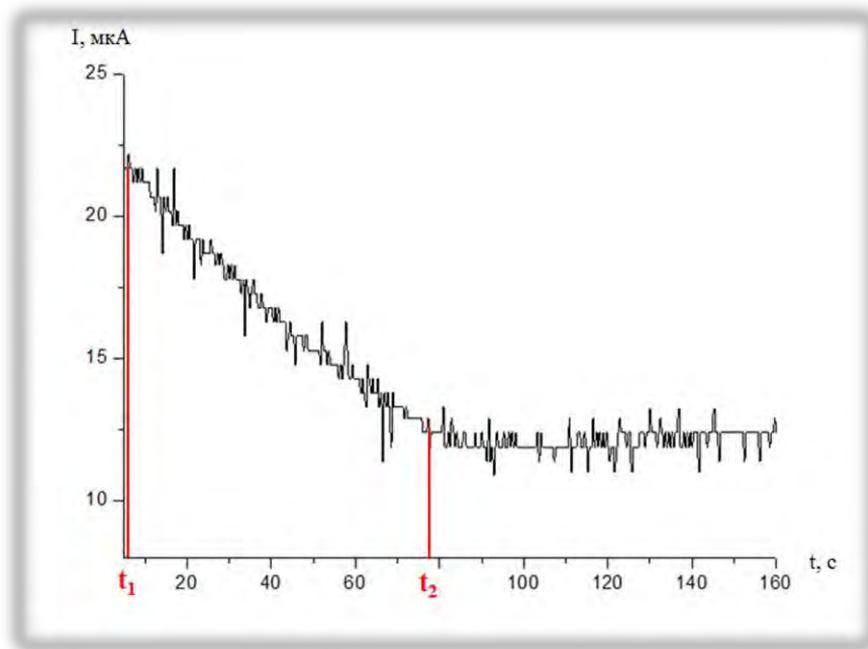


Рисунок 4.7 – Изменение величины тока в канале при электрофорезе буферного раствора

Электроосмотическая подвижность определялась по формуле:

$$\mu_{\text{ЭОП}} = L^2 / (U \cdot \Delta t), \quad (4.1)$$

где L – длина сепарационного канала ($L = 45,2$ мм),

U – напряжение электрофореза ($U=1000$ В),

$\Delta t=t_2-t_1$ – время изменения величины тока – определяли экспериментально.

Измерения проводились на экспериментальных образцах МФЧ каналы которых были подвергнуты разным способам обработки. При измерениях использовался буферный раствор 50 мМ $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, $\text{pH}=9,4$. Эксперименты проводились на микрофлюидной аналитической системе МФАС-01 (ИАП РАН, Россия).

При измерениях электроосмотической подвижности $\mu_{\text{ЭОП}}$ использовались следующие протоколы.

1. Измерения $\mu_{\text{ЭОП}}$ в необработанном чипе:

с целью исключения влияния плазменной обработки при герметизации микрочипов, электрофорез буферного раствора осуществлялся в чипе, герметизация которого была проведена за счет сил адгезии пленки ПДМС и стеклянной подложки. Измерения удалось провести только на одном МФЧ (№4), т.к. при заполнении буферным раствором прикладываемое давление приводило к разгерметизации чипа.

2. Измерения $\mu_{\text{ЭОП}}$ после обработки кислородной плазмой:

ранее изготовленные МФЧ обрабатывали плазмой в среде кислорода в течение 6 минут. Длительное время обработки по сравнению с открытыми поверхностями необходимо для гарантированной обработки сепарационного канала по всей длине. Таким образом были подготовлены чипы №1-№3. Проведение электрофореза буферного раствора осуществляли сразу после обработки.

3. Измерения $\mu_{\text{ЭОП}}$ после обработки раствором поливинилового спирта:

микрочипы №1 и №3, предварительно промыв дистиллированной водой и высушив, повторно обрабатывали кислородной плазмой в течение 6 минут, заполняли 1% водным раствором ПВС и выдерживали в течение 20 минут при температуре 60 °С. Затем высушивали с помощью вакуумного насоса и помещали в термостат на 30 минут при 80 °С (для закрепления адсорбированного слоя). Далее – проводились измерения $\mu_{\text{ЭОП}}$.

4. Измерения $\mu_{\text{ЭОП}}$ после обработки раствором Kolliphor[®]:

предварительно очищенные в хромовой смеси и высушенные стеклянные пластины и ПДМС-реплики обрабатывали в аргоновой плазме в течение 3,5 минут и приводили в контакт для создания герметичного соединения. Каналы чипов (№6, №7) заполняли 3% водным раствором Kolliphor[®], помещали в чашку Петри с указанным раствором для предотвращения испарения и выдерживались 18 ч при температуре 60 °С. После этого каналы промывали

дистиллированной водой, высушивали с помощью вакуумного насоса и помещали в термостат на 30 минут при 60 °С. Затем проводились измерения.

Экспериментальные данные, а также результаты расчетов средней величины электроосмотической подвижности $\mu_{ЭОП}$, СКО и коэффициента вариации (КВ) приведены в Таблице 4.6.

Таблица 4.6 – Изменение величины ЭОП буферного раствора в каналах МФЧ в зависимости от способа обработки [$\mu_{ЭОП} \times 10^{-4} \text{ см}^2/(\text{В} \cdot \text{с})$]

	Чип №1 (O₂ 6 мин)	Чип №2 (O₂ 6 мин)	Чип №3 (O₂ 6 мин)	Чип №1 (1% ПВС)	Чип №3 (1% ПВС)	Чип №4 (необр.)	Чип №6 (3% Kolliphor®)	Чип №7 (3% Kolliphor®)
Средн. ±СКО	4,6±0,4	4,1±0,6	3,7±0,5	2,3±0,2	2,1±0,1	3,0±0,2	1,8±0,1	2,4±0,1
КВ	8,6%	14,9%	12,1%	8,9%	5,6%	7,5%	4,1%	4,0%

Согласно полученным данным наблюдается нестабильность свойств поверхности каналов МФЧ после плазменной обработки, о чем свидетельствуют наибольшие значения КВ. Наиболее эффективным методом модификации МФЧ, позволяющим достигнуть минимального значения $\mu_{ЭОП}$, является обработка раствором Kolliphor®. Именно этот метод был выбран для подготовки МФЧ к экспериментам по разделению смеси олигонуклеотидов. Однако для получения более стабильных значений ЭОП требуется проведение исследований, связанных с выбором оптимальных условий обработки.

4.2.3. Электрофоретическое разделение смеси олигонуклеотидов

Для электрофореза на МФЧ в качестве анализируемой пробы была выбрана смесь олигонуклеотидов (полиаденилатов) с длиной цепи 10, 20, 30, 40 и 50 нуклеотидов, меченных флуоресцентной меткой (FITC). Электрофорез проводили на микрофлюидной аналитической системе МФАС-01 с детектором лазер-индуцированной флуоресценции (длина волны возбуждения 473 нм, спектральный диапазон регистрации – 510-530 нм). Напряжение электрофореза составило 1500 В. В качестве буферного раствора использовался 6% раствор полидиметилакриламида с добавлением 7М мочевины. Результаты разделения исследуемой пробы приведены на Рисунке 4.8. Зависимости нормированы относительно максимального значения интенсивности флуоресценции.

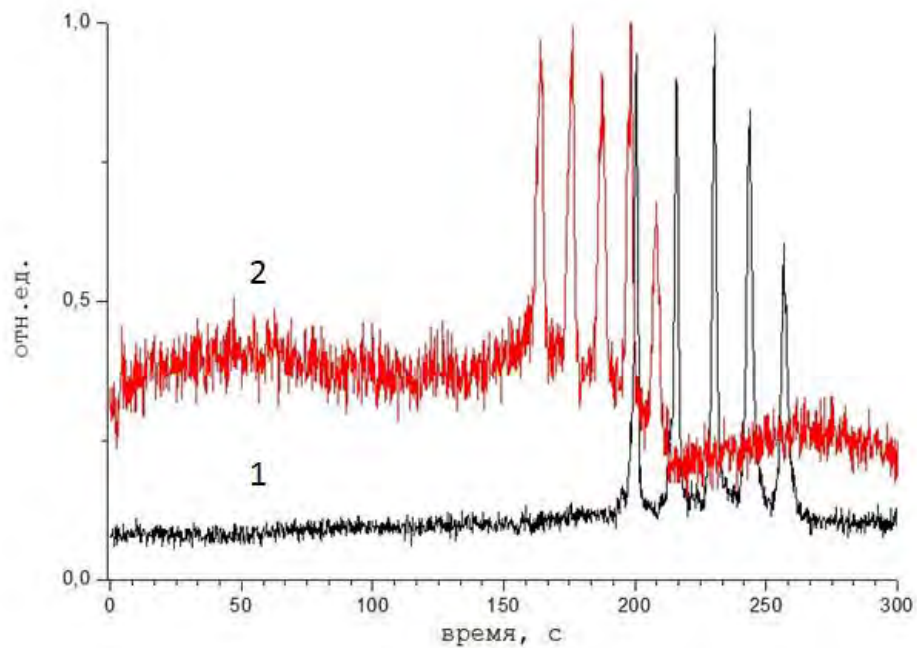


Рисунок 4.8 – Электрофореграмма разделения смеси олигонуклеотидов:

1 – для необработанного микрочипа, 2 – для обработанного раствором Kolliphor[®]

Согласно полученным зависимостям можно оценить время, необходимое для проведения электрофореза смеси олигонуклеотидов. Для необработанного микрочипа это время составило ~275 с, тогда как для обработанного раствором Kolliphor[®] P188 ~220 с. Таким образом, уменьшение величины электроосмотического потока привело к сокращению времени анализа. Дальнейшая оптимизация методов и условий обработки каналов МФЧ позволит дополнительно снизить время анализа пробы и улучшить качество разделения.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4

На основе экспериментальных исследований был выбран способ обработки МФЧ с помощью водоотталкивающего агента Aquapel, обеспечивающий необходимую гидрофобность поверхности каналов МФЧ для формирования макроэмульсий «вода-в-масле».

Стабильные и воспроизводимые результаты формирования капель были получены при использовании ABIL EM 180 с концентрациями 3% и 4% как в режиме постоянного давления, так и в режиме фиксированного расхода фаз. Применение сочетания 5% Span[®] 80 + 0,5% Brij[®] L4 и подбор условий эксперимента (расход масла и буферного раствора) позволяет также добиться устойчивой генерации капель.

На примере регистрации результатов изотермической амплификации участка гена GAPDH показана возможность детектирования флуоресценции от отдельных макроэмульсий (объемом ~29 нл) в транспортном потоке минерального масла BioXtra (с добавлением ПАВ 5% Span[®] 80 и 0,5% Brij[®] L4) на МФЧ с генератором капель, что обеспечивает высокопроизводительный анализ нуклеиновых кислот.

Продемонстрирована возможность применения МФЧ с интегрированными ПО-пленками (для снижения потерь пробы при испарении) при обнаружении фрагментов кДНК гена GAPDH в концентрации 10^5 копий/мкл методом ПЦР.

Эффективным способом модификации МФЧ для электрофоретического разделения нуклеиновых кислот, позволяющим достигнуть минимального значения ЭОП, является обработка раствором Kolliphor[®]. На примере разделения смеси олигонуклеотидов с длиной цепи 10, 20, 30, 40 и 50 нуклеотидов, меченных флуоресцентной меткой (FITC), показано, что данная обработка сепарационного канала МФЧ позволяет существенно сократить время анализа смеси.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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, физико-механических и 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. Проведены оценки величин сигнала флуоресценции конструкций с интегрированными полимерными пленками, используемыми для микрофлюидных чипов, позволившие выработать рекомендации по их применению в устройствах 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 10^5 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 СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АСМ – атомно-силовая микроскопия

БИК – ближняя инфракрасная (область, спектроскопия)

В/М – эмульсия типа «вода-в-масле»

КЛСМ – конфокальная лазерная сканирующая микроскопия

ЛА – лазерная абляция

М/В – эмульсия типа «масло-в-воде»

МФУ – микрофлюидное устройство

МФЧ – микрофлюидный чип

П-712 – Пентэласт®-712

ПАВ – поверхностно-активное вещество

ПВС – поливиниловый спирт

ПДМС – полидиметилсилоксан

ПК – поликарбонат

ПММА – полиметилметакрилат

ПО-пленка – полиолефиновая пленка

ПЦР – полимеразная цепная реакция

СБОМ – сканирующий ближнепольный оптический микроскоп

ЦОС-пленка – пленка циклоолефинового сополимера

цПЦР – цифровая полимеразная цепная реакция

ЭОП – электроосмотическая подвижность

«Пиранья» – смесь перекиси водорода и концентрированной серной кислоты

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО МАТЕРИАЛАМ РАБОТЫ

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 плазмы 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. Стекланно-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.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Status of the Microfluidics Industry 2017 [Электронный ресурс] – Электрон. текстовые дан. – Режим доступа: <https://www.i-micronews.com/category-listing/product/status-of-the-microfluidics-industry-2017.html>, свободный.
2. Higgins, J.A. Sensitive and Rapid Identification of Biological Threat Agents in Food and Agricultural Security [Text] / J.A. Higgins, M.S. Ibrahim, F.K. Knauert et al. // *Ann. Rev. N. Y. Acad. Sci.* – 1999. – Vol.894. – P.130–148.
3. Biomark HD [Электронный ресурс] – Электрон. текстовые дан. – Режим доступа: <https://www.fluidigm.com/products/biomark-hd-system>, свободный.
4. Applied Biosystems [Электронный ресурс] – Электрон. текстовые дан. – Режим доступа: <http://appliedbiosystems.com>, свободный.
5. Shen, F. Digital PCR on a SlipChip. [Text] / F. Shen, W. Du, J.E. Kreutz, A. Fok, R.F. Ismagilov // *Lab Chip.* – 2010. – Vol.10, – N.20. – P.2666–2672.
6. Dube, S. Mathematical Analysis of Copy Number Variation in DNA Sample Using Digital PCR on a Nanofluidic Device [Text] / S. Dube, J. Qin, R. Ramakrishnan // *PLoS ONE.* – 2008. – Vol.3. – N.8. – P.2876.
7. Guo, M.T. Droplet microfluidics for high-throughput biological assays [Text] / M.T. Guo, A. Rotem, J.A. Heymanab, D.A. Weitz // *Lab Chip.* – 2012. – Vol.12. – P.2146–2155.
8. Lee, C-C. A microfluidic oligonucleotide synthesizer [Text] / C-C. Lee, T.M. Snyder, S.R. Quake // *Nucleic Acids Research.* – 2010. – Vol.38. – N.8. – P.2514–2521.
9. Wootton, R.C.R. Analog-to-digital drug screening [Text] / R.C.R. Wootton, A.J. De Mello // *Nature.* – 2012. – Vol.483. – P.43–44.
10. Giuffrida, M.C. Droplet Microfluidic Device Fabrication and Use for Isothermal Amplification and Detection of MicroRNA [Text] / M.C. Giuffrida, R. D'Agata, G. Spoto // *Methods Mol Biol.* – 2017. – Vol.1580. – P.71–78.
11. Zanolli, L.M. Isothermal Amplification Methods for the Detection of Nucleic Acids in Microfluidic Devices [Text] / L.M. Zanolli, G. Spoto // *Biosensors.* – 2013. – Vol.3. – N.1. – P.18–43.
12. Abate, A.R. DNA sequence analysis with droplet-based microfluidics [Text] / A.R. Abate, T.Hung, R.A. Sperling, P. Mary, A. Rotem, J.J. Agresti, M.A. Weiner, D.A. Weitz. // *Lab Chip.* – 2013. – Vol.13. – N.24. – P.4864–4869.
13. Zilionis, R. Single-cell barcoding and sequencing using droplet microfluidics [Text] / R. Zilionis, J. Nainys, A. Veres, V. Savova, D. Zemmour, A.M. Klein, L. Mazutis // *Nat Protoc.* – 2016. – Vol.12. – N.1. – P.44–73.
14. Duncombe, T.A. Microfluidics: reframing biological enquiry [Text] / T. A. Duncombe, A.M. Tentori, A.E. Herr // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2015. – Vol.16. – P.554–567.
15. QX200™ Droplet Digital™ PCR System [Электронный ресурс] – Электрон. текстовые дан. – Режим доступа: <http://www.bio-rad.com/ru-ru/product/qx200-droplet-digital-pcr-system>, свободный.
16. RainDrop Plus™ Digital PCR System [Электронный ресурс] – Электрон. текстовые дан. – Режим доступа: <http://raindancetech.com/digital-pcr-tech/raindrop-digital-pcr-system/>, свободный.
17. Kiss, M.M High-throughput quantitative polymerase chain reaction in picoliter droplets [Text] / M.M Kiss, L. Ortoleva-Donnelly, N.R. Beer et al. // *Anal Chem.* – 2008. – Vol.80. – N.23. P.8975–8981.

18. Fang, X. Loop-Mediated Isothermal Amplification Integrated on Microfluidic Chips for Point-of-Care Quantitative Detection of Pathogens [Text] / X. Fang, Y. Liu, J. Kong, X. Jiang // *Anal. Chem.* – 2010. – Vol.82. – P.3002–3006.
19. Rashid, M. Recent developments in polymer microfluidic devices with capillary electrophoresis and electrochemical detection [Text] / M. Rashid, Y.-H. Dou, V. Auger, Z. Ali // *Micro and Nanosystems.* – 2010. – Vol.2. – N.2. – P.108–136.
20. Li, Y. Microfluidic chip-based technologies: emerging platforms for cancer diagnosis [Text] / Y. Li, W. Qi // *BMC Biotechnology.* – 2013. – Vol.13. – N.76. – P.10.
21. De Menech, M. Transition from squeezing to dripping in a microfluidic T-shaped junction [Text] / M. De Menech, P. Garstecki, F. Jousse, H.A. Stone // *Journal of fluid mechanics.* – 2008. – Vol.595. – P.141–161.
22. Holm, S. Experimental Biophysics, FFFN20, FYST23, FAF010F. [Электронный ресурс] / S. Holm – Электрон. текстовые дан. – Lund University. – 2013. Режим доступа: http://nanobio.ftf.lth.se/~biokurs/labs/Lab5_Droplets.pdf, свободный.
23. Dreyfus, R. Ordered and disordered patterns in two-phase flows in microchannels [Text] / R. Dreyfus, P. Tabeling, H. Willaime // *Physical review letters.* – 2003. – Vol.90. – N.14. – P.144–505.
24. Li, W. Screening of the effect of surface energy of microchannels on microfluidic emulsification [Text] / W. Li, Z. Nie, H. Zhang et al. // *Langmuir.* – 2007. – Vol.23. – N.15. – P.8010–8014.
25. Anna, S.L. Formation of dispersions using “flow focusing” in microchannels [Text] / S.L. Anna, N. Bontoux, H.A. Stone // *Applied physics letters.* – 2003. – Vol.82. – N.3. – P.364–366.
26. Zhu, Y. Analytical detection techniques for droplet microfluidics – A review [Text] / Y. Zhu, Q. Fang // *Analytica chimica acta.* – 2013. – Vol.787. – P.24–35.
27. Ahn, K. Electrocoalescence of drops synchronized by size-dependent flow in microfluidic channels [Text] / K. Ahn, J. Agresti, H. Chong, M. Marquez, D. A. Weitz // *Applied Physics Letters.* – 2006. – Vol.88. – N.26. – 3pp.
28. Schramm, L.L. Emulsions, Foams, and Suspensions: Fundamentals and Applications [Text] / L.L. Schramm // Wiley-VCH, Weinheim, Germany. – 2005. – P.463.
29. Joensson H. N. Droplet Microfluidics – A Tool for Single-Cell Analysis [Text] / H.N. Joensson, H.A. Svahn // *Angewandte Chemie International Edition.* – 2012. – V.51. – N.49. – P.12176–12192.
30. Baret, J.C. Surfactants in droplet-based microfluidics [Text] / J.C. Baret // *Lab on a Chip.* – 2012. – Vol.12. – N.3. – P.422–433.
31. Schaerli, Y. Continuous-flow polymerase chain reaction of single-copy DNA in microfluidic microdroplets [Text] / Y. Schaerli, R.C. Wootton, T. Robinson et. al. // *Analytical chemistry.* – 2008. – Vol.81. – N.1. – P.302–306.
32. ABIL EM180 [Электронный ресурс] – Электрон. текстовые дан. – Режим доступа: <http://www.surfachem.com/abil-em180>, свободный.
33. Roach L.S. Controlling nonspecific protein adsorption in a plug-based microfluidic system by controlling interfacial chemistry using fluorinated-phase surfactants [Text] / L.S. Roach, H. Song, R.F. Ismagilov // *Analytical chemistry.* – 2005. – Vol.77. – N.3. – P.785–796.
34. Holtze, C. Biocompatible surfactants for water-in-fluorocarbon emulsions [Text] / C. Holtze, A. C. Rowat, J. J. Agresti et al. // *Lab on a Chip.* – 2008. – Vol.8. – N.10. – P.1632–1639.
35. Derkach, S.R. Rheology of emulsions [Text] / S.R. Derkach // *Advances in Colloid and Interface Science.* – 2009. – Vol.151. – N.1. – P.1–23.

36. Anderson, R.R. Transient deflection response in microcantilever array integrated with polydimethylsiloxane (PDMS) microfluidics [Text] / R.R. Anderson, W. Hu, J.W. Noh et al. // *Lab on a Chip*. – 2011. – V.11. – N.12. – P.2088–2096.
37. Wang, F. Performance of nanoliter-sized droplet-based microfluidic PCR [Text] / F. Wang, M.A. Burns // *Biomedical microdevices*. – 2009. – Vol.11. – N.5. – P.1071–1080.
38. Manz, A. Micromachining of monocrystalline silicon and glass for chemical analysis systems A look into next century's technology or just a fashionable craze? [Text] / A. Manz, J.C. Fettinger, E. Verpoorte, H. Lüdi, H.M. Widmer, D.J. Harrison // *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. – 1991. – Vol.10. – N.5. – P.144–149.
39. Dolomite Microfluidics [Электронный ресурс] – Электрон. текстовые дан. – Режим доступа: <http://www.dolomite-microfluidics.com/>, свободный.
40. Micronit Microfluidics [Электронный ресурс] – Электрон. текстовые дан. – Режим доступа: <https://store.micronit.com/>, свободный.
41. Ren, K. Materials for Microfluidic Chip Fabrication [Text] / K. Ren, J. Zhou, H. Wu // *Acc. Chem. Res.* – 2013. – Vol.46. – N.11. – P.2396–2406.
42. Утешева, Г. Т. Акриловое стекло или поликарбонат [Электронный ресурс] / Г. Т. Утешева – Электрон. текстовые дан. – Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева, г. Астана, Казахстан – 2010. Режим доступа: <http://enu.kz/repository/repository2012/akrilovoe-steklo.pdf>, свободный.
43. Виткалова, И.А. Получение, свойства и применение поликарбоната [Электронный ресурс] / И.А. Виткалова, Е.С. Пикалов – Электрон. текстовые дан. – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Владимирский государственный университет имени Александра Григорьевича и Николая Григорьевича Столетовых" (ВлГУ) – 2017. Режим доступа: <http://www.scienceforum.ru/2017/pdf/33886.pdf>, свободный.
44. Duffy, D.C. Rapid Prototyping of Microfluidic Systems in Polydimethylsiloxane [Text] / D.C. Duffy, J.C. McDonald, O.J.A. Schueller, G.M. Whitesides // *Anal. Chem.* – 1998. – Vol.70. – P.4974–4984.
45. Lee S.W. Shrinkage ratio of PDMS and its alignment method for the wafer level process [Text] / S.W. Lee, S.S. Lee // *Microsystem Technol.* – 2008. – Vol.14. – P.205–208.
46. Полидиметилсилоксан [Электронный ресурс] – Электрон. текстовые дан. – Режим доступа: <http://www.sgrus.ru/products/polidimetilsiloksan-p/>, свободный.
47. Almutairi, Z. Evaluation of poly(dimethylsiloxane) (PDMS) surface modification approaches for microfluidic applications [Text] / Z. Almutairi, C.L. Ren, L. Simon // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. – 2012. – Vol.415. – P.406–412.
48. Lycans, R.M. Plasma treatment of PDMS for applications of in vitro motility assays [Text] / R.M. Lycans, C.B. Higgins, M.S. Tanner et al. // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2013. – Vol.116. – P.687–694.
49. Koh, K.S. Quantitative Studies on PDMS-PDMS Interface Bonding with Piranha Solution and its Swelling Effect [Text] / K.S. Koh, J. Chin, J. Chia et al. // *Micromachines*. – 2012. – Vol.3. – P.427–441.
50. Lee, J.N. Solvent Compatibility of Poly(dimethylsiloxane)-Based Microfluidic Devices [Text] / J.N. Lee, C. Park, G.M. Whitesides // *Anal. Chem.* – 2003. – Vol.75. – P.6544–6554.

51. 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.
52. Shiu, P.P. Rapid fabrication of tooling for microfluidic devices via laser micromachining and hot embossing [Text] / P.P. Shiu, G.K. Knopf, M. Ostojic, S. Nikumb // *J. Micromechanics and Microengineering*. – 2008. – Vol.18. – N.2. – P.1769–1771.
53. Hsieh, Y. Direct Micromachining of Microfluidic Channels on Biodegradable Materials Using Laser Ablation [Text] / Y. Hsieh, S. Chen, W. Huang et al. // *Polymers*. – 2017. – Vol.9. – N.7. – P.242.
54. Mali, P. Facile fabrication of microfluidic systems using electron beam lithography [Text] / P. Mali, A. Sarkar, R. Lal // *Lab Chip*. – 2006. – Vol.6. – P.310–315.
55. Бхушан, Б. Справочник Шпрингера по нанотехнологиям. [Текст] / Б. Бхушан // М.: Техносфера. – 2010. – Т.1. – С.862.
56. Vaezi, M. A review on 3D micro-additive manufacturing technologies [Text] / M. Vaezi, H. Seitz, S. Yang // *Int J Adv Manuf Technol*. – 2013. – V.67. – P.1721–1754.
57. Gross, B.C. Evaluation of 3D Printing and Its Potential Impact on Biotechnology and the Chemical Sciences [Text] / B.C. Gross, J.L. Erkal, S.Y. Lockwood, C. Chen, D.M. Spence // *Anal. Chem*. – 2014. – Vol.86. – N.7. – P.3240–3253.
58. Yazdi, A.A. 3D printing: an emerging tool for novel microfluidics and lab-on-a-chip applications [Text] / A.A. Yazdi, A. Popma, W. Wong, T. Nguyen, Y. Pan, J. Xu // *Microfluid Nanofluid*. – 2016. – Vol.20. – N.3. – P.1–18.
59. Wilson, M.E. Fabrication of circular microfluidic channels by combining mechanical micromilling and soft lithography [Text] / M.E. Wilson, N. Kota, Y. Kim et al. // *Lab Chip*. – 2011. – Vol.11. – P.1550–1555.
60. Анисимов, С.И., Лукьянчук Б.С. Избранные задачи теории лазерной абляции / С.И. Анисимов, Б.С. Лукьянчук // УФН. – 2004. – Т.172. – N.36. – С.301–330.
61. Lin, T. 3D printed metal molds for hot embossing plastic microfluidic devices [Text] / T. Lin, T. Do, P. Kwon, P.B. Lillehoj // *Lab Chip*. – 2017. – Vol.17. – P.241–247.
62. Narasimhan, J. Polymer embossing tools for rapid prototyping of plastic microfluidic devices [Text] / J. Narasimhan, I. Papautsky // *J. Micromech. Microeng*. – 2004. – Vol.14. – P.96–103.
63. Xia, Y. Soft Lithography [Text] / Y. Xia, G.M. Whitesides // *Angew. Chem. Int. Ed*. – 1998. – Vol.37. – P.550–575.
64. Sollier, E. Rapid prototyping polymers for microfluidic devices and high pressure Injections [Text] / E. Sollier, C. Murray, P. Maoddi, D.D. Carlo // *Lab Chip*. – 2011. – Vol.11. – P.3752–3765.
65. Chen, Y. Conformal coating of parylene for surface anti-adhesion in polydimethylsiloxane (PDMS) double casting technique [Text] / Y. Chen, W. Pei, R. Tang et al. // *Sensors and Actuators A*. – 2013. – Vol.189. – P.143–150.
66. Shao, G. Fabrication of elastomeric high-aspect-ratio microstructures using polydimethylsiloxane (PDMS) double casting technique [Text] / G. Shao, J. Wu, Z. Cai, W. Wang // *Sensors and Actuators A*. – 2012. – Vol.178. – P.230–236.
67. Gitlin, L. Rapid replication of master structures by double casting with PDMS [Text] / L. Gitlin, P. Schulze, D. Belder // *Lab Chip*. – 2009. – Vol.9. – P.3000–3002.
68. Waldbaur, A. Let there be chip—towards rapid prototyping of microfluidic devices: one-step manufacturing processes [Text] / A. Waldbaur, H. Rapp, K. Lange, B.E. Rapp // *Anal. Methods*. – 2011. – Vol.3. – P.2681–2716.

69. Koerner, T. Epoxy resins as stamps for hot embossing of microstructures and microfluidic channels [Text] / T. Koerner, L. Brown, R. Xie, R. D. Oleschuk // *Sensors and Actuators B.* – 2005. – Vol.107. – P.632–639.
70. Sethu, P. Cast epoxy-based microfluidic systems and their application in biotechnology [Text] / P. Sethu, C.H. Mastrangel // *Sensors and Actuators B.* – 2004. – Vol.98. – P.337–346.
71. 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.
72. Cadarso, V.J. Direct writing laser of high aspect ratio epoxy microstructures [Text] / V.J. Cadarso, K. Pfeiffer, U. Ostrzinski et al. // *J. Micromech. and Microeng.* – 2010. – Vol.21. – N.1. – 6pp.
73. Yang, C. Investigation on the mechanism of nitrogen plasma modified PDMS bonding with SU-8 [Text] / C. Yang, Y.J. Yuan // *Applied Surface Science.* – 2016. – Vol.364. – P.815–821.
74. Tsao, C.W. Bonding of thermoplastic polymer microfluidics [Text] / C.W. Tsao, D.L. DeVoe // *Microfluid. Nanofluid.* – 2009. – Vol.6. – P1–16.
75. Roy, S. Thermal bonding of microfluidic devices: Factors that affect interfacial strength of similar and dissimilar cyclic olefin copolymers [Text] / S. Roy, C.Y. Yue, Z.Y. Wang, L. Ananda // *Sens. Actuators B Chem.* – 2012. – Vol.161. – P.1067–1073.
76. Sun, Y. Low-pressure, high-temperature thermal bonding of polymeric microfluidic devices and their applications for electrophoretic separation [Text] / Y. Sun, Y. C. Kwok, N.T. Nguyen // *J. Micromech. Microeng.* – 2006. – Vol.16. – P.1681–1688.
77. Yu, H. Rapid bonding enhancement by auxiliary ultrasonic actuation for the fabrication of cyclic olefin copolymer (COC) microfluidic devices [Text] / H. Yu, S.B. Tor, N.H. Loh // *J. Micromech. Microeng.* – 2014. – Vol.24. – 11pp.
78. Yu, H. Low temperature and deformation-free bonding of pmma microfluidic devices with stable hydrophilicity via oxygen plasma treatment and PVA coating [Text] / H. Yu, Z.Z. Chong, S.B. Tor, N.H. Loh // *RSC Adv.* – 2015. – Vol.5. – P.8377–8388.
79. Tsao, C.W. Low temperature bonding of PMMA and COC microfluidic substrates using UV/ozone surface treatment [Text] / C.W. Tsao, L. Hromada, J. Liu, P. Kumar, D.L. DeVoe // *Lab Chip.* – 2007. – Vol.7. – P.499–505.
80. Shinohara, H. Studies on low-temperature direct bonding of VUV, VUV/O₃ and O₂ plasma pretreated cyclo-olefin polymer [Text] / H. Shinohara, J. Mizuno, S. Shoji // *Sens. Actuators A Phys.* – 2011. – Vol.165. – P.124–131.
81. Keller, N. Tacky cyclic olefin copolymer: A biocompatible bonding technique for the fabrication of microfluidic channels in COC [Text] / N. Keller, T.M. Nargang, M. Runck, et al. // *Lab Chip* – 2016. – Vol.16. – P.1561–1564.
82. Wan, A.M.D. Liquid phase solvent bonding of plastic microfluidic devices assisted by retention grooves [Text] / A.M.D. Wan, A. Sadri, E.W.K. Young // *Lab Chip.* – 2015. – Vol.15. – P.3785–3792.
83. Salvo, P. Adhesive bonding by SU-8 transfer for assembling microfluidic devices [Text] / P. Salvo, R. Verplancke, F. Bossuyt et al. // *Microfluid. Nanofluid.* – 2012. – Vol.13. – P.987–991.
84. Lu, C.M. Packaging of microfluidic chips via interstitial bonding [Text] / C.M. Lu, L.J. Lee, Y.J. Juang // *Electrophoresis.* – 2008. – Vol.29. – P.1407–1414.
85. Lai, S. A packaging technique for polymer microfluidic platforms [Text] / S. Lai, X. Cao, L.J. Lee // *Anal. Chem.* – 2004. – Vol.76. – P.1175–1183.

86. Toossi, A. Bonding pmma microfluidics using commercial microwave ovens [Text] / A. Toossi, H. Moghadas, M. Daneshmand, D. Sameoto // *J. Micromech. Microeng.* – 2015. – Vol.25. – 11pp.
87. Sunkara, V. Simple room temperature bonding of thermoplastics and poly(dimethylsiloxane) [Text] / V. Sunkara, D.-K. Park, H. Hwang et al. // *Lab Chip.* – 2011. – Vol.11. – P.962–965.
88. Kim, K. The optimization of PDMS-PMMA bonding process using silane primer [Text] / K. Kim, S.W. Park, S.S. Yang. // *BioChip J.* – 2010. – Vol.4. – N.2. – P.148–154.
89. Wu, J. One-step surface modification for irreversible bonding of various plastics with a poly(dimethylsiloxane) elastomer at room temperature [Text] / J. Wu, N.Y. Lee // *Lab Chip.* – 2014. – Vol.14. – N.9. – P.1564–1571.
90. Vlachopoulou, M.-E. A low temperature surface modification assisted method for bonding plastic substrates [Text] / M.-E. Vlachopoulou, A. Tserepi, P. Pavli et al. // *J. Micromech. Microeng.* – 2009. – Vol.19. – 6pp.
91. Tang, L. A facile route for irreversible bonding of plastic-PDMS hybrid microdevices at room temperature [Text] / L. Tang, N.Y. Lee // *Lab Chip.* – 2010. – Vol.10. – P.1274–1280.
92. Brown, L. Fabrication and characterization of poly(methylmethacrylate) microfluidic devices bonded using surface modifications and solvents [Text] / L. Brown, T. Koerner, J.H. Horton, R.D. Oleschuk // *Lab Chip.* – 2006. – Vol.6. – P.66–73.
93. Tran, H.H. Ethanol and UV-assisted instantaneous bonding of PMMA assemblies and tuning in bonding reversibility [Text] / H.H. Tran, W. Wu, N.Y. Lee // *Sensors and Actuators B.* – 2013. – Vol.181. – P.955–962.
94. Yu, H. Low temperature and deformation-free bonding of PMMA microfluidic devices with stable hydrophilicity via oxygen plasma treatment and PVA coating [Text] / H. Yu, Z.Z. Chong, S.B. Tor et al. // *RSC Adv.* – 2015. – Vol.5. – P.8377–8388.
95. Temiz, Y. Lab-on-a-chip devices: How to close and plug the lab? [Text] / Y. Temiz, R.D. Lovchik, G.V. Kaigala, E. Delamarche // *Microelectron. Eng.* – 2015. – Vol.132. – P.156–175.
96. Van Heeren, H. Standards for connecting microfluidic devices? [Text] / H. Van Heeren // *Lab Chip.* – 2012. – Vol.12. – P.1022–1025.
97. Chen, C.F. High-pressure needle interface for thermoplastic microfluidics [Text] / C.F. Chen, J. Liu, L.P. Hromada, C.W. Tsao, C.C. Chang, D.L. DeVoe // *Lab Chip.* – 2009. – Vol.9. – P.50–55.
98. Wilhelm, E. Connecting microfluidic chips using a chemically inert, reversible, multichannel chip-to-world-interface [Text] / E. Wilhelm, C. Neumann, T. Duttonhofer, L. Pires, B.E. Rapp // *Lab Chip.* – 2013. – Vol.13. – P.4343–4351.
99. Makamba, H. Surface modification of poly(dimethylsiloxane) microchannels. [Text] / H. Makamba, J.H. Kim, K. Lim et al. // *Electrophoresis.* – 2003. – Vol.24. – P.3607–3619.
100. Owen, M.J. Plasma treatment of polydimethylsiloxane [Text] / M. J. Owen, P.J. Smith // *Journal of Adhesion Science and Technology.* – 1994. – Vol.8. – N.10. – P.1063–1075.
101. Yoshida, S. Surface modification of polymers by plasma treatments for the enhancement of biocompatibility and controlled drug release [Text] / S. Yoshida, K. Hagiwara, T. Hasebe, A. Hotta // *Surface and Coatings Technology.* – 2013. – Vol.233. – P.99–107.
102. Huang, Z.H. Plasma surface treatment to improve the adhesion strength of metal to polymers [Text] / Z.H. Huang, V.A. Handara // *SIMTech technical reports.* – 2011. – Vol.12. – N.1. – P.33–36.
103. Reichen, P. Remote Plasma Device for Surface Modification at Atmospheric Pressure [Text] / P. Reichen, A. Sonnenfeld, P.R. von Rohr // *Plasma Process. Polym.* – 2009. – Vol.6. – P.382–386.

104. Kumlangdudsana, P. Surface Modification of Microfluidic Devices / P. Kumlangdudsana, S.T. Dubas, L. Dubas // *J. of Metals, Materials and Minerals*. – 2007. – Vol.17. – N.2. – P.67–74.
105. Xiong, L. Adhesion promotion between PDMS and glass by oxygen plasma pre-treatment [Text] / L. Xiong, P. Chen, Q. Zhou // *Journal of Adhesion Science and Technology*. – 2014. – Vol.28. – N.11. – P.1046–1054.
106. Vlachopoulou, M. E. Plasma etching of poly(dimethylsiloxane): roughness formation, mechanism, control, and application in the fabrication of microfluidic structures [Text] / M.E. Vlachopoulou, G. Kokkoris, C. Cardinaud, E. Gogolides, A.Tserepi // *Plasma Process. Polym.* – 2013. – Vol.10. – P.29–40.
107. Jokinen, V. Oxygen and nitrogen plasma hydrophilization and hydrophobic recovery of polymers. [Text] / V. Jokinen, P. Suvanto, S. Franssila // *Biomicrofluidics*. – 2012. – Vol.6. – 10 pp.
108. Ясуда, Х. Полимеризация в плазме [Текст] / Х. Ясуда // *М : Мир*. – 1988. – С.374.
109. Johansson, B.-L. Characterization of air plasma-treated polymer surfaces by ESCA and contact angle measurements for optimization of surface stability and cell growth [Text] / B.-L. Johansson, A.Larsson // *J. Appl. Polym. Sci.* – 2002. – Vol.86. – N.10. – P.2618–2625.
110. Liu J. Surface-Modified Poly(methyl methacrylate) Capillary Electrophoresis Microchips for Protein and Peptide Analysis [Text] / J. Liu, T. Pan, A.T. Woolley // *Anal. Chem.* – 2004. – Vol.76. – N.23. – P.6948–6955.
111. Groning, P. Plasma modification of polymethylmethacrylate and polyethyleneterephthalate surfaces [Text] / P. Groning, M. Collaud, G. Dietler // *J. Appl. Phys.* – 1994. – Vol.76. – N.2. – P.887–892.
112. Steen, M.L. Identification of Gas-Phase Reactive Species and Chemical Mechanisms Occurring at Plasma–Polymer Surface Interfaces [Text] / M.L. Steen, C.I. Butoi, E.R. Fisher // *Langmuir*. – 2001. – Vol.17. – N.26. – P.8156–8166.
113. Kaczorowski, W. Effect of plasma treatment on the surface properties of polydimethylsiloxane [Text] / W. Kaczorowski, W. Szymanski, D. Batory, P. Niedzielski // *J. Appl. Polym. Sci.* – 2015. – Vol.132. – 8pp.
114. Yan, J. Monodisperse Water-in-Oil-in-Water (W/O/W) Double Emulsion Droplets as Uniform Compartments for High-Throughput Analysis via Flow Cytometry [Text] / J. Yan, W.-A. C. Bauer, M. Fischlechner // *Micromachines*. – 2013. – V.4. – P.402–413.
115. Romanowsky, M. B. Functional patterning of PDMS microfluidic devices using integrated chemo-masks / M.B. Romanowsky, M. Heymann, A.R. Abate et al. // *Lab on a Chip*. – 2010. – V.10. – N.12. – P.1521–1524.
116. Hwang S. Regioselective surface modification of PDMS microfluidic device for the generation of monodisperse double emulsions [Text] / S. Hwang, C.H. Choi, C.S. Lee // *Macromolecular Research*. – 2012. – Vol.20. – N.4. – P.422–428.
117. Износостойкость трибореактопластов на основе отвержденных эпоксидных смол. [Электронный ресурс] – Электрон. текстовые дан. – Режим доступа: <http://www.newreferat.com/ref-4952-16.html>, свободный.
118. Шишелова Т.И., Практикум по спектроскопии. Вода в минералах [Text]: учебное пособие / Т.И. Шишелова, Т.В. Созинова, А.Н. Коновалова // Академия Естествознания. – 2010. – 88 с.
119. Юхневич Г.В. Инфракрасная спектроскопия воды [Текст] / Г.В. Юхневич // М.: Изд. Наука. – 1973. – 207 с.

120. Карякин А.В. Состояние воды в органических и неорганических соединениях [Текст] / А.В. Карякин, Г.А. Кривенцова // М.: Изд. Наука. – 1973. – 175 с.
121. Coates J. Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach in Encyclopedia of Analytical Chemistry [Text] / J. Coates // Ed. R.A. Meyers John Wiley & Sons Ltd, Chichester. – 2000. – P.10815–10837.
122. Cai, D.K. Optical absorption in transparent PDMS materials applied for multimode waveguides fabrication [Text] / D.K. Cai., A. Neyer, R. Kuckuk, H.M. Heise // Optical Materials. – 2008. – Vol.30. – P.1157–1161.
123. Cai, D. Raman, mid-infrared, near-infrared and ultraviolet–visible spectroscopy of PDMS silicone rubber for characterization of polymer optical waveguide materials [Text] / D.K. Cai., A. Neyer, R. Kuckuk, H.M. Heise // Journal of Molecular Structure. – 2010. – Vol.976. – P.274–281.
124. Gonzalez, M.G. Applications of FTIR on Epoxy Resins – Identification, Monitoring the Curing Process, Phase Separation and Water Uptake [Text] / ed. T. Theophanides. – Infrared Spectroscopy – Materials Science, Engineering and Technology. – InTech, 2012. – 524 p. – ISBN: 978-953-51-0537-4.
125. Bengtsson, E. Creating super hydrophobic surfaces for moisture protection of biobased composites [Text] / E. Bengtsson // Master of Science Thesis. Gothenburg. – 2013. – 42 p.
126. Verplanck, N. Wettability Switching Techniques on Superhydrophobic Surfaces [Text] / N. Verplanck, Y. Coffinier, V. Thomy et al. // Nanoscale Res Lett. – 2007. – Vol.2. – P.577–596.
127. Yuan, Y. Contact Angle and Wetting Properties [Text] / Y. Yuan, T.R. Lee, G. Bracco et al. // Surface Science Techniques. – Genoa. – 2013. – Vol.51. – P.3–34.
128. Сумм Б.Д., Горюнов Ю.В. Физико-химические основы смачивания и растекания [Текст] / Б.Д. Сумм, Ю.В. Горюнов // М.: Химия. – 1976. – 232 с.
129. Surface Modification Coatings [Электронный ресурс] – Электрон. текстовые дан. – Режим доступа: <http://iestechsales.net/wp-content/uploads/2017/08/SurfaceModificationDial.pdf>, свободный.
130. Da Silva, M.F.P. Analysis of contact angle in capillary invasion [Text] / M.F.P. da Silva, R. Surmas, L.O.E. dos Santos et al. // Thesis of 18th International Congress of Mechanical Engineering. – Ouro Preto. – 2005. – 6pp.
131. Tan, S.H. Oxygen plasma treatment for reducing hydrophobicity of a sealed polydimethylsiloxane microchannel [Text] / S.H. Tan, N.T. Nguyen, Y.C. Chua et al. // Biomicrofluidics. – 2010. – Vol. 4. – 8pp.
132. Sharfeddin, A. Comparison of the macroscale and microscale tests for measuring elastic properties of polydimethylsiloxane [Text] / A. Sharfeddin, A.A. Volinsky, G. Mohan, N.D. Gallant // J. Appl. Polym. Sci. – 2015. – Vol.132. – 8pp.
133. Wang, Z. Crosslinking Effect on Polydimethylsiloxane Elastic Modulus Measured by Custom-Built Compression Instrument [Text] / Z. Wang, A.A. Volinsky, N.D. Gallant // Inc. J. Appl. Polym. Sci. – 2014. – Vol.131. – 4pp.
134. Derjaguin, B.V. Effect of contact deformations on the adhesion of particles. [Text] / B.V. Derjaguin, V.M Muller, Y.P. Toporov // Colloid Interface Sci. – 1975. – Vol.53. – P.314–326.
135. Avram, M. Plasma Surface Modification for Selective Hydrophobic Control [Text] / M. Avram, A.M. Avram, A. Bragaru et al. // Romanian journal of information science and technology. – 2008. – Vol.11. – P.409–422.

136. Slepicka, P. Surface characterization of plasma treated polymers for applications as biocompatible carriers [Text] / P. Slepicka, N. Slepicková-Kasálková, E. Stránská et al. // eXPRESS Polymer Letter. – 2013. – Vol.7. – P.535–545.
137. 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. Евстапов // Научное приборостроение. – 2016. – Т.26. –N.1. – С.41–46.
138. Maji, D. Study of hydrophilicity and stability of chemically modified PDMS surface using piranha and KOH solution [Text] / D. Maji, S.K. Lahiri, S. Das // Surf. Interface Anal. – 2012. – Vol.44. – P.62–69.
139. Park, J.Y.I, Surface chemistry modification of PDMS elastomers with boiling water improves cellular adhesion [Text] / J.Y.I Park, D. Ahn, Y.Y. Choi et al. // Sensors and Actuators B: Chemical. – 2012. – Vol.173. – P.765–771.
140. Wu, D. Multilayer poly(vinyl alcohol)-adsorbed coating on poly(dimethylsiloxane) microfluidic chips for biopolymer separation [Text] / D. Wu, Y. Luo, X. Zhou et al. // Electrophoresis. – 2005. – Vol.26. – P.211–218.
141. Pinto, S. Poly(dimethyl siloxane) surface modification by low pressure plasma to improve its characteristics towards biomedical applications [Text] / S. Pinto, P. Alves, C.M. Matos et al // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2010. – Vol.81. – P.20–26.
142. Fleger, M. PDMS microfluidic chip with integrated waveguides for optical detection [Text] / M. Fleger, A. Neyer // Microelectronic Engineering. – 2006. – Vol.83. – P.1291–1293.
143. Fluorophore Reference Guide [Электронный ресурс] – Электрон. текстовые дан. – Режим доступа: http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_2421.pdf, свободный.
144. EvaGreen® Fluorescent DNA Stain [Электронный ресурс] – Электрон. текстовые дан. – Режим доступа: <https://www.jenabioscience.com/images/PDF/PCR-352.pdf>, свободный.
145. Lee, J.B. Innovative SU-8 lithography techniques and their applications [Text] / J.B. Lee, K.-H. Choi, K Yoo // Micromachines. – 2015. – Vol.6. – P.1–18.
146. 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.
147. Разбавитель для силикона DC 200 [Электронный ресурс] – Электрон. текстовые дан. – Режим доступа: <https://lassospb.ru/products/8047921>, свободный.
148. 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.
149. Nüsser, C. Pulsed laser micro polishing of metals using dual-beam technology [Text] / C. Nüsser, H. Sändker, E. Willenborg // Physics Procedia (Lasers in Manufacturing Conference 2013). – 2013. – Vol.41. – P.346–355.
150. Nüsser, C. Influence of Intensity Distribution and Pulse Duration on Laser Micro Polishing [Text] / C. Nüsser, I. Wehrmannb, E. Willenborg // Physics Procedia. – 2011. – Vol.12. – P.462–471.
151. Электролитно-плазменная полировка [Электронный ресурс] – Электрон. текстовые дан. – Режим доступа: <http://acea-spb.ru/elektroplazmennoe-polirovanie>, свободный.
152. МиниМаркер 2-20A4 [Электронный ресурс] – Электрон. текстовые дан. – Режим доступа: <http://newlaser.ru/laser/lc/minimarker2-20a4.php>, свободный.

153. Штрих 013 Установка лазерной гравировки [Электронный ресурс] – Электрон. текстовые дан. – Режим доступа: <http://www.sinstr.ru/products/lazernoe/shtrikh-013/>, свободный
154. Плазменная обработка металла в электролите [Электронный ресурс] – Электрон. текстовые дан. – Режим доступа: <http://plasmacraft.ru/plazmennaya-obrabotka-metalla-v-elektrolite-kak-eto-rabotaet>, свободный.
155. Лукашенко, Т.А. Способы спекания, склеивания и химической сварки растворителем при изготовлении полимерных и полимер-стеклянных микрочиповых устройств [Текст] / Т.А. Лукашенко, А.Н. Тупик, Г.Е. Рудницкая и др. // Научное приборостроение. – 2016. – Т.26. – N.2. – С.64–74.
156. Handbook of Capillary and Microchip Electrophoresis and Associated Microtechniques [Text] / Ed. J.P. Landers. – CRC Press. – 2007. – P.1592. – ISBN: 978-0 84933-329-3.
157. Carey, L. Trends in DNA forensic analysis [Text] / L. Carey, L. Mitnik // Electrophoresis. – 2002. – Vol.23. – N.10. – P.1386–1397.
158. Wua, D. Electrophoretic separations on microfluidic chips [Text] / D. Wua, J. Qin, B. Lin // Journal of Chromatography A. – 2008. – Vol.1184. – N.1-2. – P.542–559.
159. Kenyon, S.M. Recent developments in electrophoretic separations on microfluidic devices [Text] / S.M. Kenyon, M.M. Meighan, M.A Hayes // Electrophoresis. – 2011. – Vol.32. – P.482–493.
160. Fritzsche, S. Chip electrophoresis with mass spectrometric detection in record speed [Text] / S. Fritzsche, P. Hoffmann, D. Belder // Lab Chip. – 2010. – Vol.10. – N.10. – P.1227–1230.
161. Kolchinsky, A. Analysis of SNPs and other genomic variations using gel-based chips [Text] / A. Kolchinsky, A. Mirzabekov // Hum. Mutat. – 2002. – Vol.19. – P.343–360.
162. Paegel, B.M. Microfluidic devices for DNA sequencing: sample preparation and electrophoretic analysis [Text] / B.M. Paegel, R.G. Blazej, R.A. Mathies // Curr. Opin. Biotechnol. – 2003. – Vol.14. – P.42–50.
163. Huang, X. Current-Monitoring Method for Measuring the Electroosmotic Flow Rate in Capillary Zone Electrophoresis [Text] / X. Huang, M.J. Gordon, R.N. Zare // Analytical Chemistry. – 1988. – Vol.60. – P.1837–1838.

Приложение А

Таблица А.1 – Зависимость относительной деформации образцов ПДМС Sylgard[®] 184 (диаметром 5 мм) от приложенной нагрузки (сжатие) (режим отверждения 65 °С 4 ч)

Соотношение основа : отвердитель	Высота образца, м	Нагрузка			
		0,05 кг	0,1 кг	0,15 кг	0,2 кг
		Относительная деформация $\Delta L/L_0$			
10:1	h ₁ =0,0036	0,010	0,022	0,033	0,047
	h ₂ =0,0035	0,011	0,023	0,034	0,046
	h ₃ =0,0037	0,011	0,024	0,035	0,047
Ср.знач. ±СКО		0,011±0,001	0,023±0,001	0,034±0,001	0,047±0,001
20:1	h ₁ =0,004	0,029	0,068	0,098	0,125
	h ₂ =0,0041	0,029	0,061	0,098	0,127
	h ₃ =0,004	0,030	0,063	0,098	0,128
Ср.знач. ±СКО		0,029±0,001	0,064±0,003	0,098±0,001	0,126±0,001
3:1	h ₁ =0,0035	0,017	0,04	0,06	0,08
	h ₂ =0,0037	0,019	0,039	0,061	0,078
	h ₃ =0,0036	0,019	0,042	0,063	0,081
Ср.знач. ±СКО		0,019±0,001	0,040±0,001	0,061±0,001	0,080±0,001

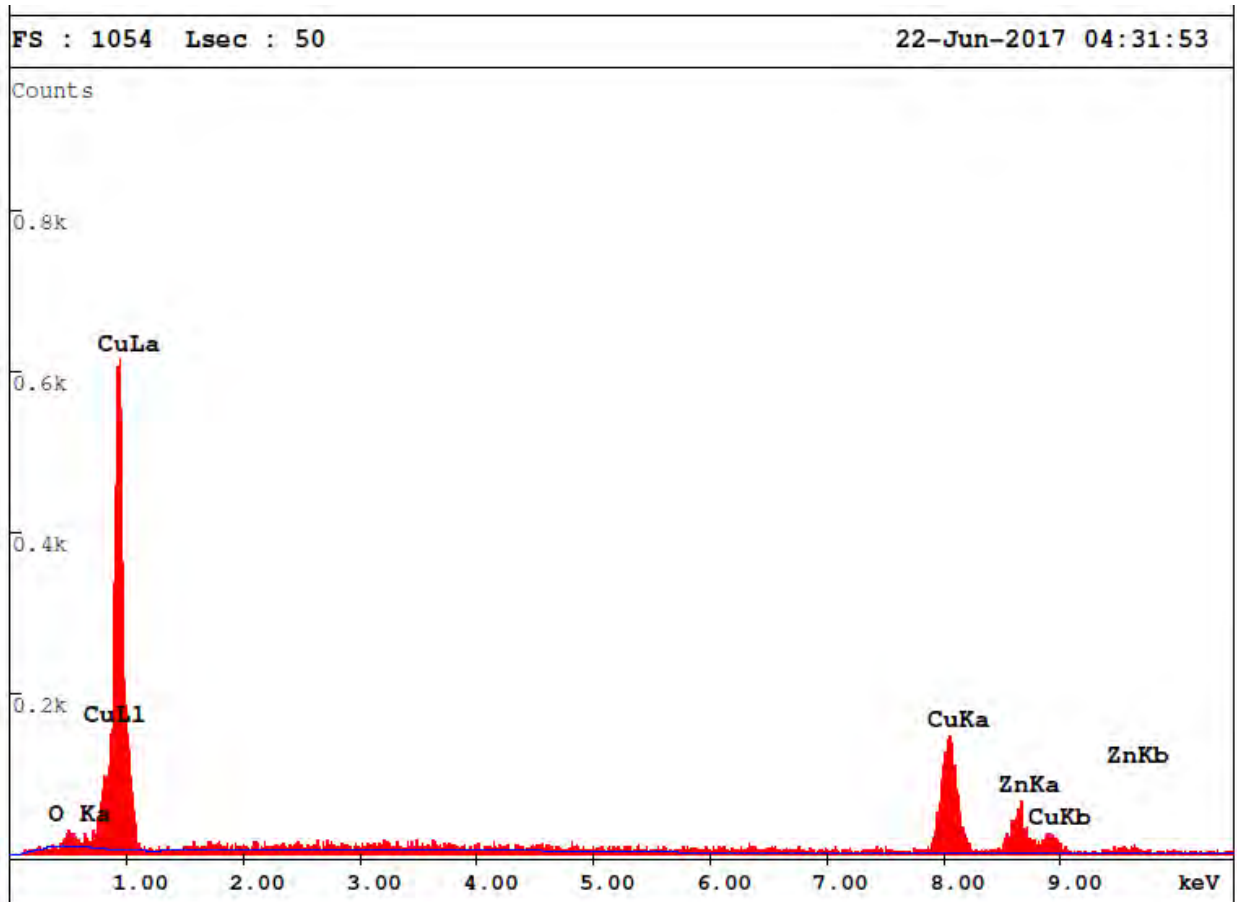
Таблица А.2 – Зависимость относительной деформации образцов Lasil T-4 (диаметром 5 мм) от приложенной нагрузки (сжатие)

Соотношение основа : отвердитель	Высота образца, м	Нагрузка			
		0,05 кг	0,1 кг	0,15 кг	0,2 кг
		Относительная деформация $\Delta L/L_0$			
режим отверждения 65 °С, 4 ч					
10:1 \ h ₁ =0,0037 h ₂ =0,0037 h ₃ =0,0036	h ₁ =0,0037	0,014	0,024	0,041	0,050
	h ₂ =0,0037	0,014	0,024	0,037	0,051
	h ₃ =0,0036	0,017	0,025	0,042	0,053
Ср.знач. ±СКО		0,015±0,002	0,025±0,001	0,040±0,003	0,051±0,001
10:1+10% разбавителя \ h ₁ =0,0035 h ₂ =0,0034 h ₃ =0,0034	h ₁ =0,0035	0,020	0,039	0,057	0,074
	h ₂ =0,0034	0,019	0,038	0,056	0,074
	h ₃ =0,0034	0,021	0,035	0,056	0,074
Ср.знач. ±СКО		0,020±0,001	0,037±0,002	0,056±0,001	0,074±0,001
режим отверждения 25 °С, 24 ч					
10:1 25 °С 24 ч h ₁ =0,0034 h ₂ =0,0035 h ₃ =0,0034	h ₁ =0,0034	0,012	0,024	0,035	0,047
	h ₂ =0,0035	0,011	0,026	0,037	0,005
	h ₃ =0,0034	0,012	0,024	0,038	0,053
Ср.знач. ±СКО		0,012±0,001	0,024±0,001	0,037±0,002	0,050±0,003

Таблица А.3 – Зависимость относительной деформации образцов Пентэласт®-712 (диаметром 5 мм) от приложенной нагрузки (сжатие) (режим отверждения 25 °С 70 ч)

Соотношение основа : отвердитель	Высота образца, м	Нагрузка			
		0,05 кг	0,1 кг	0,15 кг	0,2 кг
		Относительная деформация $\Delta L/L_0$			
20:1 h ₁ =0,0038 h ₂ =0,0038 h ₃ =0,0038	h ₁ =0,0038	0,021	0,040	0,055	0,072
	h ₂ =0,0038	0,021	0,034	0,055	0,074
	h ₃ =0,0038	0,022	0,038	0,058	0,076
Ср.знач.±СКО		0,022±0,001	0,037±0,003	0,056±0,002	0,074±0,002

Приложение Б

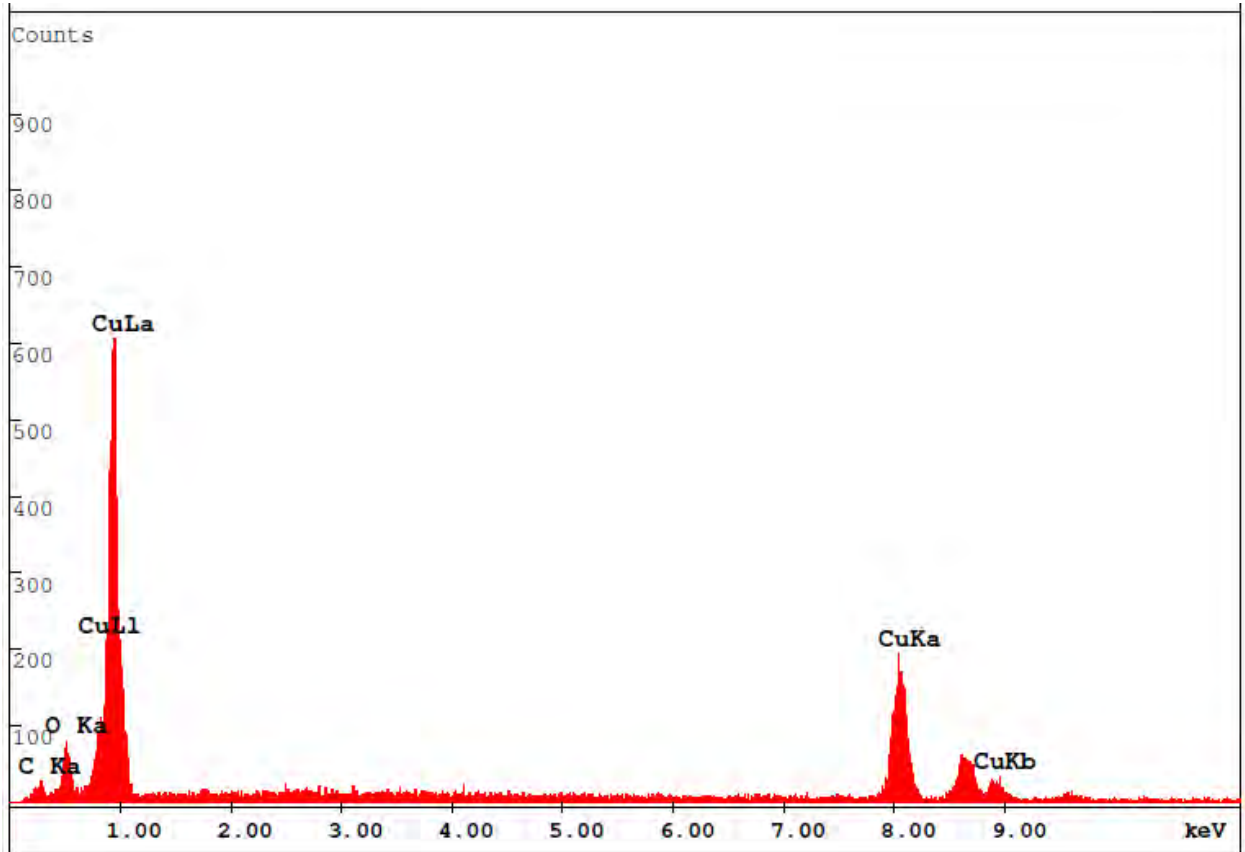


EDAX ZAF Quantification (Standardless)
 Element Normalized
 SEC Table : Default

Elem	Wt %	At %	K-Ratio	Z	A	F
O K	3.23	11.80	0.0115	1.1879	0.2986	1.0025
CuK	67.65	62.18	0.6705	0.9911	0.9999	1.0000
ZnK	29.12	26.01	0.2897	0.9932	1.0017	1.0000
Total	100.00	100.00				

Element	Net Inte.	Backgrd	Inte. Error	P/B
O K	2.54	1.66	13.48	1.53
CuK	39.16	0.32	2.28	122.38
ZnK	13.82	0.32	3.89	43.19

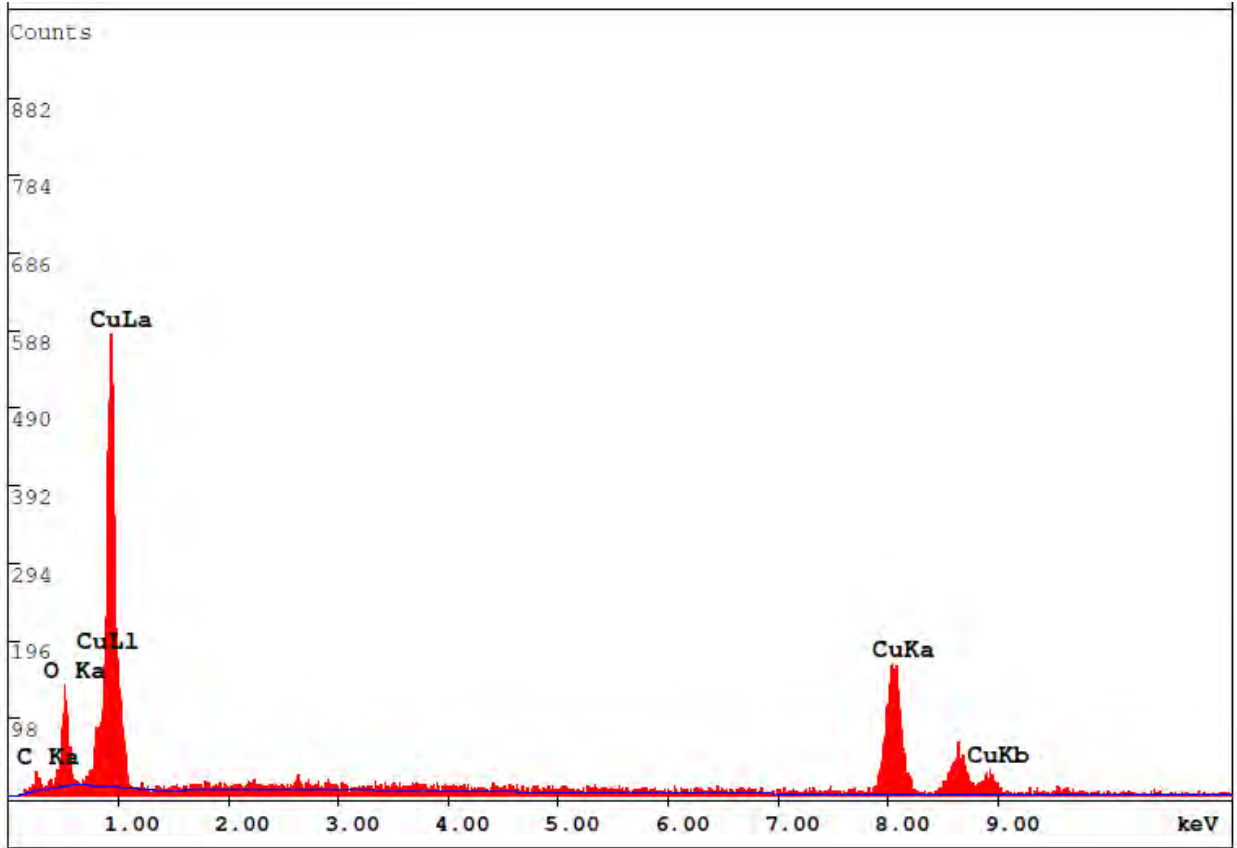
Рисунок Б.1 – Результаты рентгеноспектрального микроанализа исходного образца мастер-формы из LC59-1 на растровом электронном микроскопе Quanta Inspect с приставкой рентгеновского микроанализа EDAX (фирмы FEI)



Elem	Wt %	At %	K-Ratio	Z	A	F
C K	12.66	35.73	0.0231	1.1542	0.1577	1.0003
O K	11.16	23.64	0.0363	1.1344	0.2858	1.0022
CuK	76.18	40.63	0.7198	0.9407	1.0045	1.0000
Total	100.00	100.00				

Element	Net Inte.	Backgrd	Inte. Error	P/B
C K	1.78	0.72	14.26	2.47
O K	8.02	1.50	5.85	5.35
CuK	42.08	0.42	2.20	100.19

Рисунок Б.2 – Результаты рентгеноспектрального микроанализа образца мастер-формы из ЛС59-1 после электронно-лучевой обработки (доза 300 КГр) на растровом электронном микроскопе Quanta Inspect с приставкой рентгеновского микроанализа EDAX (фирмы FEI)



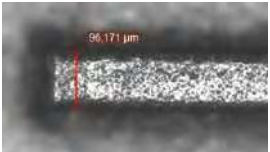
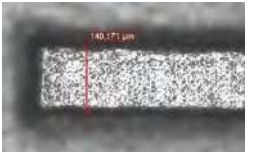
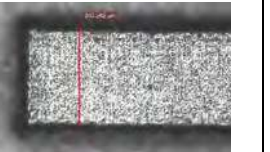
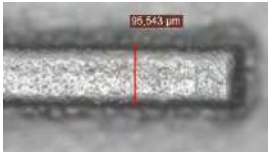
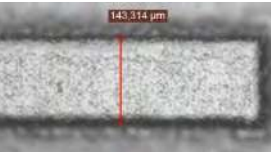


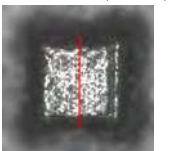
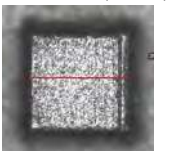

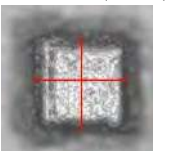
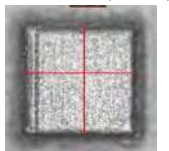
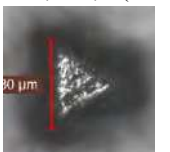
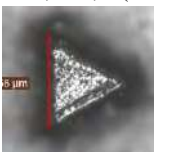
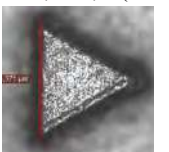
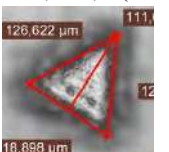

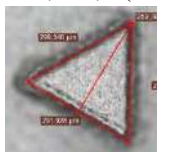

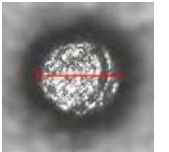
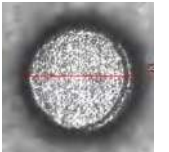

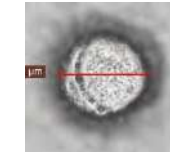
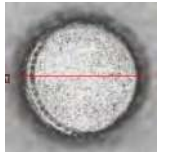
Elem	Wt %	At %	K-Ratio	Z	A	F
C K	13.23	33.82	0.0251	1.1397	0.1664	1.0004
O K	16.91	32.43	0.0561	1.1202	0.2957	1.0019
CuK	69.86	33.75	0.6514	0.9273	1.0056	1.0000
Total	100.00	100.00				


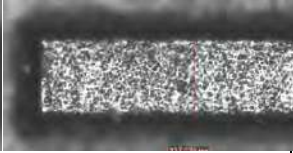
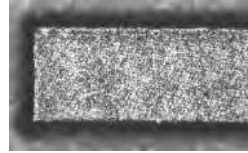

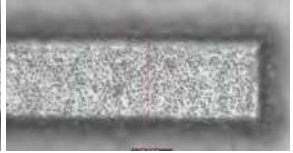
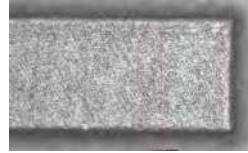
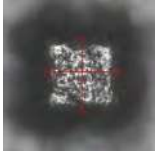
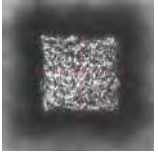
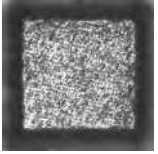
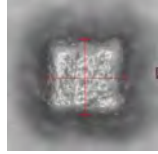
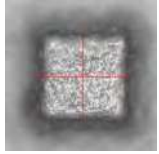
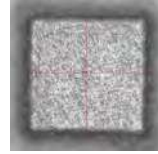
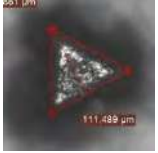
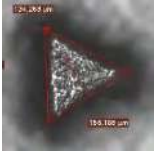
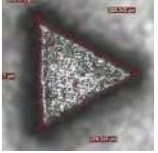
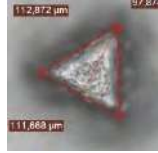
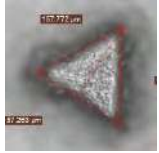

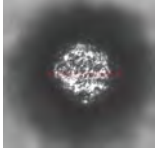
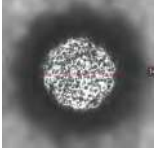
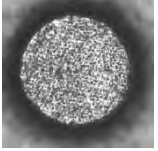
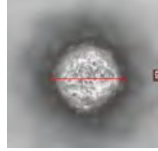
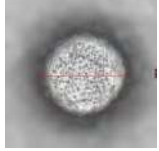

Element	Net Inte.	Backgrd	Inte. Error	P/B
C K	2.08	0.88	13.32	2.36
O K	13.32	1.86	4.38	7.16
CuK	40.88	0.64	2.25	63.88

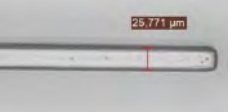
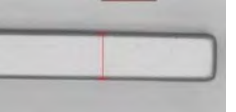
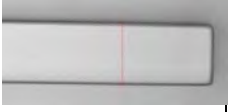
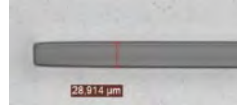
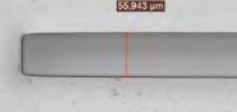
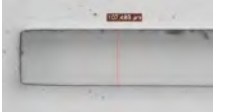

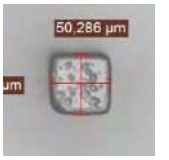



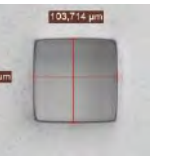
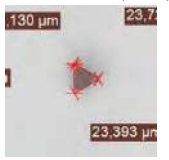



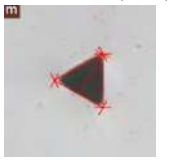

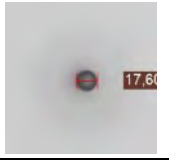

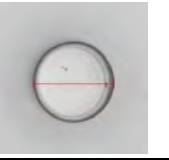


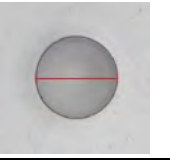
Рисунок Б.3 – Результаты рентгеноспектрального микроанализа образца мастер-формы из ЛС59-1 после электронно-лучевой обработки (доза 500 КГр) на растровом электронном микроскопе Quanta Inspect с приставкой рентгеновского микроанализа EDAX (фирмы FEI)





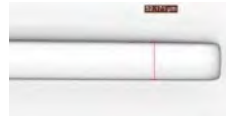
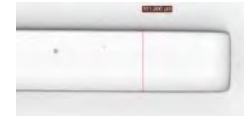








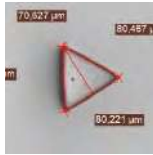




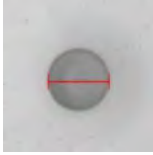
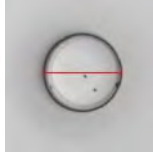


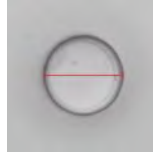
Приложение В

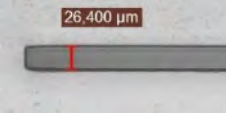
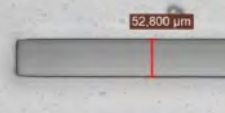
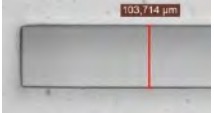
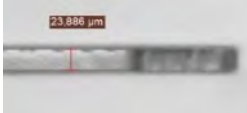

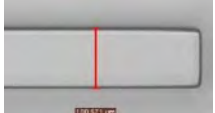


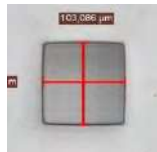




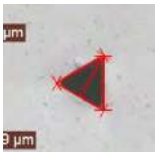





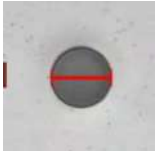




Таблица В.1 – Результаты измерений размеров микроструктур в мастер-форме (МФ) и репликах

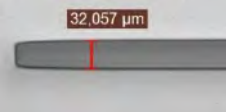


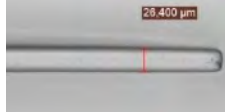
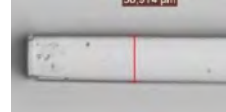
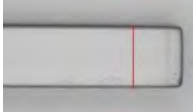
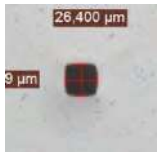
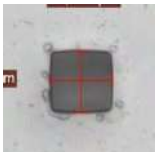

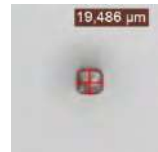



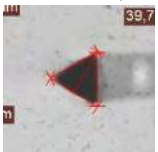



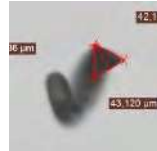



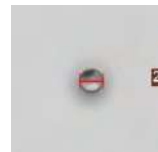
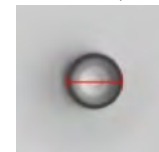
МФ Л60	полосы			Отпеча ток ПДМС от МФ Л60	полосы		
	50	100	250		50	100	250
	95,0±1,1 (n=3) 	140,8±1,1 (n=3) 	292,3±1,3 (n=3) 		95,5±1,0 (n=3) 	144,8±1,3 (n=3) 	291,7±4,0 (n=3) 
	квадраты				квадраты		
	50 95,0±2,3 (n=10) 	100 144,8±3,6 (n=10) 	250 289,3±3,8 (n=10) 		50 99,3±3,6 (n=10) 	100 148,0±3,0 (n=10) 	250 296,0±3,0 (n=10) 
	треугольники				треугольники		
	50 118,6±6,4 (n=15) / Н 102,5±4,6 (n=5) 	100 158,6±3,4 (n=15) / Н 138,8±3,2 (n=5) 	250 284,8±2,5 (n=15) / Н 249,0±2,0 (n=5) 		50 125,4±5,0 (n=15) / Н 111,8±5,0 (n=5) 	100 164,7±5,0 (n=15) / Н 145,0±5,0 (n=5) 	250 293,0±4,8 (n=15) / Н 256,8±2,0 (n=5) 
	круги				круги		
	50 88,0±2,0 (n=5) 	100 142,0±2,6 (n=5) 	250 289,0±1,6 (n=5) 		50 94,3±1,8 (n=5) 	100 146,0±2,0 (n=5) 	250 293,5±3,2 (n=5) 

МФ ЛС59-1	полосы			Отпеча ток ПДМС от МФ ЛС59- 1	полосы		
	50	100	250		50	100	250
	90,5±1,0 (n=3)	137,2±1,6 (n=3)	285,6±2,2 (n=3)		94,3±1,0 (n=3)	142,5±1,0 (n=3)	288,0±1,3 (n=3)
							
	квадраты				квадраты		
	50	100	250		50	100	250
	91,8±1,6 (n=10)	140,2±3,0 (n=10)	289,8±3,5 (n=10)		93,6±2,6 (n=10)	142,6±1,8 (n=10)	291,0±2,7 (n=10)
							
	треугольники				треугольники		
	50	100	250		50	100	250
	111,6±9,5 (n=15) / Н 91,0±2,5 (n=5)	152,8±3,7 (n=15) / Н 131,0±3,0 (n=5)	282,8±4,0 (n=15) / Н 244,8±3,7 (n=5)		118,0±7,6 (n=15) / Н 99,6±3,3 (n=5)	159,6±5,0 (n=15) / Н 138,3±3,6 (n=5)	287,7±4,6 (n=15) / Н 252,3±4,0 (n=5)
							
	круги				круги		
	50	100	250		50	100	250
	89,0±2,5 (n=5)	140,0±1,0 (n=5)	292,0±2,0 (n=5)		92,0±3,2 (n=5)	142,3±2,5 (n=5)	292,3±1,8 (n=5)
							

Отпечаток ок ПДМС исходны й от МФ Si/Su-8	полосы			МФ 221	полосы		
	25	50	100		25	50	100
	25,8±1,0 (n=3) 	52,2±1,0 (n=3) 	102,3±1,0 (n=3) 		29,7±2,0 (n=3) 	56,8±1,5 (n=3) 	108,5±1,3 (n=3) 
	квадраты				квадраты		
	25 25,4±1,0 (n=10) 	50 50,0±1,0 (n=10) 	100 101,2±1,0 (n=10) 		25 27,0±1,0 (n=10) 	50 51,0±1,0 (n=10) 	100 103,8±1,0 (n=8) 
	треугольники				треугольники		
	25 24,4±1,0 (n=9) / Н 21,6±1,0 (n=3) 	50 43,5±1,3 (n=15) / Н 38,3±1,0 (n=5) 	100 83,8±1,0 (n=15) / Н 73,3±1,0 (n=5) 		25 23,0±1,0 (n=15) / Н 20,4±1,0 (n=5) 	50 46,0±1,0 (n=15) / Н 39,7±1,0 (n=5) 	100 89,4±1,0 (n=15) / Н 77,6±1,0 (n=5) 
	круги				круги		
	25 18,0±1,0 (n=5) 	50 49,2±1,0 (n=5) 	100 100,4±1,0 (n=5) 		25 25,8±1,0 (n=5) 	50 50,0±1,0 (n=5) 	100 101,2±1,0 (n=5) 

Отпечаток ок ПДМС от МФ 221 № 1	полосы			Отпечаток ок ПДМС от МФ 221 № 10	полосы		
	25	50	100		25	50	100
	25,3±1,0 (n=3) 	51,3±1,0 (n=3) 	100,4±1,0 (n=3) 		26,6±1,0 (n=3) 	51,7±1,0 (n=3) 	101,4±1,0 (n=3) 
	квадраты				квадраты		
	25 ~27,0 	50 47,5±1,0 (n=10) 	100 98,6±1,0 (n=10) 		25 22,7±1,0 (n=10) 	50 46,8±1,0 (n=10) 	100 98,0±1,0 (n=10) 
	треугольники				треугольники		
	25 22,7±1,0 (n=12) / Н 20,0±1,0 (n=4) 	50 41,3±2,4 (n=9) / Н 35,8±2,0 (n=3) 	100 80,2±1,0 (n=15) / Н 70,0±1,0 (n=5) 		25 16,7±1,0 (n=9) / Н 14,7±1,0 (n=3) 	50 37,8±1,0 (n=6) / Н ~33,0 	100 82,2±1,0 (n=15) / Н 72,0±1,0 (n=5) 
	круги				круги		
	25 ~26,0 	50 50,8±1,0 (n=5) 	100 95,0±2,0 (n=5) 		25 20,5±1,0 (n=3) 	50 46,0±1,0 (n=4) 	100 97,3±1,0 (n=5) 

МФ 510	полосы			Отпечаток ок ПДМС от МФ 510	полосы		
	25	50	100		25	50	100
	27,0±1,0 (n=3)	53,0±1,0 (n=3)	103,5±1,0 (n=3)		-	-	100,0±1,0 (n=3)
							
	квадраты				квадраты		
	25	50	100		25	50	100
	26,5±1,0 (n=10)	51,0±1,0 (n=10)	103,0±1,0 (n=8)		23,7±1,0 (n=8)	46,0±2,0 (n=10)	95,0±1,0 (n=10)
							
	треугольники				треугольники		
	25	50	100		25	50	100
23,2±1,0 (n=15) / H 20,0±1,0 (n=5)	45,7±1,0 (n=15) / H 39,7±1,0 (n=5)	88,5±1,0 (n=15) / H 76,0±1,0 (n=5)	19,0±2,0 (n=15) / H 17,0±2,0 (n=5)	39,0±1,0 (n=9) / H 33,8±1,0 (n=3)	77,0±1,0 (n=15) / H 67,0±1,0 (n=5)		
							
круги			круги				
25	50	100	25	50	100		
25,5±1,0 (n=5)	51,0±1,0 (n=5)	101,0±1,0 (n=5)	24,0±1,0 (n=5)	43,8±1,0 (n=5)	93,4±1,0 (n=5)		
							

МФ Resine	полосы			Отпечаток ок ПДМС от МФ Resine	полосы		
	25	50	100		25	50	100
	32,1±1,0 (n=3) 	58,5±1,0 (n=3) 	109,8±1,0 (n=3) 		26,0±1,0 (n=3)	51,0±1,0 (n=3) 	101,0±1,0 (n=3) 
	квадраты			квадраты			
	26,8±1,0 (n=10) 	50,8±1,0 (n=10) 	103,0±1,0 (n=8) 	21,0±1,0 (n=6) 	48,6±1,0 (n=8) 	99,2±1,0 (n=10) 	
	треугольники			треугольники			
	24,2±1,0 (n=15) / H 21,2±1,0 (n=5) 	45,7±1,0 (n=15) / H 39,8±1,0 (n=5) 	89,6±1,8 (n=15) / H 77,2±1,0 (n=5) 	- 	- 	- 	
	круги			круги			
	25,0±1,0 (n=5) 	49,7±1,0 (n=5) 	101,0±1,0 (n=5) 	~20,0 	44,2±2,4 (n=3) 	95,0±1,3 (n=5) 