

УДК 543

© Б. Г. Беленький, Н. И. Комяк, В. Е. Курочкин, А. А. Евстапов, В. Л. Суханов

МИКРОФЛЮИДНЫЕ АНАЛИТИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ (ЧАСТЬ 2)

6. МИКРОФЛЮИДИКА

Флюид — это поток жидкости в канале без турбулентности. При этом флюиды, содержащие разные компоненты, перемешиваются только за счет диффузии. Уменьшение поперечного сечения канала ϕ резко ($\sim 1/\phi^2$) ускоряет перемешивание. Это главное преимущество микрофлюидных систем, и это правило касается сепарации, тепло- и массопереноса. Одним из ключевых параметров, определяющих свойства флюидных систем, является число Рейнольдса Re — безразмерная величина, рассчитываемая перемножением плотности флюида δ , его скорости v и внутреннего диаметра трубки d и делением произведения на вязкость флюида η [4]:

$$Re = \frac{\delta \times v \times d}{\eta}.$$

При $Re < 2000$ — поток ламинарный и массоперенос определяется диффузией. Чем меньше диаметр канала d , тем больше скорость флюида v , лимитирующая ламинарный поток. В микрофлюидных системах достигается своеобразный компромисс между малыми размерами и высоким качеством — скоростью сепарации. Это касается всех компонентов микрофлюидных систем: микрореакторов, микросепарационных колонок, микрофильтров.

6.1. Безнасосная микрофлюидика

Одна из главных задач микрофлюидики — побуждение движения флюида. Использование для этих целей внешних микронасосов неоправдано, так как их не удастся обеспечить хорошими клапанами, и они текут. Значительно прогрессивнее микрофлюидика с использованием обратного осмоса.

В миниатюризованных системах электроосмотический поток имеет следующие преимущества перед потоком давления:

— улучшается сепарационная эффективность за счет плоского (непуазейлева) профиля скорости;

— движение растворов в многочисленных каналах микрофлюидной аналитической системы (МФАС) может контролироваться несколькими микроэлектродами без необходимости использования для этих целей механических устройств.

Микроэлектроды можно изготавливать непосредственно на чипе, создавая гибридную электронно-химическую (электронно-флюидную) микросхему, для питания которой в некоторых случаях требуется только маломощная батарейка.

Развитие новых принципов прокачки и позиционирования жидкости в субмиллиметровой шкале способствует созданию быстродействующих и дешевых микроаналитических приборов для химического анализа крови, проточной цитометрии, полимерных цепных реакций (ПЦР), скрининга ДНК. Этот подход продемонстрировал Nicolas L. Abbot (University of California) [21], который использовал электроактивные ПАВ (поверхностно-активные вещества), способные передвигать и позиционировать на поверхности водные растворы и органические жидкости в субмиллиметровой шкале. Метод основан на создании градиента поверхностной концентрации и, следовательно, давления, который, подобно изменению объемной концентрации раствора (следовательно, осмотического давления), ведет к транспорту жидкости. ПАВ с электроактивными группами можно электрохимически путем изменения приложенного к электродам электрического потенциала переключать между поверхностно-активным состоянием, когда молекула ПАВ адсорбируется на поверхности, и поверхностно-неактивным состоянием, определяющим режим десорбции. Переключения адсорбции–десорбции провоцируют механические удары на поверхность жидкости. Таким образом, пространственно локализованные изменения концентрации окисленного и восстановленного ПАВ вызывают изменения контактного угла раствора на поверхности, ее смачивание–осушение и в конечном счете движение жидкости. В результате жидкость, транспортируя молекулы и частицы, направляется в определенные (заданные) области поверхности, где смешивается с пробой или реагентами. Abbot считает [21], что возможность управления движением

жидкости этим методом позволяет развить новые технологии «lab-on-a-chip». По сравнению с электрокинетическим феноменом электроосмоса, требующим напряжения в киловольтах, этот феномен требует нескольких десятых долей вольта для векторного транспорта и позиционирования на поверхности, а также позволяет изготавливать гибкие, легко изменяющие конфигурацию МФАС, не требующие сети каналов и клапанов. Эти МФАС перспективны для применения как к органическим и водным растворам, так и к микрочастицам.

Особый интерес представляет использование в качестве безконтейнерных векторных транспортных систем жидкостных микроканалов, получаемых при смачивании гидрофильных полосок на поверхности, профилированной на гидрофобные и гидрофильные зоны. Это предложение разработано группой в Max Planck Institute of Colloid & Interfaces в Berlin-Adlershof [22]. Получаемые таким образом микроканалы характеризуются нестабильностью формы, которая связана с переходом из гомогенного состояния с постоянным поперечным сечением в состояние с единственной выпуклостью при определенном количестве адсорбированного объема. Эта нестабильность представляет бифуркацию между двумя различными морфологиями с постоянной средней окружностью. Состояние выпуклости можно использовать для конструирования сети каналов, которая может быть использована как флюидные микрочипы и микрореакторы.

Поверхность с латеральными профилями различной смачиваемости может быть получена микроконтактной печатью [23, 24], осаждением паров [25], фотолитографией [26, 27]. Это создает возможность конструирования 3D-структур на мягкой подложке. В работе [22] профили высокой

смачиваемости изготавливались путем термического разложения MgF_2 толщиной 20 мкм, осажденного через соответствующие маски на силиконовой резине или тиолированном золотом субстрате (с одинаковой гидрофобностью). Маски позволяли получить профили из параллельных полосок шириной несколько десятков микрон, разделенных гидрофобными зонами той же ширины. Если полученные профили экспонировать в атмосфере водяных паров при влажности 40 %, то при охлаждении чипа до температуры на 5 °C ниже точки росы, на гидрофильных доменах конденсируется вода, образуя каналы жидкости. При конденсации малого количества воды образуются гомогенные каналы в виде сегментов цилиндров с постоянным поперечным сечением (рис. 6, А). При увеличении количества конденсированной воды объем канала растет, пока не произойдет переход в морфологически иное состояние, в котором каналы образуют выпуклости характерной формы (рис. 6, В).

Контуры микроканалов могут наблюдаться с помощью оптической микроскопии как проекции, перпендикулярные поверхности субстрата. Микроскопия ближнего поля позволяет определять положение контактной линии на субстрате. При этом падающий луч света полностью отражается от субстрата, создавая возбужденную стоячую волну вблизи него (<100 нм). На тиолированной поверхности золота эта возбужденная волна образует плазмонный резонанс. На сухой поверхности в микроскопном изображении домены проявляются как темные пятна.

Наряду с экспериментальными наблюдениями, авторами [22] теоретически рассчитывалась полная 3D-форма каналов (рис. 7, А), из которой определялась их проекция (рис. 7, В) и позиция контактной линии (рис. 7, С). При этом было получе-

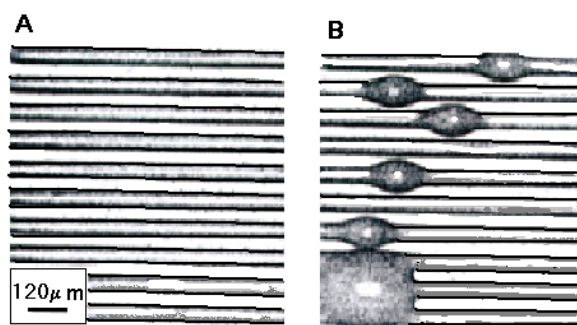


Рис. 6. Морфология жидкости на структурированной поверхности [22]. Открытые микроканалы воды (оптическая микроскопия). А — режим низкого покрытия (малое количество воды): каналы с постоянным сечением, небольшой контактный угол. В — режим высокого покрытия (большое количество воды): каналы развиваются с образованием единичной выпуклости, контактный угол увеличивается до некоторого характеристического значения, затем каналы сливаются (нижний левый угол)

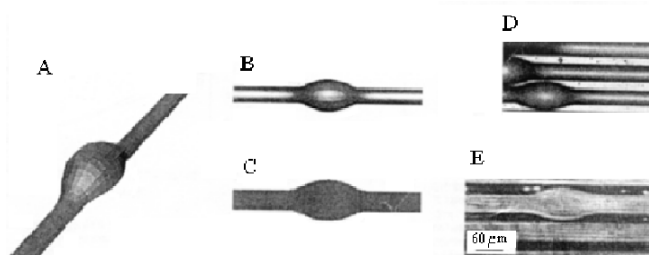


Рис. 7. Морфология жидкости на структурированной поверхности [22]. Открытые микроканалы воды. Выпуклость микроканалов: А — теоретическая форма; В и D — проекции формы перпендикулярно субстрату; С и Е — место контактной линии, движущейся по гидрофобной поверхности. В и С получены теоретически [31, 32], D и Е — из экспериментальных наблюдений

но хорошее совпадение экспериментальных и теоретических результатов.

Нестабильность поверхности каналов на рис. 6 и рис. 7 отличается от нестабильности классического релеевского плато [28–30], которая характеризуется распадом свободно стоящего цилиндра на периодическую линейку множества капель. В противоположность этому обсуждаемая здесь нестабильность ведет к образованию единичной выпуклости для каждого цилиндрического канала. Более того, при том что свободно стоящий цилиндр всегда нестабилен, гомогенный канал остается стабильным, пока его объем существенно мал.

Теоретически форма каналов оценивалась средней кривизной поверхности на границе домена со структурированным субстратом. Если контактная линия находится на вершине границ доменов (при сильном удерживании жидкости), дифференциальная геометрия формулирует несколько общих теорем, определяющих существование таких поверхностей, когда средняя кривизна существенно мала [31, 32]. Вместе с тем теоретические работы авторов описывают две общие особенности, не учитываемые этими теоремами: (i) контролирующим параметром нестабильности скорее является полный объем канала, нежели средняя кривизна поверхности, (ii) для изученных параметров системы состояние выпуклости характеризуется контактной линией, отделяющей ее от границы гидрофильной поверхности домена и переходящей через гидрофобную область. Разработанная теория основана на двух физических параметрах — контактных углах. Другие параметры, доступные для экспериментального определения, определяют геометрию профиля: ширину и длину разделенной на полосы поверхности домена и полный объем жидкости, сконденсированной на полоске. Таким образом, теоретическая форма, показанная на рис. 7, не содержит подгоночного параметра.

Для того чтобы понять характер этой нестабильности, необходимо исследовать контактный угол между поверхностью жидкость—пар и поверхностью субстрата. Для гомогенного твердого субстрата контактный угол θ должен удовлетворять уравнению Young'a [33]:

$$\cos \theta = (\sigma_{VS} - \sigma_{IS}) / \sigma_{LV}, \quad (2.1)$$

где σ_{VS} , σ_{IS} и σ_{LV} — поверхностные натяжения на границах пар—твердое тело, жидкость—твердое тело, жидкость—пар соответственно. Таким образом, силиконовая резина или тиолированный золотой субстрат должны иметь относительно большой контактный угол $\theta = \theta_s \approx 108^\circ$. Однако в присутствии гидрофильных полос на поверхности на них начинает конденсироваться вода, причем

образующиеся капли имеют относительно малый контактный угол $\theta = \theta_v \leq 5^\circ$.

Когда на полосках конденсируется много воды, капли коалесцируют, пока гидрофильные полосы полностью не покроются водой, и контактная линия этих каналов будет наблюдаться на границах поверхности доменов (на границах полосок). Если продолжать добавлять воду, каналы становятся толще, хотя все еще имеют форму цилиндрических накладок, и их контактная линия находится на границах доменов. Из этого следует, что контактный угол θ водяных каналов больше не удовлетворяет уравнению Young'a, но еще не эквивалентен неравенству $\theta_v < \theta < \theta_s$ [34]. При этом контактный угол непрерывно увеличивается. Для оценки стабильности каналов необходимо определить предельную деформацию формы, которая сохраняет объем жидкости и оставляет положение контактной линии неизменным. Из анализа линейной стабильности следует, что цилиндр локально стабилен для контактного угла $\theta < 90^\circ$, т.е. цилиндрический канал нестабилен, если контактный угол превышает 90° . Критерий перехода в новое состояние, которое увеличивает эту нестабильность, может быть получен из приближения, в котором гидрофильная полоса замещается линейкой N круглых доменов того же диаметра. В эти домены помещают такое же количество жидкости, и происходит обмен жидкостью между образующимися капельками. В этот момент жидкие каналы приближенно представляют линейную цепочку N капель в форме сферических накладок. Из уравнения Лапласа следует:

$$P_L - P_V = 2M\sigma_{LV}, \quad (2.2)$$

где P_L и P_V соответствуют давлению жидкости и пара, а σ_{LV} — поверхностному натяжению на границе жидкость—пар. Все капли имеют ту же среднюю кривизну M (для сферических накладок, а кривизна M обратно пропорциональна радиусу сферы). Контактная область этих капель фиксирована, чтобы быть идентичной области круглых поверхностных доменов. Это предполагает, что цепь капелек может содержать только два различных типа капель: малых, с контактным углом θ_{sm} , и больших, с контактным углом θ_{la} . Если комбинируют одну малую каплю с одной большой таким образом, чтобы они склеивались вместе по плоской контактной области, то получают полные сферы, что предполагает ($\theta_{sm} + \theta_{la} = 180^\circ$). Сравнение расчетов соответствующих свободных энергий [35] для различных группировок N_{sm} малых и N_{la} больших капель при условии: ($N_{sm} + N_{la} = N$) (рис. 8) показывает, что только две из них представляют стабильные или метастабильные состояния, а именно: (i) гомогенный профиль капель,

состоящий из цепи идентичных капель, и (ii) гетерогенный профиль капель, состоящий только из одной большой капли и $(N-1)$ малых капель. В терминах канальной геометрии эти две возможности соответствуют гомогенным каналам и гетерогенным каналам с одной выпуклостью.

Расчет свободной энергии различных профилей капель приводит к прерывистой бифуркационной диаграмме, которая включает гистерезисную петлю. Гомогенный профиль капель метастабилен до некоторого максимального объема, а гетерогенный профиль с одной большой каплей метастабилен до некоторого минимального объема. Для рассматриваемой системы этот минимальный объем очень близок к бифуркационной точке, и петля гистерезиса асимметрична. С другой стороны, максимальный объем гомогенного профиля соответствует каплям с контактным углом 90° , полученным из анализа линейной стабильности гомогенных каналов. Для точного расчета состояния выпуклости и бифуркационной диаграммы численно определяется минимум свободной энергии канала и соответствующая константа средней кривизны поверхности.

Структура бифуркации, описывающая нестабильность, подразумевает, что эта нестабильность общая. Она применима к любой жидкой поверхности и поверхности полосок, обеспечивая существенно малый контактный угол и существенную длину лиофильных полосок. Присутствие этой нестабильности делает невозможным конструировать длинные гомогенные каналы с контактным углом $\theta > 90^\circ$. Однако выпуклость, возникающая из этой нестабильности, может коалесцировать с соседними каналами, образуя между ними микромостик. На рис. 6 такие мостики стабильны, поскольку полоски между каналами гидрофобны и имеют относительно большую ширину. Если

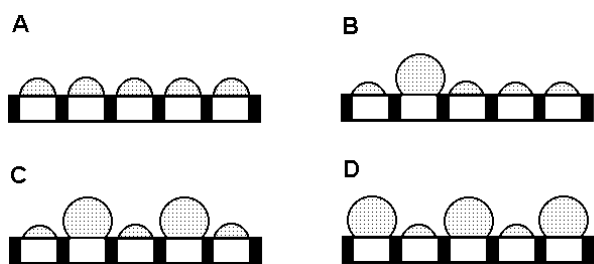


Рис. 8. Морфология жидкости на структурированной поверхности [22]. Возможные профили капель на линейной цепочке круглых доменов. Согласно уравнению Лапласа, все капли имеют одинаковую среднюю кривизну, отсюда — возможность образования сфер из малых и больших капель. Профили капель (C) и (D) с более чем одной большой каплей нестабильны и переходят в гомогенный профиль (A) или гетерогенный профиль (B) с одной большой каплей

уменьшить гидрофобность и ширину такой полоски, то мостик образует нуклеат, который ведет к полному покрытию гидрофобной полоски и коалесценции каналов.

Профили смачиваемости, где пары (или мультиплеты) имеют гидрофобные промежутки, могут использоваться как флюидные микрочипы или микрореакторы. Для этого, во-первых, каналы на полоске пар (или мультиплетов) должны быть заполнены различными реагентами и, во-вторых, коалесценция этих каналов должна индуцироваться простым увеличением объема жидкости. Позиции стабильных мостиков можно контролировать, используя поверхность доменов (полосок) неодинаковой ширины или помещая мостики в углах профиля. Этим путем можно создать 2D-сеть микроканалов. Когда каналы заполняются электролитами, получается другой тип микрочипов, поскольку каналы становятся ионными проводниками.

После изготовления профиля жидких каналов и мостиков его можно стабилизировать замораживанием, полимеризацией, путем золь—гель перехода. Если изменение объема при такой фазовой трансформации мало, форму жидкого профиля можно законсервировать. Таким путем можно изготавливать ригидные и мягкие двумерные или трехмерные структуры с большой вариацией морфологии [36]. Как предлагают авторы работы [22], описанные новые типы нестабильности жидкости можно применять при конструировании микрореакторов. Немеханический контроль флюида, по-видимому, целесообразно использовать в конструировании дешевых МФАС.

6.2. Т-сенсор

Многие микрофлюидные технологии хорошо работают только при анализе проб с известными компонентами и гомогенных проб. Последнее характерно для высокопроизводительного генетического тестирования и сортировки комбинаторных библиотек при поиске кандидатов в лекарства. Наибольшие трудности для МФАС представляет анализ сложных и гетерогенных реальных проб, таких как цельная кровь или загрязненные пробы окружающей среды. Поэтому размеры каналов МФАС ограничивают снизу размерами пылинок и микрочастиц в пробах, способных блокировать каналы чипа. В связи с этим важное значение приобретает инсталляция в чип устройств, отделяющих раствор от частиц. Обычно этой цели достигают фильтрацией или центрифугированием, к сожалению, неприменимыми в интегрируемых микросистемах.

Компонент МФАС, решающий подобные проблемы, разработан фирмой Micronics (Richmond, Wash.) совместно с проф. Paul Yager (University of

Vashington, Siettle). Это устройство, известное как Т-сенсор, позволяет одновременно осуществлять функции сепарации и детектирования [37]. Т-сенсор фирмы Micronics представляет чип (рис. 9) с тремя отдельными входами: 1 — слева для пробы, 2 — в центре для раствора с индикатором (детектирование) и 3 — справа для сравнительного раствора. После объединения в тройнике эти потоки в ламинарном режиме движутся рядом, диффузионно обмениваясь компонентами при параллельном движении в интеракционной зоне. Малые частицы (молекулы) быстро диффундируют из потока пробы в центральную область, в то время как большие частицы (макромолекулы) диффундируют значительно медленнее (например, органический краситель с $MW = 350$ дальтонов

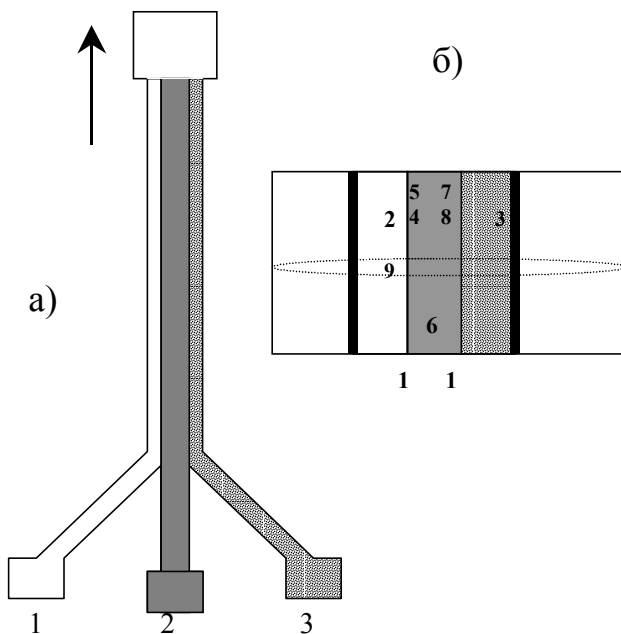


Рис. 9. Т-сенсор фирмы Micronics [37]. а) — чип с тремя отдельными входами: 1 — для пробы; 2 — в центре для детектируемого раствора с индикатором и 3 — для сравнительного раствора. После объединения ламинарные потоки движутся рядом, диффузионно обмениваясь компонентами. б) — интердиффузионные потоки формируют соответствующие интеракционные зоны, которые могут использоваться для определения концентрации аналита оптическими средствами. 1 — границы потоков; 2 — сравнительный поток; 3 — поток, содержащий частицы; 4 — диффузия детектируемой субстанции в сравнительный поток; 5 — диффузия аналита сравнения в детектируемый поток; 6 — детектируемый поток; 7 — диффузия пробы в детектируемый поток; 8 — диффузия детектируемой субстанции в пробу; 9 — поперечное сечение детектора

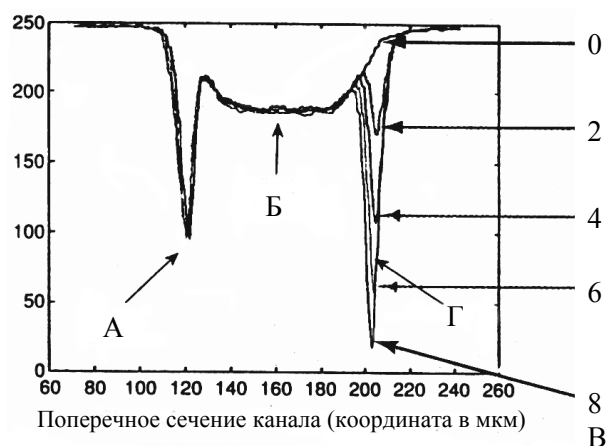


Рис. 10. Распределение [37] уровня сигнала флуоресценции вдоль поперечного сечения канала Т-сенсора при разных концентрациях пробы. Области: А — внутреннего контроля, Б — фона индикатора, В — пробы HSA (цифрами обозначена концентрации в г/л), Г — проба

диффундирует на расстояние 10 мкм за 0.2 с, а частице диаметром 0.5 мкм для этого требуется уже 200 с [33]). В результате для нее равновесие между потоком пробы и детектируемым потоком устанавливается значительно дальше от точки входа в прибор. Интердиффузионные потоки формируют соответствующие интеракционные зоны, в которых продукты взаимодействия пробы с индикатором и вещества сравнения с индикатором могут использоваться для определения концентрации аналита оптическими средствами по изменению абсорбции света или интенсивности флуоресценции индикатора в диффузионной зоне между потоками. Для регистрации используют ПЗС-матрицу с охлаждением, с помощью которой определяется отношение абсорбции или интенсивности флуоресценции интеракционных зон (рис. 10). Если эти отношения свободны от перекрестной чувствительности к другим компонентам пробы, то можно осуществить анализ пробы без предварительного удаления кровяных клеток или экстракции аналита. Позиционные вариации этих сигналов представляют комплексную функцию концентрации индикатора и вещества сравнения с аналитом и могут использоваться для определения компонентов сыворотки в цельной крови. Из флуоресцентных изображений сечения канала с потоками контроля, индикатора и пробы или аналогичного абсорбционного профиля могут быть определены: (i) флуоресценция (абсорбция) раствора пробы и сравнительного раствора, (ii) фоновая флуоресценция (абсорбция) индикатора, (iii) интенсивность диффузионных профилей контроля и пробы, (iv) координаты максимумов флуоресценции (абсорбции) контроля и пробы. Параметры

(i)—(iii) используются для калибровки и расчета концентрации аналита. Параметр (iv) дает информацию о вязкости потока в канале.

Сравнение интенсивностей и позиций диффузионной интеракционной зоны в одном или нескольких сечениях позволяет получить безкалибровочное значение аналитической концентрации, независимое от вариаций экспериментальных условий.

При этом компенсируются такие эффекты, как вариация геометрии проточной ячейки, температурная зависимость реакционной кинетики, нестабильности источника излучения, оптической системы и электроники, мутность флюида, нестабильность концентрации реагентов детектирования, перекрестная чувствительность к другим реагентам пробы, нестабильность вязкости и скорости потока. Поскольку все потоки в T-Sensor'e ламинарные, а реагенты и проба постоянно обновляются, повышение чувствительности может быть достигнуто путем интегрирования во времени флуоресцентных изображений без опасения фотообесцвечивания, деградации реагентов, засорения сепарационных мембран и влияния других отрицательных эффектов, типичных для традиционных сенсоров.

В работе [38] представлена простая методика для прямого количественного измерения человеческого сывороточного альбумина HSA, в которой применен простой вариант двухпоточкового T-сенсора (рис. 11). Методика использовалась для изучения кинетики реакций, определения коэффициентов диффузии, изучения зависимости вязкости вещества от pH, ионной силы и других факто-

ров окружающей среды. Реакционный канал T-сенсора представлял в сечении прямоугольник шириной 550 мкм и глубиной 25 мкм. Для описываемой гидродинамической системы $Re < 1$. В качестве объекта исследования была выбрана реакция связывания нативного альбумина AB 580 (Albumin Blue 580, Molecular Probes A-6663) и человеческого сывороточного альбумина HSA (Sigma A-1653 fraction V). Нативный альбумин AB 580 имеет низкий уровень флуоресценции, но квантовая эффективность возрастает на два порядка после связывания с HSA. Объем пробы при непрерывном вводе оценивался в 1 мкл, время измерения — до нескольких секунд. При использовании для регистрации флуоресценции CCD-камеры с трехступенчатым охлаждением была достигнута чувствительность измерений (с хорошим соотношением сигнал/шум) на уровне только микромолярных концентраций.

Возможности применения T-сенсора продемонстрированы также для различных клинических анализов: определения pH, содержания кислорода, электролитов, белков, энзимов и лекарственных препаратов в крови — с использованием для детектирования флуоресценции, абсорбции света и вольтамперометрии [39]. Особый интерес вызывает новый формат иммуноанализа, основанный на диффузионно-сепарационных особенностях T-сенсора для изоляции и детектирования связанных и несвязанных комплексов антиген-антитело. Измерение интенсивности флуоресценции (абсорбции света) вдоль канала может использоваться для наблюдения кинетики реакции (не как функции времени, а как функции расстояния от стартовой

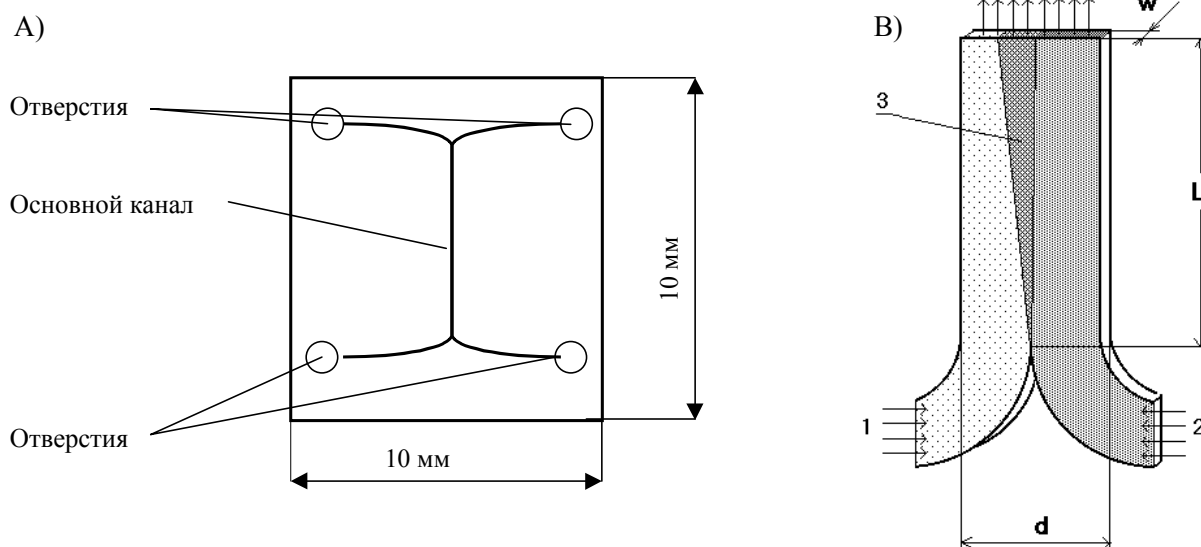


Рис. 11. Конструкция и принцип работы двухпоточкового T-сенсора [38]. А) — Конструкция кремниевого микрофлюидного прибора. В) — схема движения потоков в T-сенсоре: 1 — медленно диффундирующий аналит, 2 — быстро диффундирующий аналит, 3 — интердиффузионная зона. Асимметричное распределение интердиффузионной зоны относительно центра основного канала вызвано различием коэффициентов диффузии веществ реагирующих потоков

точки диффузионного взаимодействия). Таким образом, дополнительно к разделению и детектированию аналита в сложных растворах проб Т-сенсор дает возможность иммуноанализа и кинетического анализа в формате, требующем минимального количества пробы.

А. Manz предполагает [4], что Т-сенсор станет революционным методом детектирования аналитов, разделяемых хроматографией и электрофорезом. При хроматографии и электрофорезе инжeksiруется проба, содержащая малое количество аналита в объеме, ограниченном стенками колонки. С помощью продольной диодной линейки, покрывающей длину сепарационного капилляра, проба детектируется множество раз, а записанный сигнал представляет свертку щелевой функции электрофореграммы. При этом точность определения концентрации значительно повышается (пропорционально квадратному корню из числа наблюдений). Использование преобразования Фурье позволяет получать частотные характеристики аналитических данных, причем концентрация аналита может быть записана в терминах его «мигающей» частоты.

7. ПОЛИМЕРНЫЕ ЧИПЫ

Интенсивное развитие технологий создания полимерных чипов связано с тем, что полимерные

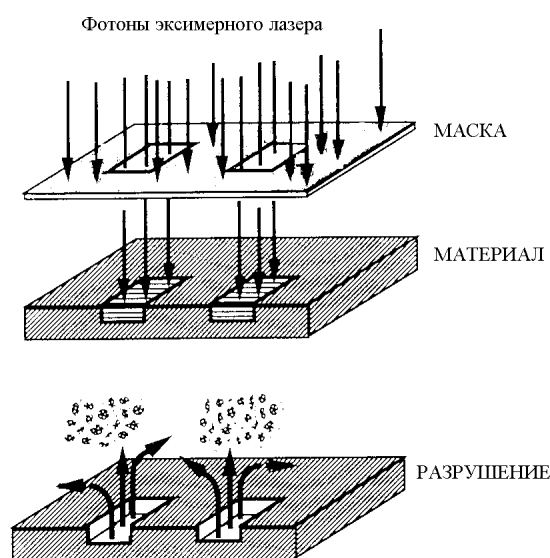


Рис. 12. Изготовление пластиковых микрофлюидных чипов с помощью УФ-лазерной фотоабляции [40]. Импульсы эксимерного лазера (193 нм) энергией 200 мДж направляются через фотосаблон на поверхность пластика, взрывая химические связи полимерной пластинки и образуя отрицательный микрорельеф

чипы обладают сравнительно низкой стоимостью материала по сравнению со стеклянными, низкой трудоемкостью изготовления, возможностью неограниченного тиражирования при серийном производстве и достаточно простыми технологиями утилизации.

В Harvard University развивается техника быстрого изготовления МФАС из полимеров [4], позволяющая сократить время между возникновением идеи чипа и ее практической реализацией. Группа Withesides разработала стратегию изготовления трехмерных комплексных микроканальных систем как основы для новых типов МФАС [4].

В настоящее время существуют следующие основные технологии изготовления пластиковых чипов.

— Изготовление пластиковых микрофлюидных диагностических систем с помощью УФ-лазерной фотоабляции [40], выполняемой эксимерным лазером (с излучением на длине волны $\lambda = 193$ нм, мощностью — 200 мДж/импульс, частотой импульсов 10–50 Гц) на полимерном субстрате, движущемся в компьютер-управляемой системе. Метод использовался для получения каналов в полистироле, поликарбонате, ацетате целлюлозы, полиэтилентерефталате. Герметизация приготовленных каналов выполнялась с помощью дешевой техники ламинирования (рис. 12). Авторами [40] отмечался интересный факт: независимо от природы полимера поверхность аблатных структур увеличивает гидрофильность и электроосмотический поток в катодном направлении, определяемый величиной электрического поля, рН и ионной силой буфера, а протеиновое покрытие заметно подавляет электроосмотический поток у всех полимеров.

— Получение микрочипа путем отливки полидиметилсилоксанового (PDMS) эластомера в микрофабрикованной форме (рис. 13). Хорошая адгезия обработанного плазмой PDMS-эластомера к чистой поверхности стекла позволяет обойтись без процедуры склеивания. Изготовленное устройство с детектором лазер-индуцированной флуоресценции (ЛИФ) использовалось для быстрой сепарации рестрикционных фрагментов фХ-174 HaeIII DNA, меченных YOYO-1 и флуоресцентно меченных пептидов. Предел детектирования составлял несколько зептамолей (10^{-21} молей) для каждого инжeksiрованного фрагмента ДНК. Наиболее высокая эффективность детектирования ($> 50\%$) достигнута в PDMS-микроканалах [41].

— Изготовление микрофлюидных устройств на субстрате полиметилметакрилата (ПММА) с использованием двух импринтинговых техник (техник тиснения, рис. 14). Устройство первого типа изготавливалось с использованием проволоки малого диаметра, которая отпечатывалась в слегка

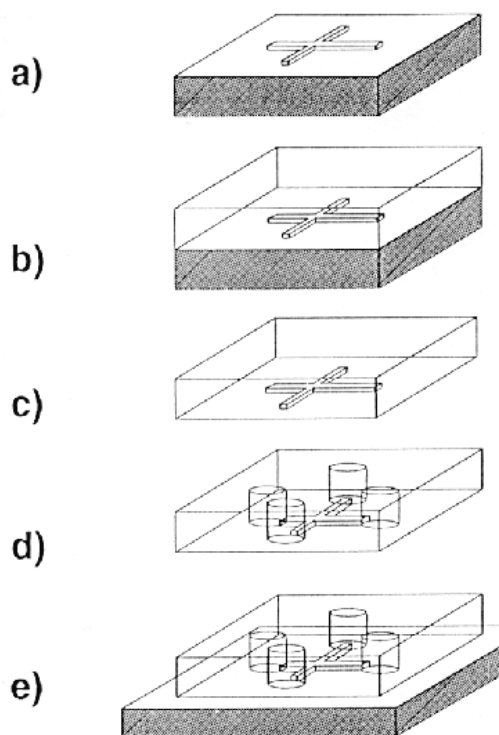


Рис. 13. Получение полидиметилсилоксанового (PDMS) чипа для ВЭКЭ [41]: а) — силиконовая модельная пластинка с положительным поверхностным рельефом, б) — смесь раствора Sylgard 184 и его сшивающего агента на модели, с) — отделенная от модели сшитая пластина ПДМС, д) — пластина ПДМС с отверстиями-резервуарами, е) — готовый к использованию чип, установленный на пластину ПДМС

нагретом пластике. Эта техника позволяет получать наиболее дешевые структуры, но только с прямолинейными каналами. Второй тип устройств позволяет получить более сложную конфигурацию за счет отпечатков трехмерных пуансонов с положительным рельефом, изготовленных на кремниевой пластинке. Такой пуансон может многократно использоваться для воспроизводимого получения серии чипов. Изготовленные по изложенной методике импринтинговые устройства использовались для иммуноанализа [42].

— Изготовление микрофлюидных чипов шприц-литьем из пластика (рис. 15). Стратегия изготовления включает получение формы путем травления кремниевой пластинки и электроосаждения на нее более прочного слоя никеля. Форма затем используется для изготовления прочной металлической вставки для массового шприц-литья микроканальных чипов из акрилата. Герметизация

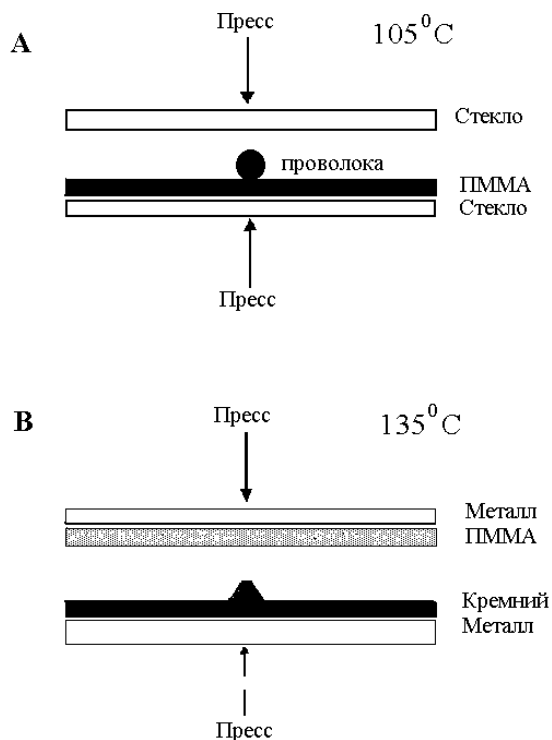


Рис. 14. Изготовление микрофлюидных пластиковых каналов методом импринтинга (тиснения) [42]. Размягченному нагреванием ПММА придается форму с помощью проволоки (А) или трехмерного металлизированного кремниевого пуансона (В)

чипа может осуществляться несколькими методами. Наиболее успешным оказалось термическое ламинирование канализированной поверхности чипа лентой Mylar толщиной 2 mile (1 mile = 0.0254 мм), покрытой термически активируемым адгезивом при 105°C в течение 5 мин. Электрический ток в сосуды—резервуары чипа подводился через погруженные 76 мкм платиновые электроды. На изготовленном устройстве продемонстрирована сепарация фрагментов двухспиральной ДНК высокого разрешения, выполненная за время менее 3 мин. Погрешность воспроизводимости сепараций в экспериментах на одном и на разных чипах соответственно составила < 1 % и ~ (2–3) %. Описанная технология обеспечивает производство дешевых одноразовых электрофоретических чипов для определения размеров фрагментов ДНК, секвенса ДНК, быстрого иммуноанализа [43].

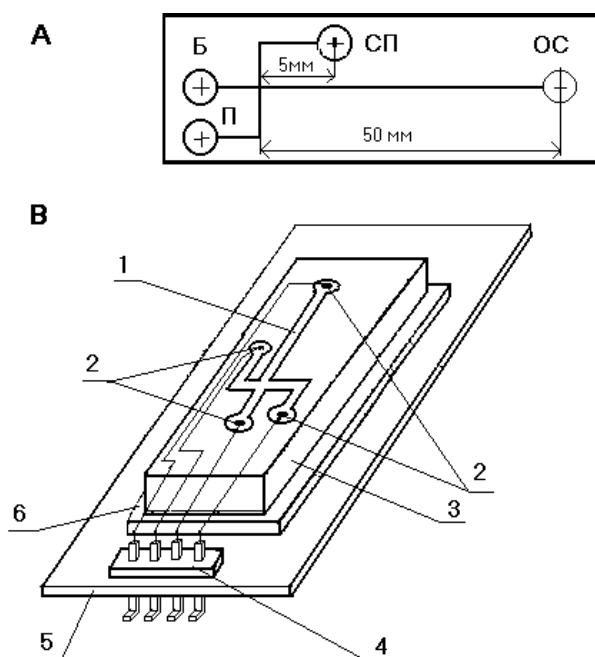


Рис. 15. Сепарационный чип, изготовленный шприц-литьем из пластика [43]. А — схема пластикового микроканального чипа: П — резервуар с пробой, Б — резервуар с буфером, СП — слив пробы, ОС — общий слив. В — Комплексный сепарационный чип: 1 — сепарационный канал, 2 — платиновые электроды, 3 — акриловый чип, 4 — электрический разъем, 5 — основание чипа, 6 — микроскопное (предметное) стекло с адгезивной пленкой

8. Миниатюризованные системы полного анализа (μ -TAS)

А. Manz предложил называть интегрированную аналитическую систему Total analytical system- (TAS). TAS преобразует химическое свойство в оптический или электрохимический сигналы — 1-й переход, которые в свою очередь преобразуются в электрические сигналы — 2-й переход.

Первое преобразование может осуществляться протеин-инженерным биосенсором через стадию преобразования химического свойства (сигнала) в молекулярно-конформационный сигнал — 1а переход, далее преобразуемый в оптический или электрохимический сигналы — 1б переход.

При миниатюризации TAS подобные преобразования выполняются в микрометровой шкале на чипе сантиметровых размеров из стекла, кремния или пластика. Эти системы известны как μ -TAS. Если следовать Albert van den Berg (Нидерланды) [4], современные исследования μ -TAS направлены на контроль микрофлюидики и нанофлюидики,

развитие высокопроизводительных (high throughput) скрининговых систем и включение микрореакторов в μ -TAS. Van den Berg считает, что главное применение μ -TAS — это клиническая диагностика, анализ ДНК, открытие кандидатов в лекарства (скрининг комбинаторных библиотек). Все это имеет огромный рыночный потенциал. При этом выдающуюся роль играет изготовление чипов из пластиковых материалов. Однако многие специальные микроканальные структуры могут изготавливаться из кремния. В этом поле деятельности вполне вероятно открытие новых микрофлюидных феноменов.

De Mello из Imperial College (Лондон) считает, что μ -TAS — это МФАС с возможностью выполнения большого числа аналитических операций, включая ввод пробы, пробоподготовку, перемешивание, химические реакции, сепарацию, детектирование, сбор фракций — все на одном микрочипе [4]. Главная цель сегодняшних исследований МФАС — разработка микрокомпонентов (сборок), способных выполнять одну или несколько из этих стадий. Так, группа Manz'a разработала микрореактор для предколоночной дериватизации аминокислот в флуоресцирующие производные [44]. Реактор имеет стекляннокремниевую сэндвич-конструкцию с реакционным каналом и интегрированным в чип резистором для нагревания и контроля температуры.

Manz, De Mello и Kopp из Imperial College разработали химический усилитель для выполнения ПЦР в потоке с высокой скоростью [45]. Это устройство представляет выполненный в стекле капиллярный канал, который многократно проходит через три температурные зоны, удваивая при этом концентрацию специфических фрагментов ДНК при каждом цикле (рис. 16). В этой работе еще раз доказывается, что аналитическое качество (в показателях скорости и эффективности) улучшается при уменьшении шкалы размеров. Причем все это достигается параллельно с характерной для μ -TAS полной автоматизацией прибора, облегчающей его эксплуатацию и повышающей надежность анализа.

8.1. Последние достижения в МФАС

Большое внимание в развитии μ -TAS акцентируется на микрофлюидных конструкциях для электрофорез(ЭФ)-сепарации высокого разрешения и высокой производительности. Следует иметь в виду, что электрофорез — это стандартный метод сепарации молекул в соответствии с отношением заряда и массы. Использование микрочипов для разделения с помощью электрофореза и электроосмотического потока жидкости было впервые продемонстрировано Harrison, Manz с

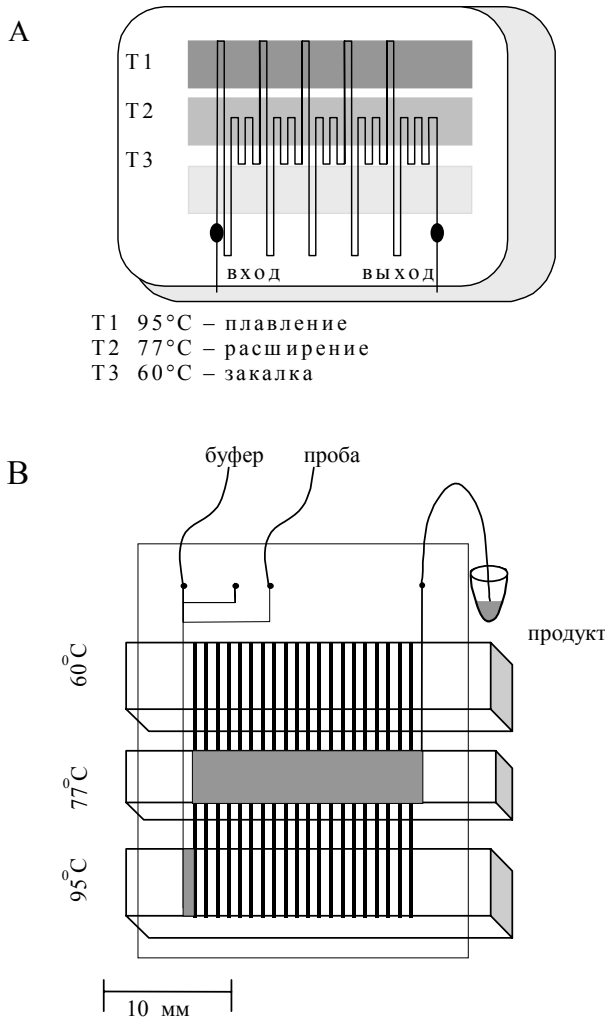


Рис. 16. Химический усилитель для ПЦР в потоке [44]. А — общий вид чипа; Т1, Т2, Т3 — температурные зоны для амплификации. В — принцип функционирования

сотрудниками в 1993 г. [46]. Последние достижения в МФАС связаны с экстраординарным увеличением производительности, скорости и чувствительности электрофореза на микрочипе. Группа Mathies (University Berkeley) разработала, изготовила и испытала ЭФ-микросистему, которая способна производить 96 параллельных генетических анализов на одном циркулярном 10 см чипе, представляющем сэндвич двух стеклянных плат, одна из которых химически травится через маску, а другая термически связывается с вытравленной платой, образуя каналы [47]. Эта же группа разработала для сканирования 96-канального чипа специальную вращающуюся конфокальную систему флуоресцентного детектирования. Система сканирует чип снизу без уменьшения сепарационного разрешения. Такие циркулярные чипы пригодны для повторного использования, хотя вполне возможно их сделать из пластика для одноразового применения. Mathies использовал указанную систему для фракционирования фрагментов ДНК в растворах гидроксипропилацетата или линейного полиамидацетата. Производительность созданного прибора при определении размеров фрагментов ДНК оценивается как 1 проба (~500 нуклеотидов) за 12 с. Если использовать принцип множественного определения цвета и размера, то производительность увеличивается до 10 проб в 1с, что в 100 раз быстрее, чем в типичном гель-ЭФ на пластинах [4].

Другим достижением высокоэффективного капиллярного электрофореза (ВЭКЭ) на чипах является детектирование единичных хромофоров (Ramsey) [48]. Также Ramsey выполнил электрофоретическое разделение на чипе за несколько мс.

Компонентами МФАС в ряде случаев являются устройства для концентрирования пробы. Примером оригинальной конструкции такого устройства

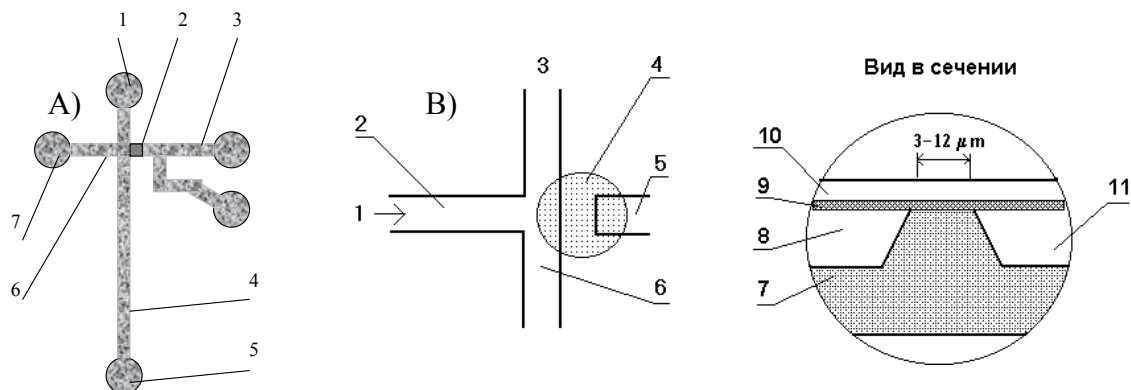


Рис. 17. Структура микрочипа с пористой мембраной для DNA-концентрирования и электрофоретического анализа [49]. А) 1 — микрососуд с буфером, 2 — пористая мембрана, 3 — боковой канал, 4 — сепарационный канал, 5 — микрососуд для слива, 6 — инъекционный канал, 7 — микрососуд с анализом. В) 1 — анализ, 2 — основной канал, 3 — буфер, 4 — пористая мембрана, 5 — боковой канал, 6 — сепарационный канал, 7 — основание (пластина с каналами), 8 — основной канал, 9 — связывающий интерфейс (силикат натрия), 10 — покровная пластина, 11 — боковой канал

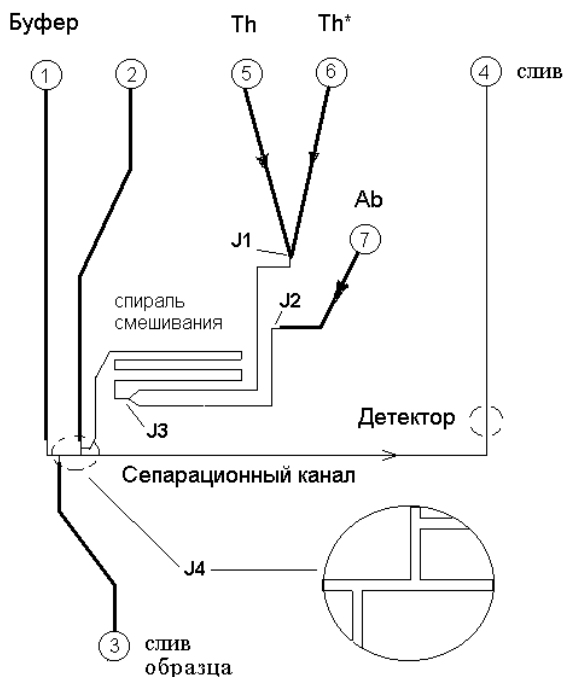


Рис. 18. Интегрированная система для конкурентного иммуноанализа теофилина в человеческой сыворотке [51]

может служить микроинъекционный клапан, включающий мембранную структуру. Авторы [49] использовали такой клапан для концентрирования DNA. Пористая мембрана включена в микроканальную систему, имеющую два канала, разделенных областью (3–12 мкм) и связанных тонким слоем пористого кремния (рис. 17). Эта структура дает возможность прохождения электрического тока, но препятствует движению больших молекул. Сконцентрированные молекулы могут быть инжектированы в разделительный канал и подвергнуты электрофоретическому анализу. Эксперименты показали нелинейное увеличение концентрации в зависимости от времени концентрирования (фрагменты DNA были сконцентрированы более чем в 100 раз).

Интеграция различных компонентов ЭФ-микросистемы — ключевая тема современных исследований. Недавно Harrison and Nghia H. Chiem (University of Alberta) сообщили о микрочиповой системе, в которую интегрирован иммунореактор и ВЭКЭ для конкурентного иммуноанализа теофилина в человеческой сыворотке [50, 51]. Содержащая лекарство разбавленная проба сыворотки смешивается на чипе с флуоресцентно-меченым теофилином и антитеофилиновыми антителами (в контактах с ограниченным количеством антител

свободный теофиллин конкурирует с меченым теофилином, поэтому чем больше теофилина в пробе, тем больше меченого теофилина в рабочей смеси). После реакции раствор инжектируется в ЭФ-сепарационный канал, интегрированный в том же чипе (рис. 18). Разделенные свободный и меченый антигены измеряются с помощью ЛИФ-детектора. Полученные данные позволяют определить концентрацию лекарства в сыворотке. Harrison and Shacuntala D. Mangru (University of Alberta) производили иммуноанализ, используя хемолюминесцентное детектирование в постсепарационном реакторе, интегрированном в микрочиповом приборе ВЭКЭ [46]. Группа Ramsey описала конструкцию микрочипа и процедуру полного анализа по меньшей мере 4 образцов ДНК на одном микрочипе [47]. Чип испытывался на фрагментах генома *Esherichia Coli* и ДНК-плазидах.

Существуют различные технологии создания интегрированных микрочиповых систем, объединяющих оптические волокна, аналитические микротитрационные камеры и флюидные капиллярные каналы. Авторами [52] описан процесс плазменного гидролизного напыления (FHD) стекла на кремний для интегрированного оптического и микрофлюидного устройства. Процесс FHD включает гидролиз и осаждение комплексов металла на поверхности слоистой («вафельной») структуры при высокой температуре, создаваемой горелкой. После формирования жилы стеклянного волновода или нескольких волноводов осуществляется реакция ионного травления. Покрытие (или наращивание) волноводов осуществляется путем последующего смещения дополнительно напыляемого слоя стекла. На заключительном этапе травления формируется аналитическая система микроканалов и микрососудов для движения жидкости (рис. 19). Полученные таким образом чипы использовались совместно с флуоресцентными детекторами. Объемы микротитрационных камер для пробы составляли 230 и 570 пЛ. Были созданы устройства с различной конфигурацией и геометрией волокон. Для оптимальной конфигурации микрочипа (размерами 25 × 10 мм) получен предел детектирования в 20 рМ (эквивалентно 10 zmol) цианового флуорофора Су5. Созданные биочипы использовались для аналитических измерений флуоресцентно меченных олигонуклеотидов.

Опыт исследователей показывает, что МФАС-микрочипы представляют быстродействующее и принципиально недорогое средство манипуляции и анализа ДНК, минимизирующее объем пробы и снижающее возможность загрязнения. Полагают, что многочисленные конструкции микрочипов могут быть предложены для генетического картирования, судебно-медицинского анализа, клинической диагностики наследственных болезней.

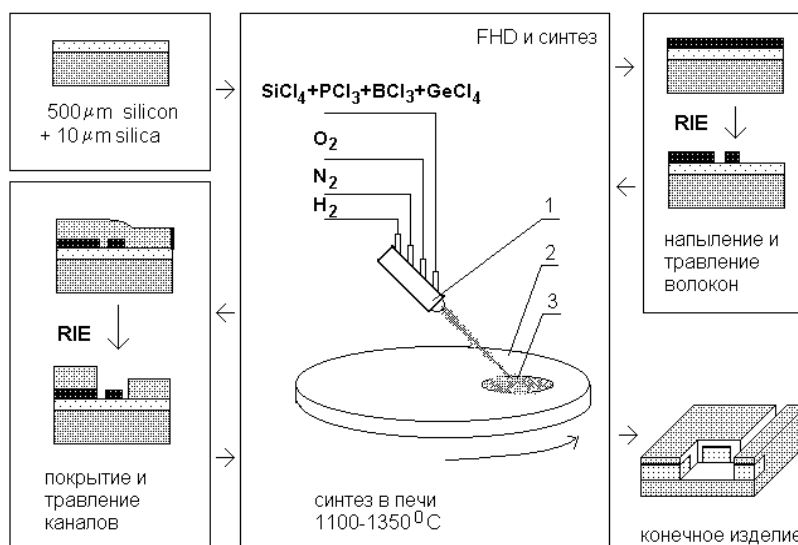


Рис. 19. Получение интегрированной микрочиповой системы методом пламя-гидролизного напыления (FHD) стекла на кремниевую основу в сочетании с реакцией ионного травления (RIE) [52]. 1 — Устройство, создающее высокотемпературное пламя, 2 — вращающаяся платформа, 3 — облатка («вафля»)

Группа Mathies'а показала, что все типы ЭФ-генетического анализа могут успешно выполняться на микрофабрикованных ВЭКЭ-системах [4]. Развитие этих работ выглядит следующим образом. В 1994 г. Mathies продемонстрировал первое определение длины фрагментов ДНК и разделение ПЦР-фрагментов, в 1995 г. — первую сепарацию секвенирования на чипах, в 1998 г. — первую хорошую сепарацию секвенирования. Mathies сообщает, что сепарация до 600 оснований за 20 минут демонстрирует возможность использования микрофабрикованных систем для геномного секвенирования. Группа Mathies особое внимание уделяет созданию интегрированных в чип детекторов. По мнению Mathies, электрохимический детектор по чувствительности не уступает флуоресцентному и является универсальным: реагирует на все типы веществ, включая ДНК, и позволяет изготовить полную портативную систему анализа ДНК на основе μ -TAS [53]. Чипы такой системы имеют фотолитографированные рабочие электроды, которые осуществляют высокочувствительное детектирование нейротрансмиттеров при минимальной интерференции с сепарационным электрическим полем.

Усовершенствуя схему и плотность упаковки элементов μ -TAS, можно изготовить микропроцессор химического анализа, где схемы детектора и компьютера интегрированы в аналитический чип, способный определять присутствие биологических веществ в различных неординарных местах, включая взвешиваемые условия.

Микролинейки ВЭКЭ быстро эволюционируют. Сегодня можно параллельно анализировать 96 проб ДНК менее чем за 12 с, в то время как в 1994 г. для анализа одной пробы ДНК требовалось 120 с, что соответствует 10-кратному увеличению как числа образцов на чипе, так и производительности анализа.

9.2. Диагностический диэлектрофорез на чипе

Междисциплинарная группа исследователей в Institute for Molecular & Biomolecular Electronics (University of Wales, Bangor, group leader Prof. Ronald Pethig) разработала микротехнологию изготовления «bioprocessor-on-a-chip» [4]. В приборах использована уникальная высокоперспективная технология диэлектрофореза (ДЭФ) на микрочипах для оценки микроорганизмов и клеток. Разработанные чипы могут за считанные минуты диагностировать инфекции или болезни, сепарируя бактерии, клетки новорожденных или раковые клетки от кровяных клеток. Эта технология основана на выделении биочастиц таких, как клетки, вирусы, бактерии, белки и ДНК, с высоким уровнем селективности и чувствительности. ДЭФ — это движение частиц, вызываемое электрической поляризацией в неоднородном электрическом поле. В отличие от ЭФ для движения частиц не требуется наличия у них электрического заряда и используется переменное электрическое поле. Подобная техника имеет большой потенциал развития. По мнению Harrison'а [1, 4], ДЭФ — более тонкая техника для фракционирования клеток, чем

ЭФ постоянного тока. Причем, микроэлектродные устройства и необходимая электроника для ДЭФ стоят недорого. Хотя прототипы приборов сделаны из стекла, использование лазерной абляции и фотолитографии позволяет изготавливать более дешевые чипы из пластика, к которым должны присоединяться необходимые электронные модули, система детектирования и средства обработки и вывода информации. ДЭФ — технология позволяет работать с одной частицей, однако все-таки лучше тестировать не менее 10 частиц. Этот уровень чувствительности достаточен для обнаружения незначительного числа бактерий, внутриутробных клеток, раковых клеток в крови, вирусов или бактерий в спинномозговой жидкости у пациентов, подозреваемых на инфекцию менингитом. Операторы с минимальной тренировкой могут получать диагностические ДЭФ-тест-результаты за 20 минут. В процессе использования ДЭФ-чипа выделяются клетки — мишени, изучается их морфология, производится окрашивание, иммунное или генетическое тестирование непосредственно на чипе.

Предсказываются многочисленные потенциальные применения этой технологии, включая помощь супермаркетам в защите покупателей от инфицированных мясных продуктов и обеспечение компаний водоочистки средствами быстрого и эффективного скрининга биологических загрязнений. ДЭФ-анализатор может быть, например, использован для тестирования паразитов, таких как *Cryptosporidium* или *Giardia*, которые не культивируются на чашках Петри по Pethig'у. Обнаружение этих паразитов и определение их жизнеспособности помогут компаниям водоочистки принимать решения о возможности использования водных источников. Для этих целей планируется изготавливать специальные приборы, укомплектованные ДЭФ-анализатором — электронным транспортером, емкостью смешения и сепарационной системой в едином микрочипе. Каждый электронный транспортер состоит из серии микроэлектродов. Первый микроэлектрод синхронизирован с пятым, второй с шестым и т.д. Электроды генерируют электрическое поле, которое служит селективным толкателем для микроорганизмов или клеток вдоль транспортера. Если необходимо отметить микроорганизм, чтобы отличить от других частиц пробы, его можно пометить, например, крошечной полистирольной сферой, покрытой антителами, специфичными к этому микроорганизму. Такие сферы хранятся в резервуаре на чипе, или проба может быть пропущена через резервуар с метками перед нанесением на чип. Меченый микроорганизм движется в электрическом поле и может быть обнаружен с помощью оптической микроскопии или анализатора изображений. Для внедрения такой технологии на рынок учреждена специальная компания Aura Diagnostics Mountain View, CA, USA.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итак, микрофлюидные аналитические системы представляют собой реализацию в формате гибридной микросхемы высокоэффективного капиллярного электрофореза и способны производить огромное количество химических анализов на единичной флюидной микросхеме (чипе). МФАС, обладая высоким потенциалом интеграции химии, механики, электроники и оптики, позволяют разместить системы подготовки пробы и ее анализа на очень малой площади. Использование в МФАС высокочувствительных детекторов, в том числе детекторов лазер-индуцированной флуоресценции (в первую очередь в ближней ИК-области), позволяет получить сверхвысокую чувствительность обнаружения веществ. Интеграция многих аналитических компонентов и их дублирование (многоканальные системы) в одном чипе дает возможность реализовать сверхэффективный и скоростной суперпроизводительный анализ, создавать анализаторы карманных размеров.

Применение универсальных аналитических возможностей, в том числе и совершенных технологий биоузнавания (ДНК-гибридизация, иммунное связывание), позволяет осуществлять усовершенствования иммуноанализа, повышая производительность до рекордных величин — сотен тысяч определений в сутки.

При этом возможны быстрый переход от разработки к массовому выпуску специализированных приборов для конкретных диагностических целей, неограниченное масштабирование производства по единой технологии при простоте изготовления и функционирования, низкой стоимости приборов и их эксплуатации, хорошей точности и воспроизводимости анализа.

Реализация МФАС в России должна проводиться на уже имеющихся высокотехнологических процессах электронной промышленности и прецизионной технике аналитического приборостроения.

Приоритетными направлениями по-прежнему остаются приборы для биомедицинских исследований и медицинской диагностики, на что должны быть направлены усилия разработчиков.

Проведенный анализ литературных источников по микрофлюидным аналитическим системам позволил выявить, что наиболее актуальным представляется создание следующих МФАС.

1. Синергетической диагностической панели для иммунодиагностики биохимических маркеров инфаркта миокарда.

2. 12-канального чип-анализатора для сверхпроизводительного генотипирования (анализа фрагментов ДНК) с ПЦР-усилением.

3. Чип-анализатора для определения гликозил-гемоглобина.

4. Чип-анализатора (иммуноанализатора) крови на основе Т-сенсора.

5. Мультиплексного чип-анализатора (иммуноанализатора) крови на основе Ж-сенсора.

Работа осуществлялась при частичной финансовой поддержке Межведомственной научно-технической Программы «Вакцины нового поколения и медицинские диагностические системы будущего» в рамках проекта 02.05.194 «Микроаналитические системы: портативные и лабораторные экспресс-анализаторы и биосенсоры на основе чип-реализации одноканального и мультиканального приборов капиллярного электрофореза и иммуноэлектрофореза».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

21. *Abbot N.L. et al.* // *Science*. 1999. V. 283. P. 57–60.
22. *Gau H., Herminghaus S., Lenz P., Lipovsky R.* // *Science*. 1999. V. 283. P. 46–49.
23. *Lopez C.P., Biebyik H.A., Wietsides G.M.* // *Science*. 1993. V. 260. P. 647–650.
24. *Morhard F. et al.* // *Electrochem. Soc. Proc.* 1997. V. 97. P. 1058–1060.
25. *Jacobs K. et al.* // *Science*. 1998. V. 282. P. 916–919.
26. *Wang R. et al.* // *Nature*. 1997. V. 388. P. 431–434.
27. *Moller G., Harke M., Motschmann H.* // *Langmuir*. 1998. V. 14. P. 4955–4958.
28. *Chandrasechar G.* *Hydrodynamic and Hydromagnetic Stability*. N.Y.: Doverm. 1981.
29. *Debregeas G., de Gennes P.-G., Brochard-Wyart F.* // *Science*. 1998. V. 279. P. 1704–1707.
30. *Bar-Ziv E., Mses E.* // *Phys. Rev. Letter*. 1994. V. 73. P. 1392.
31. *Struwe M.* *Plateau's Problem and the Calculus of Variation*. Princeton, Princeton Univ. Press., 1988.
32. *Sollivan J., Morgan F.* // *Int. J. Math.*, 1996. V. 7. P. 833.
33. *Rowlinson J.S., Vidom B.* *Molecular Theory of Capillarity*. Oxford: Clarendon. 1982.
34. *Lenz P., Urovsky R.* // *Phys. Rev. Letter*. 1988. V. 80. P. 1920.
35. *Brakke R.* // *Exp. Math.* 1990. V. 1. P. 141–143.
36. German Patent № 19748295.3.
37. *Weigl B.H., Yager P.* // *Science*. 1999. V. 283. P. 346–347.
38. *Kamholz A.E., Weigl B.H., Finlayson B.A., Yager P.* // *Anal. Chem.* 1999. V. 71. P. 5340–5347.
39. *Darling R.B., Yager P., Weigl B.H., Kriebel J., Mayes K.* // *Micro Total Analysis System '98*, Banff, Canada. 12–18 Oct. 1998. P. 81–84.
40. *Roberts M.F., Rossier J.S., Bercier P., Girault H.* // *Anal. Chem.* 1997. V. 69. P. 2035–2042.
41. *Effenhauser C.S., Bruin G.J.M., Paulus A., Ehrat M.* // *Anal. Chem.* 1997. V. 9. P. 3451–3457.
42. *Martynova L., Locascio L.E., Gaitan M., Kramer G.W., Christensen R.G., MacCrehan W.A.* // *Anal. Chem.* 1997. V. 69. P. 4783–4789.
43. *McCormick R.M., Nelson R.M., Goretty M. Alonso-Amigo, Benvegna D.J., Hooper H.H.* // *Anal. Chem.* 1997. V. 69. P. 2626–2630.
44. *Manz A. et al.* // *J. Chromatogr. A*. 1998. V. 815. P. 265.
45. *Manz A., De Mello, Kopp M.U.* // *Science*. 1998. V. 280. P. 1046–1047.
46. *Harrison D.J., Manz A., Fluri K., Seiler K., Fan Z., Effenhauser C.S.* // *Science*. 1993. V. 261. P. 895.
47. *Mathies R.A. et al.* // *Anal. Chem.* 1999. V. 71. P. 566–573.
48. *Ramsey J.M. et al.* // *Anal. Chem.* 1998. V. 70. P. 3476–3480.
49. *Khandurina J., Jacobson S.C., Waters L.C., Foote R.S., Ramsey J.M.* // *Anal. Chem.* 1999. V. 71. P. 1825–1819.
50. *Harrison D.J., Nghia H. Chiem* // *Clin. Chem.* 1998. V. 44, N 3. P. 591–598.
51. *Harrison D.J., Mangru Sh. D.* // *Electrophoresis*. 1998. V. 19. P. 2301–2307.
52. *Ruano J.M., Benoit V., Aitchison J.S., Cooper J.M.* // *Anal. Chem.* 2000. V. 72. P. 1093–1097.
53. *Wooley A.T., Lao K., Glazer A.N., Mathies R.A.* // *Anal. Chem.* 1998. V. 70. P. 684–688.

Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург (Б. Г. Беленький, Н. И. Комяк, В. Е. Курочкин, А. А. Евстратов)

Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН, Санкт-Петербург (В. Л. Суханов)

Материал поступил в редакцию 19.06.2000.

MICROFLUID ANALYTICAL SYSTEMS (PART 2)

B. G. Belenkii, N. I. Komyak, V. E. Kurochkin, A. A. Evstrapov, V. L. Sukhanov¹

Institute for Analytical Instrumentation RAS, Saint-Petersburg

¹*A.F. Ioffe Physico-Technical Institute RAS, Saint-Petersburg*