

УДК 543.545.002.56

© Б. Г. Беленький

ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫЙ КАПИЛЛЯРНЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ И МИКРОФЛЮИДНЫЕ ЧИП-АНАЛИЗАТОРЫ.

II. МИКРОФЛЮИДНЫЕ ЧИП-АНАЛИЗАТОРЫ

Статья посвящена новому направлению аналитического приборостроения — микрофлюидным чип-анализаторам (МФЧА). Описаны преимущества этого класса приборов перед большими лабораторными системами. Рассмотрены технические и технологические проблемы и их решения при создании микрочипов, перспективы разработок МФЧА и применения.

МИКРОФЛЮИДНЫЕ ЧИП-АНАЛИЗАТОРЫ (МФЧА): ИХ ПРЕИМУЩЕСТВА

МФЧА — это универсальные аналитические приборы с возможностями высокоэффективного капиллярного электрофореза (ВЭКЭ) в режиме "on line".

1) Они изготавливаются по технологиям микроэлектроники: фотолитография—травление, групповая обработка.

2) Им присущ высший достигнутый сегодня уровень миниатюризации и интеграции аналитических приборов (lab-on-a-chip). Примером может служить многоканальный электрофоретический чип-анализатор с ПЦР-реактором.

3) Характеризуются эффективным использованием современных технологий биоузнавания и монолитных (контролируемых конвективным межфазным массопереносом) микросистем биосепарации.

4) В МФЧА реализуется суперчувствительное (zeptamольное) детектирование с помощью лазериндуцированного флуориметра (LIF) и высокочувствительного амперометрического детектора.

5) Масштабы сложности универсальны: от одноразового чип-сенсора до 100-канальной чип-линейки.

6) Создание чип-анализаторов путем компьютерного проектирования фотошаблонов с автоматическим изготовлением канализированной пластинки и сборки приборов из стандартных компонентов обеспечивает в результате увеличение надежности, удешевление, быстрый переход от идеи прибора к его производству.

В выборе Институтом аналитического приборостроения РАН МФЧА-направления приборных разработок немаловажную роль сыграли следующие обстоятельства.

1) Выдающийся научно-технический потен-

циал ФТИ им. А.Ф. Иоффе РАН в физике полупроводников, уникальных технологиях создания полупроводниковых компонентов МФЧА с предельно малыми токами утечки, рекордной чувствительностью и гигантским диапазоном линейности.

2) Срочный (ввиду нереальности быстрого развития в России современного аналитического приборостроения) социальный заказ на МФЧА для биомедицинского и экологического мониторинга на основе генетического, биохимического и иммуноанализа.

МФЧА обладают большим потенциалом широкого применения [1] (таблица). Миниатюризация устройств для использования в указанных в таблице областях науки и техники дает большие преимущества за счет портативности и связанных с этим уменьшением стоимости производства и эксплуатации; сокращением времени анализа, снижением потребления реагентов и анализируемых веществ, сокращением потенциально вредных побочных продуктов, повышением эффективности разделения. Кроме того, некоторые исследования трудно или невозможно осуществлять с использованием приборов большого размера. Микрофлюидные каналы по своим размерам и условиям течения (≈ 10 мкм, 0.1 см/с) приближаются к капиллярам в живом организме [2], и использование научно-исследовательских и диагностических приборов с капиллярами такого размера и эластичности, какие встречаются в биологии, могло бы привести к получению более точной информации и лучшему пониманию физиологии. Использование более узких каналов приводит к увеличению разрешающей способности при меньших габаритах прибора. Однако узкие каналы предъявляют более высокие требования к детектированию, подвержены засорению частицами и более чувствительны к адсорбции частиц на поверхности [3].

Перспективные области применения МФЧА

№ п/п	Область применения	Функции
1	Защита от химического и биологического оружия	Раннее обнаружение и идентификация патогенов и токсинов, ранняя диагностика особо опасных инфекций
2	Клинический анализ	Экспресс-анализ крови и биологических жидкостей, диагностика у постели больного на основе иммунологического и биохимического анализа
3	Высокопроизводительное обследование (скрининг)	Токсикологический анализ, анализ наркотиков
4	Контроль окружающей среды	Оперативный анализ загрязнений окружающей среды
5	Фундаментальные исследования	Создание специальных микроаналитических и микросинтетических систем
6	Исследование химических реакций	Изучение фермент-субстратного взаимодействия, кинетики реакций в водных растворах
7	Исследование малых количеств пробы	Микросистемы пробоподготовки
8	Генетические микроанализаторы	В порядке повышения сложности: — анализ ПЦР-копий ДНК для диагностики онкологических, инфекционных (СПИД, гепатиты В и С, туберкулез) заболеваний; — генотипирование (в медицине — для диагностики заболеваний, в криминалистике — для идентификации личности, в сельском хозяйстве — для селекции ценных пород животных и сортов растений); — мониторинг экспрессии генов; — количественное определение ДНК-маркируемых патогенов; — определение нуклеотидной последовательности (секвенирование) ДНК

С развитием МФЧА создается новая линия многоцелевых приборов медицинского и экологического мониторинга, беспрецедентных по качеству дешевых портативных (карманных) чип-анализаторов для диагностики биохимически-, иммунно- и генетически-маркируемых патогенов и заболеваний, определения экотоксикантов.

МФЧА разрабатываются на Западе более десяти лет. Показано, что использование МФЧА в областях науки и техники, указанных в таблице, дает большие преимущества за счет уменьшения стоимости производства микроприборов и их эксплуатации; сокращения времени анализа; снижения потребления реагентов и анализируемых веществ; уменьшения потенциально вредных побочных продуктов; сокращения объемов утилизируемых

отходов; повышения эффективности разделения; портативности, позволяющей, например, организовать медицинскую диагностику у постели больного. Установлено, что главные преимущества МФЧА перед их прототипом — высокоэффективным капиллярным электрофорезом (ВЭКЭ): лучшая система ввода микропробы (крест); значительно меньшие размеры; стоимость и расход реагентов; большая концентрация аналитических элементов на единицу площади, позволяющая интегрировать в прибор не только детектор и микроконтроллер, но и системы подготовки пробы и дериватизации (позволяя тем самым получить компактную микроаналитическую систему lab-on-a-chip).

Здесь очень важно различать перспективные

области применения микрочипового и капиллярного форматов ВЭКЭ. Развитие эластомерной технологии изготовления МФЧА [1] позволило ускорить и удешевить разработку и изготовление чип-анализаторов. Однако они пока еще не реализуются как миниатюрные карманные приборы, несмотря на заложенный в них мощный потенциал миниатюризации. МФЧА все еще остаются относительно дорогостоящими лабораторными приборами, главным образом по причине использования суперчувствительного, но дорогого и габаритного лазер-индуцируемого флуоресцентного (ЛИФ) детектора. К подобным приборам относится и разработанный в ИАП РАН четырехканальный чип-анализатор (чипы изготовлены в ФТИ им. А.Ф. Иоффе РАН) для анализа ДНК (генетический дисплей).

Вместе с тем современное развитие полупроводниковых и полимерных технологий ставит задачу резкого уменьшения габаритов и стоимости МФЧА, создания прибора капиллярного электрофореза карманного формата.

Стратегия развития МФЧА приводит к последовательной оптимизации все большей части микроприбора. Сегодня оптимизация МФЧА связана с созданием оптимальной топологии каналов и реакторов чипа, а главное, с разработкой новых миниатюрных полупроводниковых элементов микроэлектроники с быстродействующими ключами, определяющими качество (чувствительность, стабильность) детекторов, обеспечивающих выдающуюся чувствительность ($\leq 10^{-15}$ А) и диапазон линейности (вплоть до 10^{10} и более). Последнее дает возможность присоединить амперометрический детектор непосредственно к электрофоретическому сепарационному каналу чип-анализатора, несмотря на тысячекратное различие в диапазонах падения потенциала в этих элементах прибора, и, следовательно, подавить интерференцию электрических полей сепарационного канала и амперометрического детектора.

Таким образом, технология получения полупроводниковых элементов МФЧА включается в оптимизируемую часть чип-анализатора, открывая путь к созданию недорогих высокочувствительных микросхемных детекторов — спектрофотометрического (СФД) и амперометрического (АМД). Эффективное использование гибких полупроводниковой и эластомерной технологий прокладывает путь к созданию глубоко оптимизированного (абсолютного) МФЧА, эффективных недорогих методов их разработки и изготовления.

СТЕКЛЯННО-КРЕМНИЕВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ИЗГОТОВЛЕНИЯ МФЧА

Развитие молекулярной биологии, исследование генома человека стимулировали разработку

МФЧА. Было показано, что оптимальными с позиций скорости анализа и чувствительности детектирования для водных растворах являются МФЧА на основе микроэлектрофореза. Эти микроприборы были впервые разработаны в четырех лабораториях: Манца [4, 5–8], Харрисона [9–14], Рамсея [15–20] и Мэтиса [21–24].

Большая часть первых МФЧА была изготовлена с применением доступных и хорошо разработанных технологий микроэлектроники: фотолитографии и травления в кремнии или стекле. Однако кремний — сравнительно дорогой материал, он непрозрачен в видимой и УФ-областях спектра и поэтому непригоден для систем с оптической регистрацией, не позволяет наблюдать движение жидкости в каналах чипа. Стекло прозрачно, однако из-за аморфности стекла оно труднее подвергается травлению, чем кремний. Хотя и кремний, и стекло допускают групповую обработку, технология герметизации чипов из этих материалов требует изготовления приборов в условиях "чистой" комнаты. Процессы герметизации обычно нуждаются в использовании высоких температур. С другой стороны, поскольку поверхности стекла и окиси кремния заряжены отрицательно, в чипе создаются естественные условия электроосмотического течения (ЭОТ) буферных растворов (в сторону катода), причем при формировании каналов путем травления их поверхность очищается и приобретает отрицательный заряд. Применение стеклянных систем оказалось особенно успешными для разделения и секвенирования ДНК [21–25], но в случае белков возникают проблемы из-за их адсорбции.

Вместе с тем классические (стеклянно-кремниевые) МФЧА имеют недостатки, затрудняющие их эффективное применение. Основные из них (по сравнению с ВЭКЭ) это:

1) жесткая привязка каналов МФЧА (сепарационного и пробы) к резервуарам и нереальность использования простого и эффективного (лежащего в основе конструкции приборов ВЭКЭ) способа подготовки к анализу путем забора буферных растворов, реагентов и пробы из сменяемых резервуаров (пробирок) в капилляр и их перемещения в капиллярах при повышении давления воздуха в резервуарах над жидкостью или создании вакуума;

2) невозможность автоматической замены растворов в каналах (при вводе пробы, буферного раствора и сборе фракций) путем механической смены резервуаров (как это происходит в приборах ВЭКЭ и что является их сильным преимуществом);

3) ввод пробы ограничен только методом электромиграции (в ВЭКЭ, кроме того, используются воздушное и гидростатическое давления);

4) затруднена автоматизация МФЧА, т. к. при переходе к анализу новой пробы требуются ручные операции промывания резервуаров и каналов, заполнения их свежим буферным раствором и пробой;

5) автоматизированные технологии разработки и изготовления МФЧА (компьютерное проектирование, фотолитография, травление, глубокая рентгеновская литография — технологии LIGA), равно как и высокоэффективные технологии разработки и изготовления пластиковых чипов, заимствованы из микроэлектроники. Они имеют преимущество неограниченного масштабирования производства на единой технологической основе и соответственно быстрого перехода от идеи разработки к массовому выпуску специализированных приборов МФЧА. Эти технологии экономичны только при массовом производстве. При штучном изготовлении чипов, а именно такая необходимость возникает при итеративной разработке новых приборов и технологий, заимствованные из микроэлектроники технологические операции (требующие дорогостоящего оборудования и "чистых комнат") стоят дорого, под силу только дорогим центрам микроэлектроники, но не биотехнологическим лабораториям.

Для устранения недостатков МФЧА по п. 1) и 2), если не задаваться целью изготовить в формате чипа миниатюрную копию прибора ВЭКЭ (последнее представляется абсурдным), необходимо "развязать" резервуары и каналы. Этого, например, можно достичь, сделав чип-анализатор сборно-разборным, состоящим из а) сменяемой одноразовой эластомерной канализированной пластинки и б) стационарной части — базовой стеклянной пластины с электродами, ЛИФ или другим детектором, высоковольтным источником питания с коммутатором (потенциостатом), микропроцессорным контроллером. Подобная архитектура МФЧА обеспечивает быструю смену канализированной части чипа, делает ненужным промывание резервуаров и каналов, а приведение чипа в рабочее состояние осуществляется путем заполнения каналов и резервуаров собранного чипа свежим буферным раствором и новой пробой. Эти манипуляции функционально эквивалентны механической смене резервуаров, как это делается в ВЭКЭ, и позволяют, кроме того, заменять (обновлять) каналы (капилляры), что в ВЭКЭ не практикуется. Вместе с тем не просматривается простых способов устранения недостатков МФЧА по п. 3) и 4). Что касается недостатков МФЧА по п. 5), то их устранение обеспечивает (как это будет видно из дальнейшего) переход к эластомерным технологиям, включающим "быстрое макетирование".

**ЭЛАСТОМЕРНЫЕ МФЧА.
ПОЛИДИМЕТИЛСИЛОКСАНОВЫЕ (ПДМС)
ЧИП-АНАЛИЗАТОРЫ ДЛЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ
ПРОБ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ**

Со времени первых работ в области МФЧА произошло ее быстрое расширение [26–35] за счет

привлечения новых видов материалов, особенно полимеров [36–43]. В отличие от кремния и стекла полимеры — недорогие материалы, каналы в них могут создаваться не только травлением, но и формовкой или тиснением, герметизация осуществляется термически или путем склеивания. Недостатком полимеров является то, что химия поверхности полимеров требует большего внимания, чем в случае стекла или кремния, они часто несовместимы с органическими растворителями и низкомолекулярными органическими растворенными веществами, к тому же в большей части они не выдерживают высоких температур.

В настоящее время среди МФЧА приоритетное значение приобретают полидиметилсилоксановые (ПДМС) чипы [1] не только благодаря превосходным качествам ПДМС как материала для изготовления чипов, но и благодаря высокой эффективности эластомерных технологий разработки и изготовления чип-анализаторов. При выборе метода изготовления МФЧА определяющими являются: 1) его конструктивные параметры, такие как размер и геометрия каналов, необходимые элементы для инъекции пробы, ее разделения, детектирования; 2) химия внутренней поверхности каналов чипа и, что имеет важнейшее значение, 3) число и характер (сложность) необходимых технологий для разработки и производства МФЧА и определяемая этим их стоимость.

Сейчас ясно: для того чтобы МФЧА широко использовались, они должны, во-первых, обладать оптимальным комплексом свойств, необходимых для их применения, например определенными оптическими свойствами или химическими свойствами поверхности, и, во-вторых, изготавливаться из недорогих материалов с помощью минимума недорогих технологий, хорошо встраиваемых в производственный процесс. От этого зависит стоимость чипа и быстрота превращения идеи разработки в работающий прибор.

ПДМС — превосходный материал для изготовления МФЧА, предназначенных для работы с биологическими пробами в водных растворах, по следующим причинам:

- 1) возможность воспроизводимого получения элементов микронного масштаба путем высококачественного формования отпечатков (реплик);
- 2) оптическая прозрачность до $\lambda \geq 280$ нм, что позволяет использовать чипы с оптическими детекторами (например, абсорбционным и флуоресцентным в УФ- и видимой областях спектра);
- 3) отверждение при комнатной температуре;
- 4) нетоксичность, допускающая культивирование клеток млекопитающих непосредственно на поверхности ПДМС, а изготовленные из него устройства имплантировать в живые ткани;
- 5) возможности обратимого присоединения ПДМС-изделий к поверхности ПДМС и другим

материалам за счет создания молекулярного (ван-дер-ваальсова) контакта (адгезии) с поверхностью (при обработке поверхности ПДМС воздушной плазмой может осуществляться и регулируемая необратимая адгезия (герметизация) с образованием ковалентных связей);

6) контроль химических свойств поверхности ПДМС с помощью хорошо развитых методов;

7) из-за того что ПДМС — эластомер с регулируемой эластичностью, хорошее сопряжение с гладкими неплоскими поверхностями и легкое высвобождение из мелких каналов и неровностей модели без ее повреждения и повреждения формируемого изделия (реплики).

Специальные эластомерные технологии быстрой разработки и дешевого изготовления канализированных пластин

Метод быстрого макетирования

Метод быстрого макетирования для изготовления моделей (оригиналов) [44, 45] объединяет промышленную трафаретную печать высокого разрешения, фотолитографию и мягкую литографию. Этот метод позволяет быстро и экономично (в соответствии с числом планируемых к изготовлению реплик) проектировать и изготавливать модели для получения эластомерных (ПДМС) МФЧА.

Процедура начинается с создания схемы прибора в программе машинного проектирования (CAD). Затем эта схема отпечатывается на прозрачном материале (транспаренте) с помощью серийно выпускаемого устройства формирования изображений высокого разрешения. Такой транспарент служит фотошаблоном в контактной фотолитографии для получения позитивного рельефа фоторезиста на кремниевой пластине. Этот положительный рельеф называют "оригиналом" (моделью) и используют для литья приборов из ПДМС. Так, оригинал, выполненный в фоторезисте SU-8 [46], фотоотверждаемой эпоксидной смоле на кремниевой пластине, отличается большой прочностью и может использоваться достаточно долго. Быстрое макетирование позволяет снизить время и стоимость цикла проектирования, изготовления и проверки новых идей по сравнению с методами, использующими на стадии фотолитографии хромовые фотошаблоны (трафареты). Хромовый фотошаблон в 20–100 раз дороже транспарента, и для его изготовления требуются недели вместо часов в случае транспарента. Недостаток транспарента — более низкое разрешение (>20 мкм), чем у хромового фотошаблона (≈ 500 нм). Применение устройств формирования изображений более высокого разрешения (> 3388 точек на дюйм) позволяет уменьшить размер деталей при быстром макетировании. Однако в большинстве случаев диаметр каналов чипа составляет 50–100 мкм, т. е. находится в пределах теперешних возможностей быст-

рого макетирования. Для изготовления же устройств с деталями меньше 20 мкм необходимо использовать хромовые фотошаблоны. Недостаточное разрешение транспарентов приводит к тому, что боковые стенки каналов получаются с неровными краями. Однако такая шероховатость краев не мешает получать электрофоретические каналы с сечением 50×50 мкм, т. е. с разрешением, сравнимым с разрешением в капиллярах из плавленного кварца подобного сечения [44].

Мягкая литография как основа получения оригиналов (моделей)

Мягкая литография [45, 47, 48] — это совокупность нефотолитографических методов копирования рисунка — пластиковой структуры, сформированной на поверхности в виде базового рельефа, действующего как агент переноса изображения. При использовании этих методов отсутствует необходимость в "чистой комнате" для получения большинства структур микрофлюидной техники (размером 20–100 мкм). Мягкая литография позволяет переносить рисунок и на материалы с криволинейной поверхностью.

Другие перспективные методы получения оригиналов

Для получения ПДМС-канализируемых пластин можно использовать оригиналы, выполненные в фоторезисте методом быстрого макетирования. Оригиналы могут изготавливаться и другими способами, в том числе травлением кремния, из фоточувствительного стекла, когда травление стекла происходит по скрытому изображению, полученному экспонированием фотошаблона, электроформовкой металла или традиционными методами механической обработки твердых материалов. Природа оригинала должна соответствовать производственному циклу получения реплик. Оригиналы из металлов или других твердых материалов должны использоваться вследствие их прочности в длинном производственном цикле (получении большого числа реплик). При многократном использовании стоимость подобных моделей окупается. Для производств с коротким циклом металлические и кремниевые формы дороги, их изготовление требует много времени. Это нереально при научных исследованиях и разработках, когда окончательный вариант прибора получается в результате неоднократных итераций.

Получение реплик

Канализированную ПДМС-пластину получают путем формования (литья) ПДМС-реплик в виде негативной копии оригинала: при этом выступы в оригинале соответствуют углублениям в реплике. Реплика из форполимера отверждается в термостате при температуре 60 °С в течение 1 ч и от-

деляется от оригинала. Отверстия, открывающие доступ к каналам и резервуарам для буфера, могут изготавливаться на стадии копирования путем размещения штырей в оригинале или высверливанием отверстий в уже отвержденной ПДМС-пластинке. Можно использовать оригиналы, выполненные в фоторезисте методом быстрого макетирования.

Герметизация ПДМС-чипов

В результате формовки ПДМС создается реплика, содержащая три из четырех стенок канала. Соединение реплики с плоской поверхностью создает четвертую стенку. Этим плоским материалом может быть ПДМС, в результате все стенки канала будут из одного и того же материала. Но может использоваться и другой материал, например стекло. Для герметизации чипа применяются два метода: 1) обратимое герметичное соединение с плоской поверхностью и 2) необратимое соединение с подложкой после экспозиции обеих соединяемых поверхностей в воздушной плазме [49]. Обратимое соединение получается потому, что ПДМС — гибкий материал и может заполнять мельчайшие дефекты в "плоской" поверхности, что обеспечивает достижение ван-дер-ваальсова контакта с поверхностью необходимой прочности. Этот метод герметичного соединения обеспечивает водонепроницаемость, отличается быстротой и производится при комнатной температуре. Такое обратимое соединение разрушается просто путем срывания ПДМС-реплики с поверхности.

Химия поверхности ПДМС

Одним из важнейших вопросов при выборе подходящего материала для МФЧА является химия поверхности, которая у немодифицированного ПДМС гидрофобная. Гидрофобный ПДМС в каналах плохо смачивается водными растворами, склонен адсорбировать другие гидрофобные вещества, в частности белки, способствует образованию пузырьков воздуха. Однако плазменное окисление поверхности ПДМС превращает ее в гидрофильную за счет образования на поверхности силанольных групп Si—ОН [49–51]. При контакте с нейтральными или щелочными растворами силанольные группы на стенках каналов ионизируются ($\text{SiOH} \leftrightarrow \text{SiO}^- + \text{H}^+$) и обеспечивают сильное электроосмотическое течение по направлению к катоду. Выдержка реплики из ПДМС в воздушной плазме приводит к образованию активных полимерных групп на поверхности. Полагают, что плазма создает силанольные группы (Si(OH)—CH_3) [49–51], которые конденсируются с группами ОН, СООН, кетонов на другой поверхности, когда они приводятся в тесное соприкосновение. В случае ПДМС и стекла такая реакция дает силосановые связи Si—O—Si с потерей воды.

Эти ковалентные связи образуют плотное необратимое соединение. Попытка разрушить это соединение приводит к разрушениям в объеме ПДМС [44, 49]. Такое соединение выдерживает давление 30–50 фунтов/дюйм [44]. Однако в ПДМС-технологиях используется ограниченное число полимеров. Среди них саран, полиимид, полиметилметакрилат и поликарбонат [44].

Перемещение жидкости в каналах ПДМС-чипа

Поскольку поверхность ПДМС может заряжаться, а сам чип при необратимой герметизации выдерживать высокое давление — этот материал является превосходным для инъекции за счет электроосмотического потока, а в систему легко установить микроизготовленные мембранные насосы и обратные клапаны.

МФЧА НОВОГО ТИПА: НОВАЯ АРХИТЕКТУРА, НОВЫЕ МАТЕРИАЛЫ, НОВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ

Переход от классической стекляннo-кремневой технологии изготовления чип-анализаторов, обладающей многими недостатками и сложной в производстве, к новой эластомерной технологии получения недорогих и удобных одноразовых (сборно-разборных) чип-анализаторов переносит изготовление чипов из дорогостоящих центров микроэлектроники в биотехнологические лаборатории и удешевляет анализ с помощью МФЧА в десятки раз. Для перехода отечественного аналитического приборостроения от классической стекляннo-кремневой технологии получения чип-анализаторов к новой эластомерной технологии изготовления одноразовых эластомерных сборно-разборных чипов необходимы следующие шаги.

Перейти от формата ВЭКЭ к формату МФЧА (реализуемому в виде одноразового сборно-разборного чипа), используя "мягкую литографию" получения оригиналов (моделей), изготовление ПДМС-реплик путем полимеризации (отливки) на этих моделях (оригиналах), адгезионную сборку чипов (с получением недорогих одноразовых ПДМС сборно-разборных чипов).

И наконец, выйти из ПДМС-технологии в другие эластомерные технологии (не ПДМС), т. е. выйти из патентно-защищенного поля ПДМС МФЧА.

МИКРОФЛЮИДНЫЕ ЧИП-АНАЛИЗАТОРЫ С ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИМ (АМПЕРОМЕТРИЧЕСКИМ) ДЕТЕКТОРОМ

Эффективность микропроцессора химического анализа на одиночном чипе определяется интеграцией химической реакции, сепарации и системы

детектирования. В настоящее время интеграция позволяет создавать микроустройства для рестриционного гидролиза ДНК, секвенирования с сепарационной чистотой в одно основание [55], ПЦР с определением размеров ампликонов [56], производить сортировку клеток, а у выбранных клеток — лизис мембран [57]. Однако прогресс останавливает неясность с интеграцией в чипы миниатюрных высокочувствительных детекторов. В то время как ЛИФ обеспечивает чувствительность на уровне одиночной молекулы [58–60], существующая система ЛИФ-детектирования чип-анализаторов имеет размеры и стоимость, значительно превышающие размеры и стоимость других элементов МФЧА, тем самым уменьшая выгоды миниатюризации.

В то же время электрохимические методы детектирования [61] представляют эффективную альтернативу ЛИФ-детектированию, предлагая и высокую чувствительность [62–64] и совместимость с микроизготовлением [65–69]. Следовательно, как неотложная встает задача разработки МФЧА с интегрированным амперометрическим детектором (АМД), позволяющим, эксплуатируя выгоды миниатюризации, создать полностью интегрированное равноразмерное (по сепаратору, реактору и детектору) устройство микроанализа. Этот МФЧА можно было бы назвать "абсолютный чип-анализатор".

Как следует из работ [70, 71], особенности конструкции МФЧА с интегрированным электрохимическим детектором заключаются в электрической развязке АМД и высоковольтного поля электрофореза, а также в устранении электролиза в сепарационном канале. С этой целью получались плазменным распылением Pt электроды (толщиной 2600 Å с 200 Å Ti адгезионным слоем) и Ag/AgCl электрод сравнения, который формировался путем оксидирования Ag проволоки диаметром 250 мкм в 1 М Cl-буфере и помещался в 1 М Cl-буфер. Рабочий электрод поддерживался при потенциале +800 мВ относительно Ag/AgCl электрода сравнения, причем Ag/AgCl электрод сравнения помещался в смотровое отверстие чипа возможно ближе к рабочему электроду. В описанном в [70, 71] АМД электроды наносились на травленную стеклянную пластинку или на травленную через просверленные смотровые отверстия. Для того чтобы минимизировать влияние электрического сепарационного поля на электрохимическое детектирование, сепарационный канал непосредственно перед рабочим электродом расширялся с 50 мкм до 1000 мкм. Уменьшение при этом электрического сопротивления канала резко снижало напряженность электрического поля в области электрохимического детектирования. Последнее "развязывает" детектор и высоковольтное поле

электрофореза, устраняет проблему электролиза в сепарационном канале. Технология фотолитографического микроизготовления электродов особенно выгодна для этой конструкции чипа, т. к. допускает простое и точное размещение рабочего электрода в выходном канале вне конца сепарационного канала.

Описанные в работе [70] примеры электрофоретического разделения нейромедиаторов и ДНК проводились в немодифицированных каналах, чтобы способствовать электроосмотическому потоку. В работе [70] для измерения тока детектора использовался коммерческий амперометрический детектор Bioanalytical Systems, LC4C, West Lafayette, IN. При этом выходной сигнал детектора фильтровался для удаления высокочастотного шума [70]. Как описано в работе [70], расстояние между рабочим электродом и электродом сравнения оказывало реальный эффект на характеристики интегрированного электрохимического детектора. Так, увеличение интервала между электродами рабочим и сравнения с 300 до 600 мкм увеличивало интерференцию электрических полей. Учитывая эти результаты, в экспериментах, описанных в работе [70], использовался чип с 300 мкм интервалом между рабочим и электродом сравнения при сепарационном потенциале $V_s = 800$ В. Концентрационный лимит детектирования этого АМД (при отношении сигнал / шум = 2) составлял 3.7 мкМ для *dopamine*, 6.5 мкМ для *epinephrine* и 12 мкМ для *catechol* [70]. Поскольку ввод пробы и разделение проводились (для противодействия диффузионному расширению электрофоретической зоны) с управлением потенциалами всех резервуаров, объем ввода пробы определялся объемом пересечения каналов (18 пл). Базирующийся на этой оценке лимит *on-column* детектирования *dopamine* составил 66 атмол, т. е. находился в пределах ожидаемого диапазона амперометрического детектирования в капиллярном зонном электрофорезе [61]. Большой диапазон линейности разработанного АМД позволял построить электрическую схему МФЧА путем последовательного электрического соединения сепарационного канала и АМД. Это не мешало точно измерять ток, несмотря на тысячекратное превышение сепарационного потенциала над потенциалом детектора, и обеспечивало прецизионные измерения тока.

Как указывается в [70], применяемость МФЧА расширяется, если использовать электрохимически активные метки для тестирования биомолекул. Как первый шаг в этом направлении разработан метод разделения ДНК с использованием разделительной матрицы, содержащей 0.75 % *hydroxyethylcellulose*, 40 мМ Трис ацетата, 1 мМ EDTA, 1 мМ Cl, pH 8.3 и 1 мкМ $Fe(phen)_3^{2+}$, где *phen* = *1,10-phenanthroline* [72] для непрямого электрохимического детектирования [73, 74]. Постоянный фоно-

вый ток свободного $Fe(phen)_3^{2+}$ [72] в сепарационном буфере изменяется, когда комплексы ДНК— $Fe(phen)_3^{2+}$ перемещаются через область детектирования: таким образом, проход комплекса ДНК— $Fe(phen)_3^{2+}$ через область детектирования проявляется как отрицательный пик на фоновом сигнале.

Это подтвердилось при разделении смеси рестрикционных фрагментов $\Phi X174 HaeIII$ в МФЧА с интегрированным АМД. Система обладает чувствительностью и разрешением, достаточными для разделения по размерам ПЦР-продуктов. Образование "хвоста" у малого пика, наблюдаемое в этих разделениях, характерно для непрямого детектирования. При вводе фрагментов $\Phi X174 HaeIII$ с концентрацией 50 нг/мкл в электрофоретическом буфере (при отсутствии накопления) получался сигнал 190 пА для полосы 603-bp. Инъектируемый объем 125 пл, рассчитанный из предварительно оцененной длины ввода пробы 330 мкм, содержал 700 фг (1.8 amol) фрагмента 603-bp. Следовательно, предел детектирования (при отношении сигнал / шум = 2) составлял 28 zmol (17 000 молекул) для этого фрагмента. Таким образом, достигается [70] микрочип-электрофоретическое разделение нейротрансмиттеров за 100 с с хорошим разрешением и amol чувствительностью и обеспечивается zmol чувствительность анализа рестрикционных фрагментов ДНК и ПЦР копий при непрямом амперометрическом детектировании.

Эти результаты показывают, что МФЧА с интегрированным АМД может использоваться для биохимических исследований с чувствительностью, конкурирующей с традиционными флуоресцентными методами детектирования [65, 75, 76].

Развит и запатентован метод избирательного маркирования аналитов для одновременного электрохимического детектирования многократных меток — конъюгатов аналита после электрофоретического или хроматографического разделения. Метод может использоваться в секвенировании и генотипировании ДНК. Для реализации метода сепарационные каналы 33 мкм ширины и 14 мкм глубины и резервуары травились на стеклянной подложке. Pt слой был сформирован на подложке с помощью RF распыления. Необходимая конфигурация электродов получалась с помощью фотолитографии. На расстоянии 20 мкм от выхода сепарационного канала были сформированы четыре 10 мкм ширины рабочие электроды, разделенные промежутком 5 мкм, которые представляли заземленный электрод, вспомогательный электрод и электрод сравнения. Электрохимически активная метка вводилась в ДНК M13 путем использования меченого 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid праймера. С использованием этого праймера продемонстрировано одновременное детектирование двух аналитов (*dopamine* и *catechol*) [77, 78].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. РАЗВИТИЕ ЧИП-АНАЛИЗАТОРОВ

Согласно проведенному анализу, для перехода от лабораторных приборов высокоэффективного капиллярного электрофореза к карманным "абсолютным" чип-анализаторам оказалось необходимым следующее.

— Во-первых, перейти от формата ВЭКЭ (с забором проб и электролита передавливанием воздухом из микрососудов) к формату МФЧА, реализуемому в виде крестообразной капиллярной схемы для ввода и сепарации проб (к чип-анализатору с интегрированным детектором и потенциостатом);

— Во-вторых, выйти в изготовлении чипов из заимствованной из микроэлектроники стекляннокремниевой технологии (микролитография—травление—спекание) в эластомерную (ПДМС) технологию, используя для получения оригиналов (моделей) "быстрое макетирование", изготовление ПДМС-реплик путем полимеризации (отливки) на этих моделях, адгезионную сборку чипов и как результат — получение относительно дешевых ПДМС сборно-разборных чипов с регулируемой адгезией, эластичностью и ЛИФ-детектированием.

— В-третьих, выйти из ПДМС-технологии в другие (не ПДМС) эластомерные технологии (иными словами, выйти из патентно-защищенного поля ПДМС чип-анализаторов). Здесь кандидатами новых эластомерных материалов могут быть полиуретановые каучуки, фторкаучуки, фотоотверждаемые эластомеры, сополимеры этилена с винилацетатом (которые во многом превосходят по свойствам ПДМС).

— В-четвертых, заменить дорогой ЛИФ-детектор на дешевый высокочувствительный малогабаритный амперометрический детектор (АМД), создать высокочувствительный микросхемный АМД (заменив им дорогостоящий лабораторный АМД) и высоковольтный потенциостат с оптронными высоковольтными ключами.

— В-пятых, разработать оптимизированные технологии изготовления "абсолютных" чип-анализаторов, предложить как путь коммерциализации продажу чипов для разработки и изготовления "абсолютных" чип-анализаторов, разработать их современный дизайн.

— В-шестых, установить в "абсолютный" чип-анализатор систему микроэлектрохроматографии на основе монолитных, конвективно-контролируемых сорбентов (сорбционных дорожек).

— В-седьмых, уменьшить размер чипов; создать эффективную систему заполнения каналов чип-анализатора реагентами, буферным раствором и пробой; повысить универсальность и чувствительность амперометрического детектирования

(белков, анионов и катионов в воде); увеличить напряжение и стабильность потенциостата; разработать теоретические и методические основы применения "абсолютных" чип-анализаторов в экологическом и биомедицинском мониторинге, медицинской экспресс-диагностике, генетическом анализе; внедрить разработанные приборы и методы в лабораторную практику и научные исследования. В качестве первоочередных создать чип-анализаторы для определения катехоламинов, иммуноанализа, биохимической диагностики инфаркта миокарда, генотипирования, определения анионов и катионов в питьевой воде

В результате — создается "абсолютный" чип-анализатор на основе эластомерной канализированной пластинки, стеклянной подложки с интегрированными микросхемными АМД, адгезионной сборки чипа. В этом приборе реализуются такие преимущества МФЧА, как высокая скорость, сверхпроизводительность, быстрота разработки и изготовления, низкая цена анализа. В меньшей степени существенны габариты прибора. Лабораторные приборы МФЧА не нуждаются в периферии (оптике, электронике) в формате микрочипа. Другое дело: МФЧА-сенсоры — карманные (в перспективе одноразовые) приборы для медицинской диагностики, экологического мониторинга, военного назначения. Здесь не обойтись без миниатюризации периферии МФЧА. Развитие миниатюрной периферии, безусловно, удешевит и приборы МФЧА лабораторного анализа, аналогично тому как развитие микроэлектроники резко повысило качество, уменьшило габариты, снизило цену полноразмерных электронных приборов.

ПРИЛОЖЕНИЕ. Коммерциализация МФЧА

Многие зарубежные компании проявляют большой интерес к развитию и коммерциализации МФЧА. На 1999 г. инвестиции в разработку МФЧА превышают \$200 млн. Мировой рынок микрофлюидных аналитических систем в ближайшем будущем определяется в \$1 млрд в год. Перечислим зарубежные компании, разрабатывающие МФЧА.

- 1) Британский консорциум "lab-on-a-chip" (Wellcomt, Kodak и Unilever) [3].
- 2) Caliper Technologies (Mountain View, CA, USA) [79].
- 3) Nanogen, Inc. (San Diego, CA, USA) [80].
- 4) Cerpheid (Sunnyvale, CA, USA) [81].
- 5) Aclara BioSciences Inc. (Hayward, CA, USA) [82].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. X J. Cooper McDonald, David C. Dufty, Janelle

- R. Anderson et al. // Electrophoresis. 2000. N 21. P. 27–40.
2. Tortora G.J., Grabowski S.R. Principles of Anatomy and Physiology. N.Y.: Harper Collins, 1996.
3. Manz A., Harrison D.J., Verpoorte E., Widmer H.M. // Adv. Chromatogr. 1993. N 33. P. 1–65.
4. Terry S.C., Jerman J.H., Angell J.B. // IEEE Trans. Electron. Devices. 1979. N 26. P. 1880–1886.
5. Sella K., Harrison D.J., Manz A. // Anal. Chem. 1993. N 65. P. 1481–1488.
6. Manz A., Graber N., Widmer H.M. // Sens. Actuator B. 1990. N 1. P. 244–248.
7. Manz A., Bocker H. // International Conference on Solid State Sensors and Actuators, Chicago, II, (June 1997). P 915–918.
8. Kopp M.U., Mello A.Jd., Manz A. // Science. 1998. V. 280. P. 1046–1048.
9. Fluri K., Fitzpatrick G., Chlem N., Harrison D.J. // Anal. Chem. 1996. V. 68. P. 4285–4290.
10. Salimi-Moosavi H., Tang T., Harrison D.J. // J. Am. Chem. Soc. 1997. V. 119. P. 8716–8717.
11. Harrison Sd.J., Fluri K., Sella K., Fan Z., Effenhauer C. S., Manz A. // Science. 1993. V. 261. P. 895–897.
12. Liang Z., Chiem N., Ocvirk G., Tang T., Fluri K., Harrison D.J. // Anal. Chem. 1996. V. 68. P. 1040–1046.
13. Chiem N., Harrison D.J. // Anal. Chem. 1997. V. 69. P. 373–378.
14. Li P.C.H., Harrison D.J. // Anal. Chem. 1997. V. 69. P. 1564–1568.
15. Khandurina J., Jacobson S.C., Waters L.C., Foote R.S., Ramsey J.M. // Anal. Chem. 1999. V. 71. P. 1815–1819.
16. Watwrs L.S., Jacobson S.C., Kroutchinina N., Khandurina N., Khandurina J., Foote R.S., Ramsey J.M. // Anal. Chem. 1998. V. 70. P. 5172–5176.
17. Kutter J.P., Jacobson S.C., Matsubara N., Ramsey J.M. // Anal. Chem. 1998. V. 70. P. 3291–3297.
18. Jacobson S.C., Culbertson C.T., Daler J.E., Ramsey J.M. // Anal. Chem. 1998. V. 70. P. 3476–3480.
19. Ermacov S.V., Jacobson S.C., Ramsey J.M. // Anal. Chem. 1998. V. 70. P. 4404–4504.
20. Hadd A.J., Raymond D.E., Halliweli J.W., Jacobson S.C., Ramsey J.M. // Anal. Chem. 1997. V. 69. P. 3407–3412.
21. Simson P.C., Roach D., Wooley A.T., Thorsen T., Johnston R., Sensabaugh G.F., Mathies R.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. P. 2256–2261.
22. Wooley A.T., Mathies R.A. // Anal. Chem. 1995. V. 67. P. 3676–3680.
23. Wooley A.T., Leo K., Glazer A.N., Mathies R.A. //

- Anal. Chem. 1998. V. 70. P. 684–688.
24. Liu S., Shi Y., Ja W.E.W., Mathies R.A. // Anal. Chem. 1999. V. 71. P. 566–573.
 25. Burns M.A., Mastrangelo C.H., Sammarco T.S. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. V. 93. P. 5556–5561.
 26. Van den Berg A. // Micro Total Analysis Systems / Ed. Bergveld P. Boston: Kluwer, 1995.
 27. Colyer C.L., Tang T., Chiem N., Harrison D.J. // Electroforesis. 1997. N 18. P. 1733–1741.
 28. Effenhauser C.S., Bruin G.J.M., Paulus A. // Electroforesis. 1997. N 18. P. 2203–2213.
 29. Freernantle M. // Chem. Eng. News. 1999. V. 77. P. 27–36.
 30. Burns M.A., Johnson B.N., Brahmassandra S.N. et al. // Science. 1996. V. 282. P. 484–487.
 31. Yao S., Anex D.S., Caldwell W.B. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. V. 96. P. 5372–5377.
 32. Weigl B.H., Yager P. // Science. 1999. V. 283. P. 345–347.
 33. Kricha L.J. // Clin. Chem. 1998. V. 44. P. 2008–2014.
 34. Sanlani J.T., Cima M.J., Langer R. // Nature. 1999. V. 397. P. 335–338.
 35. Ramsey J.M., Jacobson S.C., Knapp M.R. // Nature Med. 1995. N 1. P. 1093–1096.
 36. Ogura M., Agata Y., Watanabe K. et al. // Clin. Chem. 1998. V. 44. P. 2249–2255.
 37. Rohlcek V., Deyl Z., Mikslk I. // J. Chromatogr. A. 1994. V. 662. P. 369–373.
 38. Bayer H., Engelhardt H. // J. Microcol. Sep. 1996. N 8. P. 479–484.
 39. Schutznar W., Kenndler E. // Anal. Chem. 1992. V. 64. P. 1991–1995.
 40. Roberts M.A., Rossier J.S., Bercier P., Glraut H. // Anal. Chem. 1997. V. 69. P. 2035–2042.
 41. McCormick R.M., Neltson R.J., Alonac-Amigo M.G., Benguru D.J., Hooper H.H. // Anal. Chem. 1997. V. 69. P. 2626–2630.
 42. Martynova L., Lacascio L.E., Giatan M. et al. // Anal. Chem. 1997. V. 69. P. 4783–4789.
 43. Ford S.M., Davlos J., Kar B. et al. // J. Biochem Eng. 1999. V. 121. P. 13–21.
 44. Dutty D.C., McDonald J.C., Schueller O.J.A., Whitesides G.M. // Anal. Chem. 1998. V. 70. P. 4974–4984.
 45. Qin D., Xia Y., Whitesides G.M. // Adv. Mater. 1996. N 8. P. 917–919.
 46. Shaw J.M., Gelorme J.D., LaBlanca N.C., Conley W.N., Homes S.J. // IBM J. Res. Develop. 1997. V. 41. P. 81–94.
 47. Xia Y., Whitesides G.M. // Angew Chem. Int. 1998. V. 37. P. 550–575.
 48. Gin D., Xia Y., Rogers J.A., Jackman R.J., Zhao X., Whitesides G.M. // Top Curr. Chem. 1998. V. 194. P. 1–20.
 49. Chaundhury M.K., Whitesides G.M. // Langmuir. 1991. N 7. P. 1013–1025.
 50. Chaundhury M.K., Whitesides G.M. // Science. 1991. V. 255. P. 1230–1232.
 51. Morra M., Occhiello E., Marola R., Garbassi F., Humphrey P., Johnson D. // J. Colloid Interface Sci. 1990. V. 137. P. 11–24.
 52. Kovacs G.T.A. Micromachined Transducers Sourcebook. N.Y.: McGraw-Hill, 1996.
 53. Carbeck J.D., Colton I.J., Gao J., Chapman R.G., Isseecs L., Whitesides G.M. // Acc. Chem. Res. 1996. V. 31. P. 343.
 54. Colton I.J., Anderson J.R., Gao J., Chapman R.S., Isseecs L., Whitesides G.M. // J. Amer. Chem. Soc. 1997. V. 119. P. 12701–12709.
 55. Mammon M., Gomez F., Whitesides G.M. // Anal. Chem. 1995. V. 67. P. 3526–3535.
 56. Woolley A.T., Hadley D., Landre P. // Anal. Chem. 1996. V. 68. P. 4081–4086.
 57. Li P.C., Harrison D.J. // Anal. Chem. 1997. V. 69. P. 1564–1568.
 58. Nie S., Chiu D.T., Zare R.N. // Science. 1994. V. 266. P. 1018–1021.
 59. Castro A., Shera E.B. // Anal. Chem. 1995. V. 67. P. 3181–3186.
 60. Haab B.B., Mathies R.A. // Anal. Chem. 1995. V. 67. P. 3253–3260.
 61. Ewing A.G., Mesaros J.M., Gavin P.F. // Anal. Chem. 1994. V. 66. P. 527A–537A.
 62. Fan F.-R.F., Bard A.J. // Science. 1995. V. 267. P. 871–874.
 63. Collinson M.M., Wighiman R.M. // Science. 1995. V. 268. P. 1883–1885.
 64. Fan F.-R.F., Bard A.J. // Science. 1997. V. 277. P. 1791–1793.
 65. Slater J.M., Watt E.J. // Analyst. 1994. P. 2303–2307.
 66. Gavin P.F., Ewing A.G. // Air. Chem. Sue. 1996. V. 118. P. 8932–8936.
 67. Bratten C.D.T., Cobbold P.H., Cooper J.M. // Anal. Chem. 1997. V. 69. P. 253–258.
 68. Clark R.A., Hietpas P.B., Ewing A.G. // Anal. Chem. 1997. V. 69. P. 259–263.
 69. Gavin P.F., Ewing A.G. // Anal. Chem. 1997. V. 69. P. 3838–3845.
 70. Woolley A.T., Lao K., Glazer A.N., Mathies R.A. // Anal. Chem. 1998. V. 70. P. 684–688.
 71. Mathies R.A., Glazer A.N., Wooley A.T., Lao K. Electrochemical detector integrated on microfabricated capillary electrophoresis chips // Chemical Abstracts. 2000. V. 132, N 19. P. 243–248.
 72. Carter M.T., Rodriguez M., Bard A. // J. Am. Chem. Soc. 1989. V. 111. P. 8901–8911.
 73. Foret F., Fana H.S., Ossidni L., Bocek P. // Chromatogr. 1989. V. 470. P. 299–308.
 74. Olefirowicz T.M., Ewing A.G. // J. Chromatogr. 1990. V. 499. P. 713–719.
 75. Jacobson S.C., Hergenroder R., Koutny L.B., Warmack R.J., Ramsey J.M. // Anal. Chem. 1994. V. 66. P. 1107–1113.

76. Liang Z., Chiem N., Ocvirk G., Tang T., Fluri K., Harrison D. // *Anal. Chem.* 1996. V. 68. P. 1040–1046.
77. Romanek C.S., Clemett S.J., Chillier D.F., Maechling C.R., Zare R.N. // *Science.* 1996. V. 273. P. 924–930.
78. Singhal P., Xie J., Glazer A.N. Microfabricated capillary electrophoresis chip and method for simultaneously detecting multiple redox labels // *Chemical Abstracts.* 2000. V. 133, N 8. P. 432a.
79. <http://www.calipertech.com>
80. <http://www.nanogen.com>
81. <http://www.cerphid.com>
82. <http://www.aclara.com>
- Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург*
- Материал поступил в редакцию 12.08.2002.

HIGH-PERFORMANCE CAPILLARY ELECTROPHORESIS AND MICROFLUIDIC CHIP-ANALYZERS. II. MICROFLUIDIC CHIP-ANALYZERS

B. G. Belenkii

Institute for Analytical Instrumentation RAS, Saint-Petersburg

The paper is devoted to a new direction in analytical instrumentation — microfluidic on-chip analyzers (MFCA). The advantages of this class of devices over large laboratory systems are described. Technical and production technology problems and the ways of their solution in the course of microchip design and fabrication are considered. The prospects for MFCA development and application are outlined.