

УДК 532.5.013+ 543.456+ 681.2

© И. В. Кухтевич, А. С. Букатин, И. С. Мухин, А. А. Евстрапов

## МИКРОФЛЮИДНЫЕ ЧИПЫ С ИНТЕГРИРОВАННЫМИ НАНОРАЗМЕРНЫМИ СТРУКТУРАМИ ДЛЯ ФИКСАЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

Разработаны и исследованы конструкции гидродинамических ловушек для фиксации частиц в микрофлюидном чипе с сетью параллельных наноразмерных каналов и U-образная ловушка с наноразмерными каналами. Проведено моделирование процесса массопереноса жидкости в ловушке. Методом сфокусированного ионного пучка изготовлены наноразмерные структуры для ловушек. Получены прототипы микрофлюидных чипов с ловушками для микроскопии высокого разрешения. Проведены экспериментальные исследования по изучению движения потоков жидкости и частиц в каналах микрочипов.

*Кл. сл.:* микрофлюидный чип, наноразмерная структура, метод сфокусированного ионного пучка, микроскопия высокого разрешения

### ВВЕДЕНИЕ

Развитие аналитических систем на основе микрочиповых технологий, более известных за рубежом как систем "lab-on-a-chip" и "Micro Total Analysis System", позволяющих реализовать все стадии биохимического анализа на одном микроустройстве [1, 2], вызвало волну исследований в микрогидродинамике (микрофлюидике), а затем в относительно новой области — нанофлюидике [3]. В настоящее время для создания аналитических систем и приборов на микрочиповой платформе используются новейшие технологии и разработки [4]. Одной из тенденций развития систем "lab-on-a-chip" является применение функциональных наноразмерных структур. Методами нанотехнологий можно изготавливать воспроизводимые наноструктуры [5–7], с помощью которых удастся не только проводить исследования в микро- и нанофлюидике, но и создавать приборы и устройства с принципиально новыми свойствами и характеристиками. Наноразмерные элементы (например, наноканалы и нанопоры) позволяют обеспечить эффективное разделение молекул и ионов, осуществлять манипуляции с отдельными биологическими молекулами, клетками, бактериями и вирусами [8–10].

В данной работе приведены результаты исследований, направленные на создание микрофлюидных чипов (МФЧ) для изучения биологических объектов (клеток, бактерий) в естественно-активном состоянии методами микроскопии высокого разрешения: конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ), сканирующей ближнеполевой оптической микроскопии (СБОМ)

и атомно-силовой микроскопии (АСМ). Получение высокого пространственного разрешения изучаемого объекта связано с необходимостью его фиксации в области измерений на определенное время. Это может быть обеспечено физическими методами с применением электрических, магнитных, электромагнитных и др. полей [11–13] или с использованием специальных механических и гидродинамических "ловушек" в канале МФЧ.

### ГИДРОДИНАМИЧЕСКИЕ ЛОВУШКИ В МИКРОФЛЮИДНЫХ ЧИПАХ

Основной идеей таких ловушек является стабильная фиксация или удержание частицы в заданной области МФЧ за счет гидродинамического потока обтекающей жидкости. Здесь необходимо решить следующие задачи: обеспечить ламинарный поток жидкости, прижимающий частицу к какому-либо жесткому препятствию и минимизировать или устранить возможность движения частицы вне области удерживания. Фиксацию микрочастиц в каналах МФЧ можно осуществлять при протекании жидкости через каналы, ширина которых меньше характерных размеров исследуемых частиц. Течение жидкости в такой системе может быть вызвано капиллярными эффектами или за счет внешнего давления (разряжения) в канале.

В планарном канале профиль скорости потока имеет параболический вид, однако при интеграции в канал микро- и наноразмерных структур существует возможность локально менять этот профиль для достижения заданных характеристик потока. В рамках гипотезы сплошной среды при низких

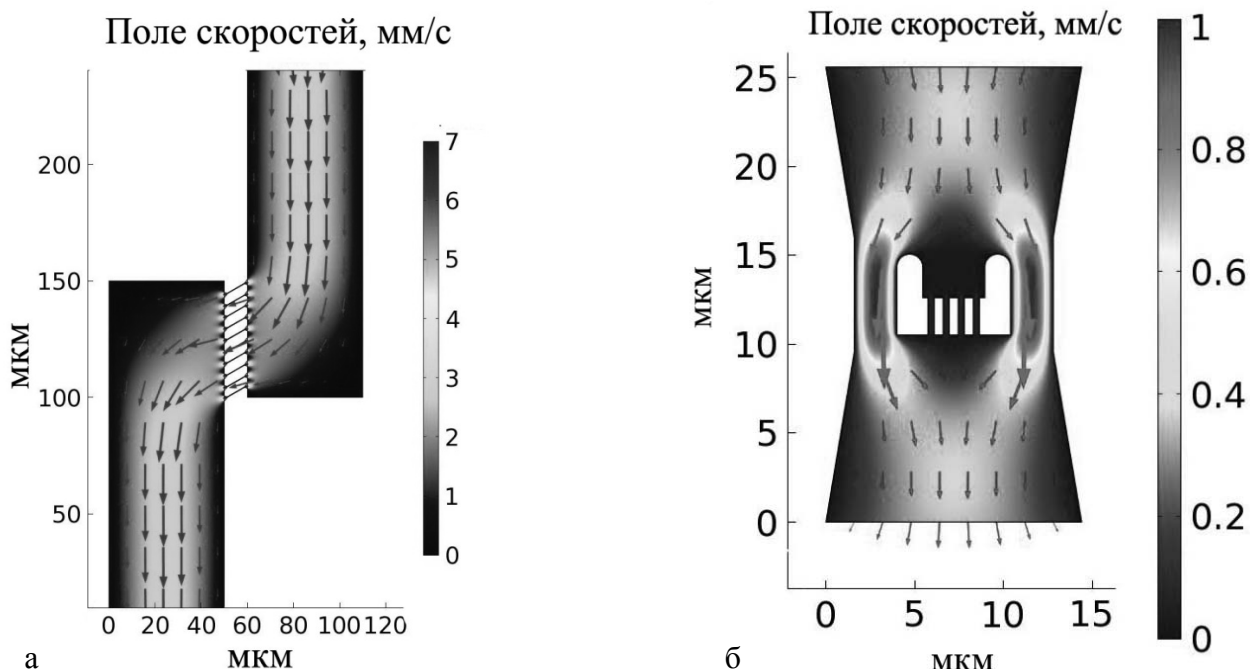
числах Рейнольдса ( $Re < 1$ ) профиль скорости потока жидкости может быть определен при решении уравнений Навье—Стокса методом конечных разностей. Для решения подобных задач можно воспользоваться известными пакетами прикладных программ, например COMSOL Multiphysics, Flow Vision, Ansys, Fluent, Flow-3D.

Конструкцией ловушки для одновременного захвата нескольких микрочастиц является сеть наноразмерных каналов с заходами. Заходы, представляющие собой область каналов в виде трапеции, обеспечивают надежную фиксацию отдельных микрочастиц, а через каналы осуществляется ток жидкости. Для обеспечения протекания необходимого объема жидкости следует обеспечить высокое аспектное соотношение в наноразмерных каналах, т. е. чтобы глубина канала была существенно больше ширины. Результаты численного расчета поля скоростей жидкости через параллельные наноразмерные каналы с заходами представлены на рис. 1, а. Для количественного описания характеристик микрофлюидной системы вводится понятие гидродинамического сопротивления, входящего в соотношение Хагена—Пуазейля (Hagen—Poiseuille) [14]

$$\Delta p = R_{hyd} Q,$$

где  $\Delta p$  — разность давлений в канале МФЧ,  $R_{hyd}$  — гидродинамическое сопротивление канала,  $Q$  — объем жидкости, протекающей через поперечное сечение канала в единицу времени.

Для МФЧ с сетью наноразмерных каналов с заходами  $R_{hyd} = 1.1 \cdot 10^{17}$  Па·с/м<sup>3</sup>; таким образом, для обеспечения потока жидкости 1 нл/с требуется приложить давление  $\sim 10^5$  Па, при этом максимальная скорость жидкости в канале составит 62 мм/с при числе Рейнольдса  $Re = 5.7 \cdot 10^{-3}$ . Максимальная разность давлений, которую можно получить за счет капиллярных сил в канале с поперечным сечением  $10 \times 50$  мкм, составляет  $10^4$  Па. Таким образом, создание стабильного потока жидкости в МФЧ с такой гидродинамической ловушкой возможно только за счет приложения разности давлений с помощью внешнего насоса. Использование насосов требует создания переходных интерфейсов, обеспечивающих их герметичное соединение с каналами МФЧ. Эти интерфейсы существенно усложняют конструкцию микрофлюидной системы, а кроме того, внешняя разность давлений в канале МФЧ не позволяет обеспечить свободный доступ зонда сканирующего зондового микроскопа для исследования захваченных объектов с высоким пространственным разрешением.



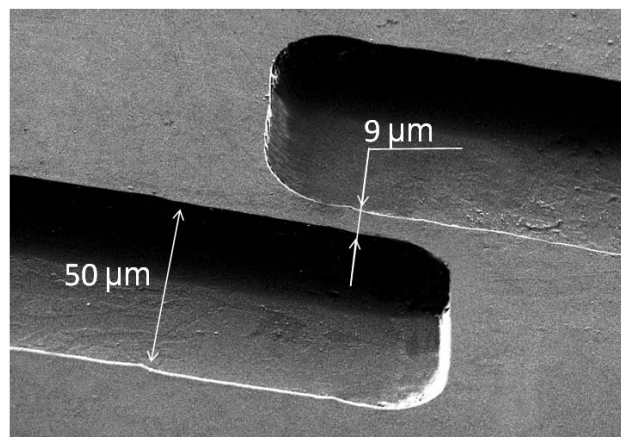
**Рис. 1.** Профили поля скоростей в различных конструкциях гидродинамических ловушек с каналами. а — сеть из 10 параллельных наноразмерных каналов с заходами (ширина каналов 250 нм, глубина 2 мкм, длина 8.5 мкм); б — U-образная ловушка (ширина микроканалов 2.4 мкм, ширина наноразмерных каналов 350 нм, размеры ловушки  $3.5 \times 2.45$  мкм). Расчет проведен при расходе жидкости 1 нл/с

Для решения проблемы снижения гидродинамического сопротивления была предложена другая конструкция гидродинамической ловушки в канале МФЧ в виде U-образной ячейки с наноразмерными каналами и двумя микроканалами по краям от нее, ширина которых превышает характерный размер объекта исследования. Микроканалы обеспечивают снижение сопротивления системы, но в тоже время благодаря особой конструкции ловушки вероятность захвата частицы близка к единице. Идея ловушки заключается в том, что микрочастицы, увлекаемые током жидкости, имеющей параболический профиль скорости, движутся вблизи центра канала и за счет своей инерционности попадают в ловушку, в то время как жидкость плавно ее огибает и продолжает двигаться по боковым микроканалам. Результаты численного расчета поля скоростей жидкости в такой ловушке представлены на рис. 1, б. Ловушка имеет гидродинамическое сопротивление  $R_{hyd} = 3 \cdot 10^{13}$  Па·с/м<sup>3</sup>, что почти на четыре порядка меньше гидродинамического сопротивления простой сети параллельных наноразмерных каналов, поэтому для обеспечения потока жидкости в 1 нл/с требуется разность давлений всего в 320 Па, которую можно обеспечить за счет капиллярных сил. Максимальная скорость жидкости при этом составляет 31 мм/с, а число  $Re = 2 \cdot 10^{-3}$ . Важным преимуществом этой ловушки с пониженным сопротивлением является способность захватывать необходимое число микрочастиц, т. к. лишние частицы будут вымываться с током жидкости в боковые микроканалы.

### МИКРОФЛЮИДНЫЕ ЧИПЫ С НАНОРАЗМЕРНЫМИ СТРУКТУРАМИ

В результате моделирования были сформулированы требования к элементам топологии МФЧ. Методом сфокусированного ионного пучка [15] на электронно-ионном микроскопе CrossBeam Neon 40 (Carl Zeiss, Германия) были изготовлены соответствующие микро- и наноразмерные структуры между двумя параллельными микроканалами (шириной 50 мкм и глубиной 10 мкм) исходной заготовки чипа (рис. 2). Исходные заготовки изготавливались из стекла марки К8 методом фотолитографии с последующим кислотным травлением. После этого на заготовки наносился тонкий слой золота или углерода (до 20 нм) на вакуумной установке SPI Module Sputter/Carbon Coater (Structure Probe, Inc. США).

Первоначально была изготовлена топология МФЧ с сетью параллельных наноразмерных каналов шириной от 0.2 до 0.5 мкм, с трапециевидными входами (размером от 0.5 до 2 мкм в зависимости от размеров удерживаемых объектов).



**Рис. 2.** СЭМ-изображение исходной заготовки чипа с микроканалами, изготовленной методом фотолитографии и последующим кислотным травлением. Изображение получено на микроскопе CrossBeam Neon 40

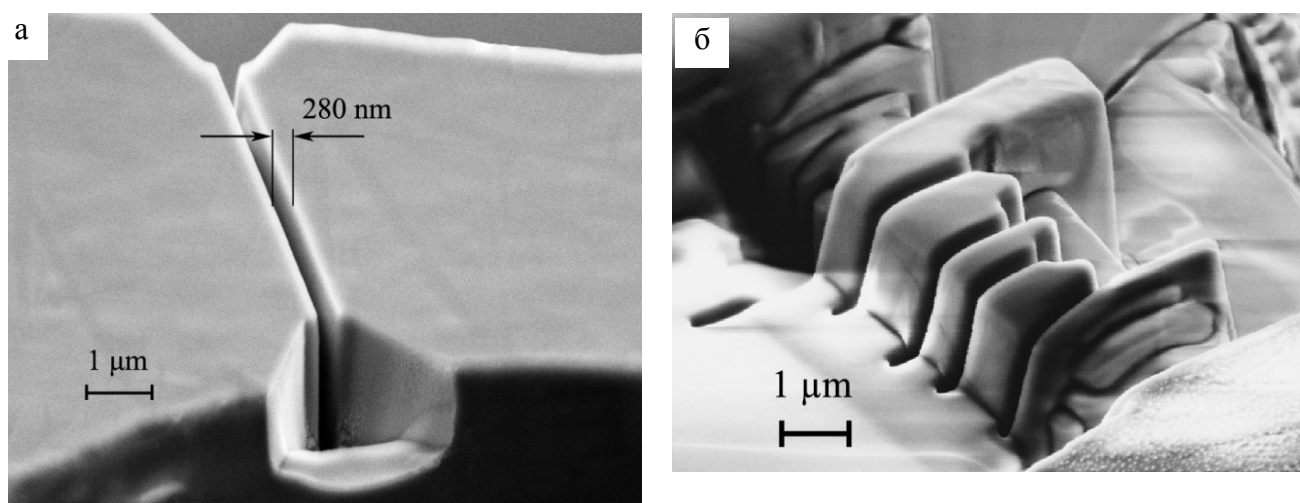
СЭМ-изображение такой топологии представлено на рис. 3, а. Подобная ловушка позволяет фиксировать отдельные биологические объекты с размерами от одного до нескольких микрон.

На рис. 3, б, приведено СЭМ-изображение МФЧ с U-образной ловушкой и дополнительными микроканалами по краям. Размер каналов U-образной ловушки варьировался от 0.2 до 0.5 мкм в зависимости от размеров фиксируемых объектов, в то время как размер боковых каналов составлял около 2.5 мкм. В этой конструкции МФЧ капиллярные силы обеспечивали поток жидкости, достаточный для эффективного удерживания частиц.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

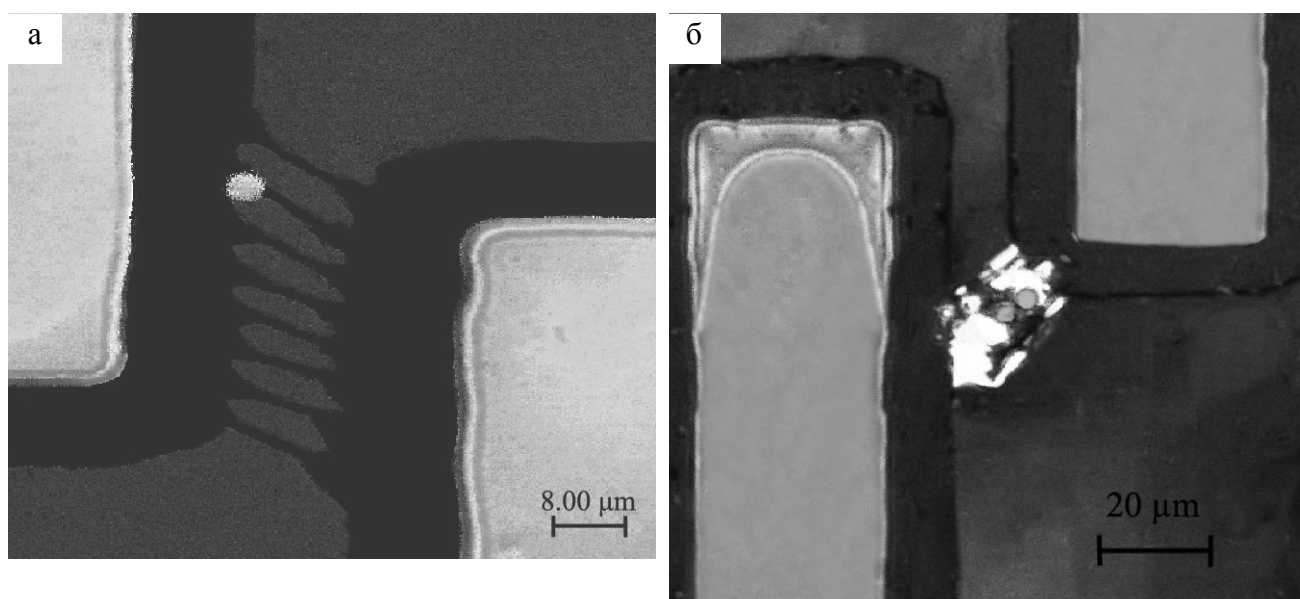
Для апробации созданных конструкций гидродинамических ловушек в МФЧ были проведены экспериментальные исследования по изучению движения потоков жидкости и частиц с флуоресцентной меткой. Полимерные частицы диаметром 3 и 6 мкм помещались в буферный раствор с рН 9.18 и вводились в МФЧ. Под действием капиллярных сил или внешнего давления буферный раствор распространялся в каналах. Движение частиц регистрировалось с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа Leica TCS SL (Leica, Германия).

На рис. 4, а, представлено изображение, полученное в ходе экспериментов по фиксации частиц диаметром 3 мкм в ловушке, выполненной в виде сети параллельных наноразмерных каналов. На рис. 4, б, приведено изображение результатов



**Рис. 3.** СЭМ-изображения, полученные на CrossBeam Neon 40.

а — один из параллельных наноразмерных каналов с заходами; б — U-образная ловушка с уменьшенным гидродинамическим сопротивлением



**Рис. 4.** Фиксация полимерных частиц, меченных флуоресцеином, в гидродинамических ловушках МФЧ.

а — ловушка с сетью параллельных каналов с заходами; б — МФЧ с U-образной ловушкой. Изображения получены на конфокальном сканирующем микроскопе Leica TCS SL

удерживания группы частиц размерами 3 мкм в U-образной ловушке. Изображения получены на Leica TCS SL в режиме измерения флуоресценции в диапазоне 500–530 нм при длине волны возбуждения 488 нм. Эти результаты подтверждают адекватность предложенного подхода для фиксации частиц в МФЧ.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе представлены результаты исследований, направленные на создание МФЧ для исследования биологических объектов методами микроскопии высокого разрешения (конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, сканирующая

ближнеполевая оптическая микроскопия, атомно-силовая микроскопия).

В ходе работы

1) Предложено две конструкции гидродинамической ловушки для фиксации частиц: сеть параллельных наноразмерных каналов с трапециевидными заходами, U-образная ловушка с наноразмерными каналами и микроканалами по бокам от нее. Проведено моделирование процесса массопереноса жидкости. В результате моделирования было выявлено, что при использовании топологии МФЧ с сетью параллельных наноразмерных каналов (рис. 1, а) для создания стабильного потока жидкости необходимо применение внешнего насоса. U-образная ловушка (рис. 1, б) имеет низкое гидродинамическое сопротивление  $R_{hyd} = 3 \cdot 10^{13}$  Па·с/м<sup>3</sup>, что позволяет обеспечить ток жидкости за счет капиллярных сил.

2) Из стекла марки К8 изготовлены МФЧ с параллельной сетью наноразмерных каналов и с U-образной ловушкой (рис. 2). Исходные заготовки МФЧ с микроканалами получены методом фотолитографии и травления, а ловушки для частиц изготовлены методом сфокусированного ионного пучка;

3) Проведены экспериментальные исследования по изучению движения потоков жидкости и частиц размерами 3 и 6 мкм с флуоресцентной меткой в созданных МФЧ. При этом наблюдалась успешная фиксация частиц в ловушках МФЧ, что подтверждается изображениями, полученными на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе Leica TCS SL (рис. 4).

Полученные при исследовании данные позволяют говорить об адекватности выбранного подхода для фиксации микрочастиц и являются основой для проведения дальнейших исследований по удерживанию биологических объектов в ловушках и их изучению методами высокоразрешающей микроскопии.

Работа проведена при поддержке АВЦП "Развитие научного потенциала высшей школы (2009–2011)" (РНП 2.1.2/9501), ФЦП "Научные и научно-педагогические кадры инновационной России" на 2009–2013 годы (ГК П557, ГК 14.740.11.1218), программа У.М.Н.И.К.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Glawdel T., Elbuken C., Lee L.E.J., Ren C.L. Microfluidic system with integrated electroosmotic pumps, concentration gradient generator and fish cell line (RTgill-W1) — towards water toxicity testing // Lab Chip. 2009. V. 9. P. 3243–3250.
2. Kinoshita H., Aoki K., Yanagisawa I., Fujii T. Miniaturization of integrated microfluidic systems // Proc. 14th International Conference on Miniaturized Systems

- for Chemistry and Life Sciences, 3–7 October 2010, Groningen, The Netherlands. P. 1397–1399.
3. Encyclopedia of Microfluidics and Nanofluidics / Ed. D. Li. NY.: Springer Science&Business Media, 2008. 2226 p.
4. Mark D., Haeberle S., Roth G., et al. // Chemical Society Reviews. 2010. V. 39, N 3. P. 1153–1182.
5. Park S.-G., Lee S.-K., Moon J.H., Yang S.-M. Holographic fabrication of three-dimensional nanostructures for microfluidic passive mixing // Lab Chip. 2009. V. 9. P. 3144–3150.
6. Jensen K.F. Synthesis of micro and nanostructures in microfluidic systems // Chemical Society reviews. 2010. V. 39, N 3. P. 1183–1202.
7. Qin D., Xia Y., Whitesides G.M. Soft lithography for micro- and nanoscale patterning // Nature protocols. 2010. V. 5, N 3. P. 491–502.
8. Siwy Z.S., Howorka S. Engineered voltage-responsive nanopores // Chem. Soc. Rev. 2010. V. 39. P. 1115–1132.
9. Yao S., Hertzog D.E., Zeng S., Mikkelsen J.C., Santiago J.G. Porous glass electroosmotic pumps: design and experiments // Journal of Colloid and Interface Science. 2003. V. 268. P. 143–153.
10. Movahed S., Li D. Electrokinetic transport through nanochannels // Electrophoresis. 2011. V. 32, N 11. P. 1259–1267.
11. Jones T.B. Electromechanics of particles. UK, Cambridge: Cambridge University Press, 1996. 285 p.
12. Voldman J. Electrical forces for microscale cell manipulation // Annu. Rev. Biomed. Eng. 2006. N 8. P. 425–454.
13. Кухтевич И.В., Букатин А.С., Евстапов А.А., Мухин И.С. Создание аналитической установки для биологических исследований на основе оптического микроскопа Axio Observer D1 и микрочиповых технологий. Ч. 1 // Научное приборостроение. 2010. Т. 20, № 3. С. 3–8.
14. Bruus H. Theoretical microfluidics. Oxford university press, 2008. 339 p.
15. Евстапов А.А., Мухин И.С., Кухтевич И.В., Букатин А.С. Применение ионной литографии для формирования наноразмерных каналов микрофлюидных чипов в стеклянных подложках // Научно-технический вестник СПбГУ ИТМО. 2010. № 4. С. 59–64.

**Санкт-Петербургский государственный университет информационных технологий, механики и оптики** (Кухтевич И.В., Мухин И.С., Евстапов А.А.)

**Институт аналитического приборостроения РАН, г. Санкт-Петербург** (Букатин А.С., Евстапов А.А.)

**Санкт-Петербургский академический университет — научно-образовательный центр нанотехнологий РАН** (Букатин А.С., Мухин И.С., Евстапов А.А.)

Контакты: *Кухтевич Игорь Владимирович*,  
ba@inbox.ru

Материал поступил в редакцию 28.06.2011.

## MICROFLUIDIC CHIPS WITH INTEGRATED NANOSCALE STRUCTURES FOR BIOLOGICAL OBJECTS FIXATION

**I. V. Kukhtevich<sup>1</sup>, A. S. Bukatin<sup>2,3</sup>, I. S. Mukhin<sup>1,3</sup>, A. A. Evstrapov<sup>1,2,3</sup>**

<sup>1</sup>*Saint-Petersburg State University of information technologies, mechanics and optics*

<sup>2</sup>*Institute for Analytical Instrumentation of RAS, Saint Petersburg*

<sup>3</sup>*Institution of the Russian Academy of Sciences Saint-Petersburg Academic University — nanotechnology research and education centre RAS*

Hydrodynamic trap to capture particles in a microfluidic chip with a network of parallel nanoscale channels and the U-trap with nanoscale channels were developed and studied. The simulation of liquid mass transfer process in the trap was performed. A nanoscale structures for traps was made by the method of focused ion beam. The prototype microfluidic chips with traps for high-resolution microscopy were obtained. Experimental studies on the movement of particles and liquid flows in channels of microchips confirm the adequacy of the proposed approach.

*Keywords:* microfluidic chip, nanoscale structure, focused ion beam, high resolution microscopy