

## Наноструктуры в микрофлюидных чипах

Институт аналитического приборостроения РАН

Евстрапов А.А., к.т.н., зав. лаб.

[an-evs@mail.ru](mailto:an-evs@mail.ru), [an-evs@yandex.ru](mailto:an-evs@yandex.ru)

Номер Комментари

слайда

- 2            Существующие в настоящее время микрочипы условно можно подразделить на следующие три класса – матричные (гибридизационные), микрофлюидные (капиллярные) и гибридные (сочетающие технологии и принципы матричных и микрофлюидных). Развитие нанотехнологий привело к появлению новых микрофлюидных чипов.  
В *матричных микрочипах* реализованы топологические принципы повторяющихся кодированных распознающих площадок микрометровых размеров. При нанесении пробы в случае наличия соответствующего аналита происходит специфическая реакция на микроплощадке, ведущая к изменению характеристик площадки. Эти изменения детектируются специальными приборами и устройствами.  
*Микрофлюидные чипы* состоят из системы связанных каналов, реакторов, сосудов, фильтров, дозаторов, датчиков и прочих функциональных элементов. На микрофлюидном чипе осуществляются все манипуляции с малыми количествами пробы и реагентов, включая разделение получаемого продукта на компоненты. На заключительных стадиях осуществляется детектирование компонентов пробы и, при необходимости, сбор компонентов.
- 3            Микрофлюидные чипы можно характеризовать размерами структур – каналов, реакторов или сосудов. Эти размеры составляют от нескольких микрометров до нескольких сотен микрометров, что значительно больше размеров многих биологических структур и молекул. Наноструктуры имеют хотя бы один характерный размер в интервале от 1 до 100 нм. А этому интервалу принадлежат размеры большинства биологических частиц. Таким образом, переход от микрофлюидики к микрофлюидике позволяет эффективно воздействовать на единичные биологические объекты. Но, с другой стороны микрофлюидики подразумевает и применение микрофлюидики – хотя бы потому, что необходимо использовать некие промежуточные структуры, например, гидравлические и пневматические интерфейсы при вводе пробы извне. Поэтому, скорее корректнее говорить о использовании наноструктур в микрофлюидике.
- 4            Приведенная на этом слайде шкала размеров показывает соотношение размеров исследуемых объектов (ионов, молекул, биологических структур, микрочастиц) с возможностями микросистемной техники, нанотехнологий, прецизионной механики. Приведены спектральные диапазоны электромагнитных колебаний. Здесь же отмечены и мешающие факторы, такие как дым и пыль.
- 5            Кроме того, что в микрофлюидике мы имеем дело со структурами нанометрового размера, следует выделить ряд других особенностей:
  - *Во-первых в наномасштабе жидкости имеют свойства, которые не могут быть рассмотрены в рамках модели сплошной среды,*
  - *Во-вторых, наблюдается доминирование эффектов, связанных с поверхностью (взаимодействие между поверхностью и молекулами более существенно, чем между молекулами и растворителем),*
  - *Существенно проявляются эффекты поверхностного натяжения,*
  - *Значительны явления, связанные с двойным электрическим слоем (особенно в наноканалах, нанопорах, мембранах и т.п.),*
  - *Проявляются размерно-зависимые явления, связанные с соотношением размеров молекул и наноструктур,*
  - *Наблюдаются явления, связанные с энтропией,*

И т.д..

- 6 Абсолютно четкой границы раздела микро- и нанофлюидики на сегодняшний день не существует. Некоторые авторы предлагают считать, что нанофлюидика начинается тогда, когда речь идет о регулярных наноструктурах. Наверное, подобный подход достаточно условен и вряд ли правилен. Более обоснованным является подход авторов [Paula J. Kemery, Jack K. Steehler, Paul W. Bohn //Langmuir. 1998. 14, 10. 2884], при котором полагается, что доминирование нанофлюидных эффектов ожидается, когда ионная сила, определенная как произведение  $k^*a < 1$  (доминирует электроосмотический поток), а при  $k^*a > 1$  – ожидается преимущественно ионная миграция.
- 7 *Можно кратко сформулировать ключевые позиции нанофлюидики: новые перспективные возможности молекулярного управления и новые нанофлюидные свойства.*  
*Современные технологии позволяют получить такие электро-механические структуры, как, например, приведенные на слайде, которые дают возможность воздействовать на изучаемый объект, в том числе и на отдельную биологическую частицу (вирус).*  
Рассмотрим некоторые наиболее перспективные применения наноструктур и наночастиц в микрофлюидных чипах.
- 8 **Наноструктуры** в микрофлюидике могут быть использованы при:
- Детектировании (квантовые «точки», квантовые «провода», в том числе для одномолекулярного детектирования),
  - Управлении движением молекул и частиц (микро- наноасосы, клапаны...),
  - Концентрировании и разделении частиц (нанопористые мембраны, микроколоники...),
  - Создании большой активной поверхности для смешивания пробы, проведения реакций, теплообмене и т.п.
- 9 **Наночастицы** в микрофлюидике могут быть использованы как:
- Специфические метки для детектирования (оптические, флуоресцентные, электрохимические и т.д.),
  - Транспортные частицы для переноса иммобилизованных объектов (магнитные наночастицы и подобные системы),
  - Среды для разделения и фильтрации пробы,
  - Элементы для воздействия на пробу (локальный нагрев пробы, ...)

- 10 Наиболее эффективными методами детектирования при использовании наноструктур являются:
- Оптическое (конфокальное флуоресцентное, двухфотонная корреляционная спектроскопия, спектроскопия ближнего поля)
  - Электрохимическое и прямое электрическое
  - Атомно-Силовая Микроскопия и Сканирующая Зондовая Микроскопия
  - На основе специфических свойств квантовых точек, наночастиц и т.п.
- 11 На слайде приведен пример устройства для флуоресцентного детектирования меченных энзимов в микрочипе с нанопорами. Используется стеклянный микрочип с металлической тонкопленочной маской, в которой изготовлены нанопоры. Световое излучение проникает через нанопоры только на небольшую глубину и на таком расстоянии может возбуждать флуоресценцию. Таким образом, реализуется возможность регистрации молекул в очень тонком слое (на малой глубине).
- 12 Другой способ высокочувствительного и высокоразрешающего детектирования – использование наночастиц с иммобилизованными реагентами, позволяющими осуществить специфическую реакцию с искомым объектом, а затем – методом атомно-силовой микроскопии (или сканирующей зондовой микроскопии) – обнаружить эту наночастицу, а, следовательно, и искомый объект.
- 13 Популярным и многообещающим становится использование квантовых точек для детектирования искомых объектов. Так Американская Военно-морская Научно-исследовательская лаборатория (The U.S. Naval Research Laboratory - NRL) развивает люминесцентные детекторы на основе полупроводниковых нанокристаллов или квантовых точек (QD). QD (CdSe или CdTe) имеют следующие привлекательные свойства для оптического обнаружения в видимой области спектра: возбуждение в широкой полосе и фотолюминесценцию с узкой полосой эмиссии (ширина в 0.5 максимума ~ 25-45 nm). При этом удается одновременно возбуждать несколько частиц. К тому же QD обладают исключительной фотохимической стабильностью и высоким квантовым выходом.
- Созданный в NRL наносенсор состоит из QDs, окруженных меченым белком. Аналит замещает окрашенный меченый комплекс, изменяя флуоресценцию наносенсора.
- В NRL разрабатывается новое поколение наносенсоров с целью получения высокоселективных и чувствительных детекторов патогенов и взрывчатых веществ.***
- 14 В устройстве, представленном на этом слайде, для детектирования молекул в нанопорах ионный ток через нанопору подавлен закрывающей нанотрубкой, соединенной с кателивером атомно-силового микроскопа. Такое устройство позволяет изучать взаимодействия *молекула-нанотрубка-нанопора* и изменение геометрических и поверхностных свойств нанопоры и нанотрубки.
- 15 Нанопоры успешно применяются и при электрохимическом детектировании. При невысоких концентрациях, транспорт молекул через нанопоры (нанопоры) может быть обнаружен методом электрохимического детектирования с разрешением на уровне отдельных частиц, что позволяет создать новые типы биосенсоров. На слайде приведен вариант планарного микрочипа. Основной проблемой при таком методе обнаружения является достаточно быстрое «забивание» нанопор – требуется предварительная очистка пробы и контроль за текущим состоянием нанопор.

- 16 Пример такого подхода реализован в микрофлюидном устройстве для анализа биологических проб (молекул ДНК) [D. Fologea, M. Gershow, B. Ledden, D. S. McNabb, J. A. Golovchenko, J. Li Detecting Single Stranded DNA with a Solid State Nanopore//Nanoletters. 2005. 5, 10. 1905-1909]. В ПДМС микрофлюидный чип встроена мембрана из нитрида кремния с отверстием диаметром около 4 нм. По обе стороны отверстия расположены резервуары и электроды, к которым приложено внешнее напряжение. Перемещение молекулы ДНК через это отверстие (нанопору) под действием электрического поля вызывает изменение тока в цепи. Длительность регистрируемого сигнала зависит от длины молекулы. Таким образом, измеряя параметры электрического сигнала можно получить информацию о размерах молекулы ДНК.
- 17 Устройства, в которых применяются нановискеры (нитевидные нанокристаллы) позволяют создавать новые ультрачувствительные электрические датчики для прямого обнаружения биологических и химических молекул (С. М. Lieber, 2004-2006). Механизм нановискерных датчиков основан на полевом эффекте, используемом в транзисторах. Полупроводник р-типа, на котором мобилизованы антитела (или иные рецепторы), связан с металлической поверхностью и электродами, через которые подается потенциал. В такой цепи измеряется изменение проводимости полупроводника, которая резко меняется при специфическом взаимодействии рецепторов с определяемым компонентом (антигеном, белком). То есть химические или биологические взаимодействия преобразуются непосредственно в электрические сигналы. Применение линейки таких электродов с различными рецепторами интегрированной в канал микрофлюидного чипа позволяет осуществлять комплексный анализ пробы. Такой метод предложен для обнаружения белков, вирусов и ДНК.
- 18 На слайде приведен пример применения металлических наночастиц для обнаружения молекул ДНК. В случае использования золота возможно как оптическое, так и электрохимическое детектирование.
- 19 Создание нового поколения светоизлучающих устройств – наноразмерных диодных матриц – позволяет развить элементную базу и получить уникальные оптические детекторы для микроразмерных устройств, в том числе и для микрофлюидики. Такие устройства позволяют реализовать многоканальное эффективное оптическое детектирование в планарном формате.
- 20 Бесспорно перспективным является создание фотонных кристаллов для оптического детектирования в микро- и нано- размерных устройствах. Но фотонные кристаллы также создаются для оптически управляемых микрофлюидных устройств, о которых будет упомянуто в дальнейшем.
- 21 Разработка специальных оптически чувствительных гидрогелей позволило создать уникальные свето-управляемые устройства: *оптический клапан и перистальтический насос*. Упомянутые ранее фотонные кристаллы используются для контроля и управления этими устройствами, а принцип действия – пояснен на рисунке.

- 22 ***Классическими устройствами для побуждения движения частиц и потоков в микрофлюидике являются насосы, управляемые электрическим полем, которые можно подразделить на:***
- Электроосмотические (для электролитов)
  - Электродинамические насосы (для отдельных флюидов: капель масла, этанола, ацетона...)
  - Электрофоретические/диэлектрофоретические (для разделения и транспортировки клеток, вирусов, маленьких капель...)
  - Электродинамические насосы типа «бегущей волны»
- 23 Действие электроосмотического насоса основано на эффекте электроосмотического потока в наноканалах при приложении внешнего электрического поля. Достоинствами его являются: отсутствие движущихся частей и возможность получения плоского профиля потока
- 24 Такие электроосмотический микроканальный насосы были созданы для охлаждения электронных схем. Спонсорами проект выступили организация DARPA, Intel, AMD, Apple
- 25
- 26 ***Другое важное применение наноструктур – для извлечения и концентрирования искоемых компонентов.***
- Применение пересекающихся микрофлюидных каналов, разделенных мембраной с нанопорами, позволяет осуществлять извлечение компонентов и последующее их концентрирование.
- Если между каналами существует электрический потенциал, то включаются дополнительные эффективные механизмы переноса частиц.
- 27 Развитие технологий получения нанопористого кремния и стекла с заданными характеристиками привело к возможности их использования в качестве своеобразных фильтров и сред разделения при анализе биологических проб. Размеры таких нанопористых структур – 60-120 нм в сечении и 300-500 нм высотой. Внедрение нанопористых структур в микрофлюидный канал позволяет получить своеобразную высокоэффективную колонку для разделения пробы.
- 28 На этом слайде приведены аналогичные структуры с иными геометрическими соотношениями диаметра структуры к высоте. Такие структуры формируются методом нанолитографии и отличаются от ранее рассмотренных тем, что являются регулярными и могут быть интегрированы в канал с глубиной десятки-сотни нанометров. Слева приведены результаты разделения маркера молекулярного веса ДНК и ss-ДНК, полученные на этих наноструктурах.
- 29 Использование линейных периодических наноструктур в каналах приводит к процессу наподобие просеивания длинных молекул или частиц. Под действием приложенного напряжения наблюдается электрофоретическое движение молекул (например, ДНК), которые, в зависимости от размеров, по-разному преодолевают периодические ступенчатые барьеры. На графиках приведены электрофореграммы разделения смеси ДНК, зависимость времени миграции от размеров ДНК и приложенного напряжения и т.д.

- 30 Важными функциональными устройствами микрофлюидики являются смесители и реакторы. На слайде приведен вариант трех-размерного нанофлюидного смесителя. Особенности такого смесителя является то, что он – пространственный, имеет достаточно узкие каналы для жидкого потока (50-350 нм), что обеспечивает высокую эффективность перемешивания. Смеситель получен с помощью экспериментальной установки ближнего поля.
- 31 Оригинальным применением наночастиц является управление движением жидкости в открытых и закрытых микрофлюидных каналах. Принцип управления заключается в следующем: сфокусированное оптическое излучение на границе жидкость – поверхность локально увеличивает температуру жидкости и ведет к испарению воды. Затем, пар в относительно холодном воздухе уплотняется в капельки перед жидко-воздушным интерфейсом. Капельки соединяются с первоначальной жидкостью. Периодическое сканирование светового потока позволяет управлять движением массы жидкости.
- 32 Во многих работах представлено использование наночастиц как носителей иммобилизованных объектов. Обычно используются наночастицы с явно выраженными магнитными или электрическими свойствами, которыми достаточно легко управлять. Эта область еще только находит применение в микрофлюидике, хотя и имеет хорошие перспективы.
- 33 В рамках настоящего сообщения представляется необходимым уделить некоторое внимание современным технологиям создания наноструктур для микрофлюидики. На настоящий момент времени основными процессами получения наноструктур являются:
- **литография** — фотолитография и травление (ультрафиолетовая, рентгеновская, ионная, наноимпринговая литографии; реактивно-ионное травление; СТМ-литография; использование микроскопии ближнего поля);
  - **лазерная микрообработка** — использование лазеров (экцимерных и др.);
  - **LIGA – технологии** (литография, гальваника, импринт);
  - **эпитаксиальные технологии**
- 34 **Наноимпринговая литография.**  
Этот метод основан на получение отпечатков наноструктур в полимерах методом горячего прессования. Для этого необходима прецизионная мастер-форма, обычно являющаяся весьма дорогостоящим изделием.
- 35 **Перьевая нанолитография**  
Другой современной технологией является перьевая нанолитография с использованием атомно-силового микроскопа. Наконечник погружается в раствор молекулы, которого необходимо нанести на образец, а затем, двигая наконечник по поверхности образца, получают «молекулярный» след. Толщина линии рисунка варьируется от десяти до 120 нм. Однако скорость формирования рисунка невелика – достигает несколько мкм в сек. Чтобы получить множество линий необходимо использовать линейку кантеливеров – такие работы уже ведутся.  
Существует модификация подобной технологии – технология получения наноканалов в полимерных материалах методом зондовой литографии – кантеливер АСМ применяется как нанорезец, оставляя канал глубиной несколько нм.

- 36 **Изготовление и использование полимерных нановолокон и нанотрубок**  
Авторы этой работы предлагают оригинальную технологию получения нановолокон, наноканалов и трубок для микрофлюидных устройств. На поверхность наносятся капли полимера (ПММА), между каплями формируются нити-мостики с использованием кантеливера АСМ. Затем осуществляется процесс напыления металла, стекла или парилена, после которого проводят растворение и вывод полимера – так формируется капилляр между двумя сосудами.  
На слайде представлены капилляры, сделанные методом покрытия ПММА волокна другими материалами с последующим распадом ПММА (СЭМ изображения).  
К сожалению, в рамках это доклада невозможно рассказать обо всех оригинальных, интересных и многообещающих технологиях изготовления наноструктур.
- 37 В заключение мне хотелось бы сообщить, что в нашем институте также ведутся работы по интегрированию наноструктур в микрофлюидные чипы. Такими структурами являются нановискеры и пористые стекла. На настоящее время получены прототипы микрофлюидных чипов с этими структурами и проведены экспериментальные исследования по разделению биологических проб.  
Работы ведутся в рамках следующих проектов и грантов:
1. «Создание наноструктурных пористых элементов функционального назначения для микроаналитических систем» (совместно с Институтом химии силикатов РАН), Программа фундаментальных исследований Отделения химии и наук о материалах РАН на 2006 г, «Создание эффективных методов химического анализа и исследования структуры вещества и материалов».
  2. РФФИ № 05-02-08090 офи\_а. Микроаналитические системы с интегрированными нитевидными кристаллическими наноструктурами.
  3. «Микрофлюидные чип-анализаторы с интегрированными наноструктурами (нановискерами)» (2005-2006 гг.) (совместно с лабораторией Г.Э. Цырлина), проект 5 Научной программы Санкт-Петербургского научного центра РАН
- 38 А на этом слайде приведены ресурсы Интернета, посвященные вопросам микрофлюидики и нанофлюидике.