

УДК 53.082.5+53.086+532.5.011

**МИКРОФЛЮИДНЫЕ ЧИПЫ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ
БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ МЕТОДАМИ МИКРОСКОПИИ
ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ**

И.В. Кухтевич, А.С. Букатин, И.С. Мухин, А.А. Евстапов

Микрофлюидные устройства в сочетании с методами микроскопии высокого разрешения позволяют создавать новые аналитические системы для исследований биологических объектов в естественном состоянии. Сформулированы основные требования, предъявляемые к методам микроскопии при неразрушающем изучении биологических объектов. Рассмотрены и обсуждены варианты фиксации биологических объектов. Приведены примеры экспериментальных образцов микрофлюидных чипов для методов микроскопии высокого разрешения.

Ключевые слова: микрофлюидный чип, биологическая проба, микро- и наноструктуры, конфокальная микроскопия, микроскопия ближнего поля, атомно-силовая микроскопия, литография.

Введение

Концепция создания аналитических систем на микрочиповой платформе (микрофлюидных чипах), предложенная проф. А. Manz в конце 80-х г.г. XX в., явилась основой новых высокопроизводительных приборов [1], получивших за рубежом названия «lab-on-a-chip» (лаборатория на чипе) и «micro Total Analysis Systems» (микросистемы «полного» анализа) [2]. Заинтересованность государственных организаций и коммерческих фирм в создании микроаналитических систем и новые возможности современных технологий вызвали прогресс в разработке приборов на микрочиповой платформе, изучении процессов и явлений в микро- и наноразмерном масштабе, создании новых методов синтеза и анализа веществ на микрочипах, исследовании возможностей микрофлюидики [3]. За последние 10 лет по теме микрофлюидики (microfluidic), по данным ISI Web of Science, было издано более 10 тыс. статей, и динамика публикаций непрерывно растет. За рубежом по микроаналитическим системам и смежным направлениям издаются значительное число монографий и книг [4]. Современным развитием микрофлюидики является нанофлюидика [5], изучающая эффекты в наноразмерных системах, транспорт молекул через наноканалы, взаимодействие с наноструктурами и т.д. Развитие микрофлюидики привело к появлению приборов, в которых осуществлялось воспроизводимое управление нано- и пиколитровыми объемами жидкости. В настоящее время микрофлюидные устройства востребованы в научной сфере и в промышленности как новый многообещающий инструмент для развития и создания новых методов и продуктов.

Для получения новых знаний важным является разработка высокочувствительных методов и приборного обеспечения для исследования биологических объектов (клеток, бактерий, вирусов и т.д.) в естественном состоянии. К наиболее эффективным системам при реализации неразрушающих методов анализа следует отнести микрофлюидные чипы (МФЧ), а регистрация изменений, происходящих в объектах под воздействием внешних факторов, может осуществляться разными методами, но достигнуть высокого пространственного разрешения можно, используя методы конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ), сканирующей ближнепольной оптической микроскопии (СБОМ), атомно-силовой микроскопии (АСМ). Визуализация в жидкости требует стабильной иммобилизации или фиксации биологических объектов. По этой причине поверхность материала часто подвергают специальной химической обработке, где впоследствии фиксируются биологические объекты. Но это может приводить к разрушению функциональных групп и повреждению структуры изучаемого объекта. Актуальным является разработка альтернативных методов фиксации объекта, в том числе на основе физических методов, не повреждающих биообъект. Микрофлюидные технологии позволяют осуществлять манипуляции с исследуемым объектом, воздействовать на объект, фиксировать его на заданном участке и измерять характеристики объекта, в том числе реологические [6]. Известны системы для исследований биологических объектов (клеток), сочетающие методы микроскопии высокого разрешения (МВР) и микрочиповые технологии [7, 8]. При этом стремятся создать различные гибридные методы и техники, обеспечивающие получение новой информации об объектах.

В настоящей работе приведены некоторые результаты исследований и работ авторов по созданию МФЧ для исследований биологических объектов достаточно больших размеров (1–7 мкм) методами МВР.

Исследование биологических объектов методами МВР

В процессе исследований были сформулированы следующие основные требования, которые необходимо соблюдать при изучении биологических объектов в естественном состоянии методами МВР:

- при наличии зондирующего излучения (светового потока) плотность мощности излучения не должна приводить к негативному воздействию на объект, при этом длительность воздействия излучения должна быть минимизирована;
- если в процессе измерений исследуемый объект подвергается нагреву, то должен быть предусмотрен отвод избыточного тепла от нагреваемого пространства;
- применение красителей и флуорофоров для усиления контраста или дополнительной индикации элементов структуры объекта не должно приводить к изменению функций исследуемого объекта;
- при сканировании объекта с применением методов зондовой микроскопии должно быть обеспечено минимальное физическое воздействие на объект, что может быть получено при использовании специальных зондов и полуконтактных методов исследований, кроме того, необходимо использовать малые амплитуды колебаний зонда;
- для получения достоверной и воспроизводимой информации время сканирования объектов должно быть минимизировано;
- в методах оптической микроскопии для достижения наилучшего разрешения объектив должен быть максимально приближен к изучаемому объекту, что приводит к определенным требованиям к реакционной камере, где размещен исследуемый объект;
- для методов зондовой микроскопии необходимо обеспечить доступ зонда к исследуемому объекту.

При исследовании биологических препаратов процесс подготовки образцов имеет определяющее значение для любого вида микроскопии. Методы и способы фиксации клетки в микрочиповых устройствах подразделяются на иммунологические и неиммунологические (физические). Иммунологические методы, в которых используются высокоспецифичные иммунные реакции между мембранными белками и антителами, реализованы в коммерческих продуктах многих биотехнологических фирм. Недостатками их являются дороговизна реагентов, необходимость специального оборудования и высокие требования к квалификации исследователя. Эти методы неперестают развиваться, появляются новые методики фиксации объектов на различных подложках. Получила широкое распространение иммобилизация клеток путем включения в различные гели, мембраны, волокна, основанная на химических и физических взаимодействиях. При такой иммобилизации клетки могут сохранять жизнеспособность и в присутствии питательной среды размножаться в приповерхностных слоях гелей. Но такой способ подходит только для методов оптической микроскопии и для КЛСМ.

Приготовление образцов для зондовой микроскопии предполагает иммобилизацию объекта на поверхности подложки, что приводит к дополнительным экспериментальным и методическим трудностям. Например, в случае бактерий вместо такой характеристики, как диаметр бактериальной клетки, появляются две новые – ширина и высота, причем высота меньше ширины из-за «сплющивания» клетки при ее фиксации к поверхности подложки. При получении изображений методом сканирующей зондовой микроскопии общепризнанным методом фиксации является обработка глутаровым альдегидом [9]. Поскольку при обработке глутаровым альдегидом клетка сохраняет воду и не расплывается по подложке, то считается, что ее изображение идентично изображению нативных клеток. При исследовании образцов в жидкости возникает проблема фиксации биологических объектов. В этом случае на поверхность подложки, на которой должны располагаться изучаемые объекты, наносится поли-L-лизин, лак (раствор нитроцеллюлозы и дибутилфталата в этилацетате и бутилацетате) или агароза.

В рамках данного проекта исследован вариант методики модификации стеклянной поверхности микрочипа для селективной фиксации биологического объекта, содержащей стадии активации поверхности, силанизации, обработки глутаровым диальдегидом и иммобилизации чувствительного слоя (белка или других агентов) [10]. Такой метод позволяет реализовать высокоселективную реакцию, например, взаимодействие антиген–антитело, с последующим детектированием образованного комплекса методами МВР.

К физическим методам фиксации биологических объектов в микрочипе следует отнести механические и гидродинамические «ловушки» с микро- и наноразмерными структурами. Суть действия такой «ловушки» заключается в том, что под действием ламинарных потоков изучаемый объект попадает в область, где его движение ограничено или затруднено. Структурами, затрудняющими движения объекта могут являться микро- и наноканалы с размерами меньше размеров объекта. Эти методы можно назвать пассивными, так как при этом воздействие на исследуемый объект минимально. К другим физическим методам следует отнести те, в которых применяются электрические, магнитные, электромагнитные и ультразвуковые поля [11–13]. Эти методы можно определить как активные, так как они в какой-то степени меняют исходные характеристики объекта. Физические методы позволяют создавать быстрые и простые технологии фиксации объектов. Наиболее простыми и эффективными методами для применения в микрочиповых устройствах являются механические и гидродинамические «ловушки» с микро- и нанопористыми мембранами, микро- и наноструктурами в канале или реакторе чипа. В работе уделялось внимание созданию МФЧ с функциональными микро- и наноструктурами для удерживания и фиксации клетки. Другим перспективным методом удержания и фиксации клетки является диэлектрофорез (ДЭ) [14]. Из-за простоты ДЭ широко используется в микрочиповых приборах для разделений бактерий, рако-

вых клеток, стволовых клеток, субпопуляций лейкоцитов. Различные типы клеток могут быть отделены с одной и той же конструкцией электрода при соответствующей частоте для каждого типа клетки. Преимуществом ДЭ является гибкость, полная контролируемость, удобство для автоматизации, а недостатком – нагрев системы и необходимость подбора буферного раствора с требуемой диэлектрической проницаемостью и проводимостью, а это означает, что клетки не могут быть непосредственно отделены в исходном образце.

МФЧ для микроскопии высокого разрешения

Существует множество технологий и методов формирования микро- и наноструктур в различных подложках, но выбор нужной технологии всегда в значительной степени определяется применяемым материалом и характеристиками формируемых структур. Все технологии (например, лазерная микрообработка, кислотное травление, ионно-реактивное травление и т.п.) связаны с активным воздействием на поверхность материала, что приводит к изменению свойств поверхности. Подробно с технологиями и методами формирования микроструктур можно ознакомиться в соответствующих обзорах и книгах [15, 16].

Микрогабаритные каналы и реакторы для МФЧ из стекла марки К8 были получены методами фотолитографии и кислотного травления, а сеть наноразмерных каналов между микроканалами – методом ионной литографии [17]. Герметизация микро- и наноканалов осуществлялась разными методами: термического связывания (спекания), с применением полидиметилсилоксановых пленок или с помощью фотоотверждаемых клеев [18].

Были изготовлены и исследованы экспериментальные образцы МФЧ для методов КЛСМ, для СБОМ и АСМ: микрочипы с квадрупольными электродами для диэлектрфоретических методов и микрочипы с системой наноканалов для фиксации микрообъектов [19].

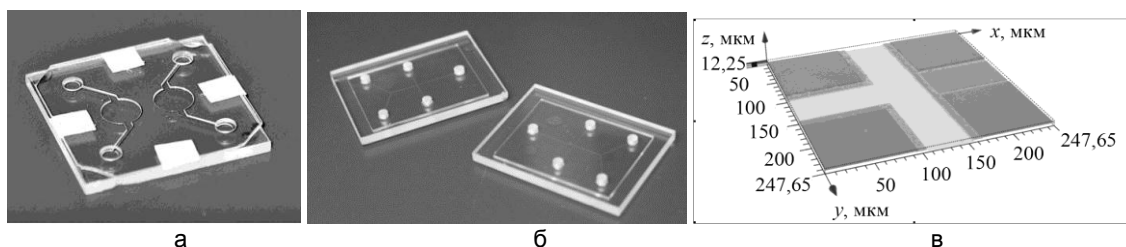


Рис. 1. Микрофлюидные чипы для КЛСМ: (а) – двухканальный микрочип с реакционными камерами (размеры МФЧ 24×24 мм, толщина 3 мм); (б) – чип с топологией «ступенька» (размеры МФЧ 30×40 мм, толщина 3 мм); (в) – область пересечения каналов МФЧ с топологией «ступенька» (изображение получено на КЛСМ Leica TCS SL)

МФЧ (рис. 1, а) предназначен для исследований биологических объектов методами оптической микроскопии и КЛСМ в реакционных камерах диаметром 5 мм и глубиной 20 мкм, имеет два независимых канала и реактора. Герметизация чипа проведена фотоотверждающим клеем Rite Lock. Размеры чипа составляют 24×24 мм, толщина – 3 мм. МФЧ для исследований биологических объектов, изображенный на рис. 1, б, позволяет отделить объекты размером более 5 мкм на ступеньке, сформированной на пересечении каналов (рис. 1, в). Выделенные объекты могут быть перенаправлены в боковые каналы. В микрочипе имеется отдельный транспортный канал, обеспечивающий стабильный поток буферного раствора, канал ввода пробы и реакционный канал (шириной 60 мкм, глубиной 15 мкм), где происходит смешивание пробы и буфера. Такая универсальная топология позволяет реализовать широкий круг различных методик при исследовании образцов.

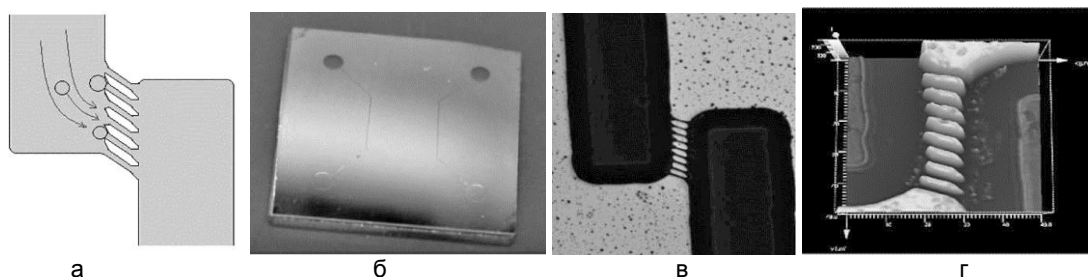


Рис. 2. Принцип действия гидродинамической ловушки (а) и изображения: МФЧ с наноканалами (б); наноканалов, соединяющих микроканалы: (в) – изображение получено на КЛСМ Leica TCS SL, длина волны сканирования 488 нм, (г) – 3D-реконструкция). Размеры МФЧ 24×24 мм, толщина 3 мм

Особенностью МФЧ для СБОМ и АСМ является необходимость открытого доступа зонда к исследуемому объекту. Это подразумевает, что микроканал или реактор, в котором располагается объект в естественной жидкой среде, имеют контакт с воздушной средой. При этом наблюдается испарение жидкости, которое должно быть каким-то способом скомпенсировано. Были выбраны геометрические харак-

теристики канала, обеспечивающие максимальный приток жидкости на порядок больше, чем скорость испарения – 10 нл/с. Другим эффективным методом является применение жидких масел для предотвращения испарения жидкости, но это влияет на процедуру и точность измерений.

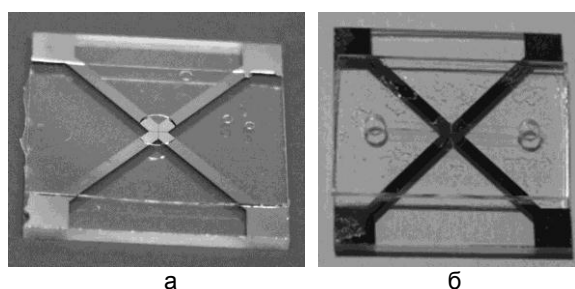


Рис. 3. МФЧ для диэлектрофореза: (а) – с открытой реакционной камерой (для АСМ и СБОМ); (б) – с закрытой реакционной камерой и подводными каналами (для КЛСМ). Размеры МФЧ 24×24 мм, толщина 1,3 мм

На рис. 2, а, поясняется принцип действия гидродинамической ловушки. МФЧ с системой микроканалов имеет размеры 24×24 мм, толщину около 1,3 мм (рис. 2, б). Между микроканалами (шириной 50 мкм) расположена сеть из 10 наноканалов шириной 260–270 нм (рис. 2, в, г). Две разных конструкции МФЧ для ДЭ приведены на рис. 3. Микрочип (рис. 3, а) с открытой реакционной камерой предназначен для исследований методами АСМ и СБОМ, другой микрочип (рис. 3, б) – с закрытой реакционной камерой и подводными каналами для буферного раствора и пробы – предназначен для оптической микроскопии и КЛСМ. В последнем случае необходимо использование при измерениях микрообъектива с рабочим расстоянием не менее 0,5 мм.

Все конструкции МФЧ были апробированы на модельных системах – буферных растворах, растворах флуоресцеина и полистирольных латексах размером 3 мкм и 6 мкм. Более подробную информацию о чипе для ДЭ можно найти в [19].

Заключение

Сочетание микрофлюидных технологий и методов микроскопии высокого разрешения позволяет создавать приборы и системы для исследований живых биологических объектов в естественной среде. При этом возникает ряд научных и технических задач, требующих решения. В методах микроскопии высокого разрешения необходимым является:

- фиксация объекта на время измерений;
- создание условий, при которых оказывается минимальное воздействие на изучаемый объект.

Авторами разработаны, изготовлены и апробированы несколько вариантов экспериментальных образцов микрофлюидных чипов для оптической микроскопии, КЛСМ, СБОМ и АСМ, позволяющих осуществлять исследования биологических объектов. Работоспособность микрофлюидных чипов была проверена на тестовых образцах и модельных системах.

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 14.740.11.0451, ГК 14.740.11.1218); Программы У.М.Н.И.К.

Литература

1. Manz A., Graber N., Widmer H.M. Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 1990. – № 1. – P. 244–248.
2. Reyes D., Iossifidis D., Auroux P., Manz A. Micro total analysis systems. 1. Introduction, theory and technology // *Analytical Chemistry*. – 2002. – № 74. – P. 2623–2636.
3. *Encyclopedia of Microfluidics and Nanofluidics* / Editor-in-Chief Li Dongqing. – New York: Springer Science & Business Media, 2008. – 2226 p.
4. *Microarrays. Preparation, Microfluidics, Detection Methods and Biological Applications* / Ed. K. Dill, R.H. Liu, P. Grodzinski. – New York: Springer Science & Business Media, 2009. – 356 p.
5. *Nanofluidics. Nanoscience and Nanotechnology* / Ed. by J.B. Edel, A.J. deMello. – Cambridge: The Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, 2009. – 198 p.
6. Nagai M., Oishi M., Oshima M., Asai H., Fujita H. Three-dimensional two-component velocity measurement of the flow field induced by the *Vorticella picta* microorganism using a confocal micro-PIV technique // *Biomicrofluidics*. – 2009. – V. 3. – P. 014105.
7. Meister A., Gabi M., Behr P., Studer P., Vörös J., Niedermann P., Bitterli J., Polesel-Maris J., Liley M., Heinzlmann H., Zambelli T. FluidFM: combining atomic force microscopy and nanofluidics in a universal liquid delivery system for single cell applications and beyond // *Nano Lett.* – 2009. – V. 9. – № 6. – P. 2501–2507.

8. Flores S.M., Toca-Herrera J.L. New future of scanning probe microscopy: Combining atomic force microscopy with other surface-sensitive techniques, optical microscopy and fluorescence techniques // *Nanoscale*. – 2009. – № 1. – P. 40–49.
9. Dufrière Y.F. Application of atomic force microscopy to microbial surfaces: from reconstituted cell surface layers to living cells // *Micron*. – 2001. – V. 32. – № 2. – P. 153–165.
10. Евстрапов А.А., Есикова Н.А., Рудницкая Г.Е., Антропова Т.В., Анфимова И.Н. Разработка оптического сенсорного элемента для микрофлюидных чипов на основе натриево-боросиликатного пористого стекла // *Научное приборостроение*. – 2010. – Т. 20. – № 1. – С. 52–58.
11. Tsutsui H., Ho C.-M. Cell separation by non-inertial force fields in microfluidic systems // *Mech. Res. Comm.* – 2009. – № 36. – P. 92–103.
12. Евстрапов А.А. Физические методы управления движением и разделением микрочастиц в жидких средах. Ч. 1. Диэлектрофорез, фотофорез, оптофорез, оптический пинцет // *Научное приборостроение*. – 2005. – Т. 15. – № 1. – С. 8–21.
13. Manneberg O., Vanherberghen B., Önfelt B., Wiklund M. Flow-free transport of cells in microchannels by frequency-modulated ultrasound // *Lab Chip*. – 2009. – № 9. – P. 833–837.
14. Voldman J. Electrical Forces For Microscale Cell Manipulation // *Annu. Rev. Biomed. Eng.* – 2006. – № 8. – P. 425–454.
15. *Lab-on-a-Chip Technology: Fabrication and Microfluidics* / Ed. K.E. Herold and Rasooly A. – Norwich: Caister Academic Press, 2009. – V. 1. – 410 p.
16. Becker H., Gärtner C. Polymer microfabrication technologies for microfluidic systems // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2008. – V. 390. – № 1. – P. 89–111.
17. Евстрапов 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 (68). – С. 59–63.
18. Евстрапов А.А., Лукашенко Т.А., Тупик А.Н. Применение фотоотверждаемых оптических клеев для герметизации аналитических микрочипов // *Научное приборостроение*. – 2010. – Т. 20. – № 1. – С. 29–38.
19. Кухтевич И.В., Букатин А.С., Евстрапов 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.

<i>Кухтевич Игорь Владимирович</i>	– Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, аспирант, ba@inbox.ru
<i>Букатин Антон Сергеевич</i>	– Санкт-Петербургский академический университет – научно-образовательный центр нанотехнологий РАН, аспирант, antbuk.fiztek@gmail.com
<i>Мухин Иван Сергеевич</i>	– Санкт-Петербургский академический университет – научно-образовательный центр нанотехнологий РАН, аспирант, imukhin@yandex.ru
<i>Евстрапов Анатолий Александрович</i>	– Институт аналитического приборостроения РАН, кандидат технических наук, доцент, an_evs@mail.ru