

НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«КУРЧАТОВСКИЙ ИНСТИТУТ»

На правах рукописи



ПОПОВ Антон Михайлович

**МИКРОФЛЮИДНЫЕ УСТРОЙСТВА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ
СТРУКТУРЫ БЕЛКОВ И МЕХАНИЗМОВ ИХ КРИСТАЛЛИЗАЦИИ НА
ИСТОЧНИКЕ СИНХРОТРОННОГО ИЗЛУЧЕНИЯ**

Специальность 01.04.01 – Приборы и методы
экспериментальной физики

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук

Научный руководитель
кандидат физико-математических наук
Занавескин Максим Леонидович

Москва – 2018

Оглавление

Введение	4
<i>1. Литературный обзор</i>	12
<i>1.1. Создание микрофлюидных систем</i>	13
1.1.1. Формирование микроканалов	14
1.1.2. Материалы и способы их соединения	23
<i>1.2. Микрофлюидные устройства для изучения структуры белков</i>	30
1.2.1. Структура белковых молекул	31
1.2.2. Методы исследования структуры белков	33
1.2.3. Общие принципы получения кристаллов белков	35
1.2.4. Факторы, влияющие на кристаллизацию белков	37
1.2.5. Методы кристаллизации белков	40
1.2.6. Начальные стадии кристаллизации и способы их исследования	45
1.2.7. Микрофлюидные системы для кристаллизации белков	47
<i>2. Методическая часть</i>	51
<i>2.1. Материал</i>	51
<i>2.2. Комплекс методов и оборудования для создания МФУ</i>	53
<i>2.3. Комплекс микроскопии (диагностика)</i>	56
<i>2.4. Курчатовский специализированный источник синхротронного излучения ("КИСИ-Курчатов")</i>	58
<i>3. Разработка технологической цепочки по созданию различных микрофлюидных устройств на основе ПММА (Чип-за-День)</i>	63
<i>3.1. Основные технологические этапы создания МФУ</i>	64
<i>3.2. Создание микроканалов</i>	68
<i>3.3. Бондинг (термическая спайка)</i>	75
<i>3.4. Модификация свойств МФУ</i>	83
<i>3.5. Примеры применения разработанной технологии</i>	87

4. Кристаллизация белков в микрофлюидном чипе методом микробатч и проведение РСА	96
<i>4.1. Разработка капельного микрофлюидного реактора.</i>	97
4.1.1. Стадии и режимы формирования капель в Т-образной геометрии	99
4.1.2. Управление режимами образования капель	102
4.1.3. Капельный и выдавливающий режимы	103
4.1.4. Режимы выдавливания и параллельного течения жидкостей	105
4.1.5. Создание требуемых условий каплеобразования	106
<i>4.2. Формирование микрофлюидных чипов</i>	107
<i>4.3. Наблюдение процессов формирования капель в изготовленных микрофлюидных чипах</i>	109
<i>4.4. Кристаллизация белков в МФЧ и проведение рентгеноструктурного анализа на источнике синхротронного излучения</i>	113
5. Исследование начальной стадии кристаллизации белков методом МУРР	118
<i>5.1. Создание микрофлюидной ячейки для исследования белковых растворов методом МУРР</i>	120
<i>5.2. Выбор материалов окон ячеек</i>	122
<i>5.3. Рассеяние в МФЯ при разных энергиях излучения</i>	124
<i>5.4. Исследование белковых растворов</i>	125
Заключение	130
Благодарности	132
Список сокращений и условных обозначений	133
Список литературных источников	135

Введение

Актуальность

Микрофлюидика (микрогидродинамика) описывает поведение малых объемов и потоков жидкостей, ограниченных в каком-либо измерении субмиллиметровыми масштабами, а микрофлюидные технологии осуществляют прецизионный контроль рабочих жидкостей (микро-, нано-, пико- и фемтолитров), что крайне востребовано в химии, медицине, фармакологии, биологии и многих других научно-технических областях. Примерами практических применений, для которых микрофлюидные устройства (МФУ) играют ключевую роль, являются струйная печать, системы скрининга, ДНК-чипы, средства медицинской экспресс диагностики. Становление микрофлюидики также стало одним из факторов для бурного развития междисциплинарного направления, которое называют «лаборатория на чипе». Это связано с тем, что МФУ позволяют одновременно реализовать десятки экспериментов с жидкостными составами на площадях в несколько квадратных сантиметров при общих расходах исследуемых материалов порядка единиц микролитров. Последнее обстоятельство имеет особое значение ввиду сложности получения (наработки) многих чистых веществ (в частности, белковых соединений) в больших количествах.

Общими тенденциями развития микрофлюидных устройств являются удешевление технологий их создания, внедрение подходов микрофлюидики в новые области, и расширение функциональных возможностей МФУ.

Для формирования субмиллиметровых каналов с высокими аспектными отношениями микрофлюидика изначально требовала крайне дорогого оборудования и материалов микроэлектронной отрасли. На текущем же этапе развития микрофлюидики имеет место повсеместная тенденция к использованию более доступных видов оборудования и материалов. Наблюдается переход, в технологии создания МФУ, от литографических методов к безмасочным технологиям (например, лазерная гравировка) и активное внедрение полимеров, в

качестве рабочего материала, которые более доступны, дешевы и легко поддаются обработке.

Поиск более простых и дешевых способов создания МФУ – это естественное следствие растущего спроса на них. Основным спросом создают крупные бурно развивающиеся индустрии – фармацевтика и медицинская диагностика в которых распространены стандартизированные одноразовые устройства. Удельная стоимость подобных МФУ может быть снижена за счет массовости их производства. С другой стороны, для многих задач нужны единичные изделия со специфической конструкцией, и в этом случае надеяться на их удешевление за счет увеличения объемов выпуска уже не приходится. В первую очередь, это касается МФУ для научных приложений, где одним из главных критериев является гибкость и разнообразие исследований, и, соответственно, возможность быстрого прототипирования и изготовления микроканальных жидкостных систем.

Обширным полем для применения МФУ в исследовательских целях стала область кристаллизации белков для их последующего изучения. Анализ кристаллов белков рентгеновскими методами позволяет с высокой точностью определять их структуру, однако на сегодняшний день успешно кристаллизовать удалось порядка 5% всех известных белков. Ситуация осложняется тем, что многие белковые соединения в чистом виде могут быть наработаны или выделены в крайне ограниченных объемах.

Капельная микрофлюидика позволяет проводить подбор (скрининг) условий кристаллизации путем создания большого числа капель-микрореакторов нанолитрового объема с различными условиями в них. При этом в случае успешной кристаллизации, получаемые образцы имеют малый размер, а изучение объектов такого размера требует фокусированного излучения высокой интенсивности, которое на текущий момент доступно только в источниках синхротронного излучения (СИ) и лазерах на свободных электронах. Их излучение также позволяет наблюдать за динамикой ранних фаз кристаллизации.

Исследования в представленной работе были направлены на поиск подходов удешевления и ускорения создания МФУ, а также на создание МФУ, представляющих недоступные ранее функциональные возможности для научных исследований. В частности, в задачи работы входили создание и демонстрация работоспособности микрофлюидных ячеек (МФЯ) для *in situ* наблюдения за динамикой кристаллизационных процессов в белковых растворах, а также микрофлюидных чипов (МФЧ) для кристаллизации и рентгеноструктурных исследований белков непосредственно в чипе с использованием синхротронного излучения.

Цель и задачи работы

Целью работы являлась разработка и поиск способов создания МФУ, обеспечивающих упрощение процесса их изготовления по сравнению с существующими методами, а также создание МФУ, предоставляющих новые функциональные возможности для научных исследований и реализации новых исследовательских подходов.

Для достижения поставленной цели решались следующие научно-технические задачи:

- Разработка технологической цепочки, обеспечивающей малую стоимость и высокую скорость разработки и создания МФУ;
- Создание МФЧ для кристаллизации белка методом микробатч и реализация исследовательской методики, состоящей в проведении рентгеноструктурного анализа (РСА) полученных кристаллов с использованием источника синхротронного излучения без извлечения кристаллов из чипа;
- Создание МФЯ для исследований процессов кристаллизации и реализация исследовательской методики, состоящей в *in situ* наблюдении малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР) в микрофлюидной ячейке с использованием источника синхротронного излучения.

Научная новизна

1. Впервые проведен рентгеноструктурный анализ кристаллов белков лизоцима, аминотрасферазы из *Methanococcus vannielii* (MV) и эстеразы PMGL2 непосредственно в микрофлюидном чипе из полиметилметакрилата (ПММА). На белках, кристаллизованных в МФЧ, получена дифракционная картина с разрешением в 2.74 Å для лизоцима, 2.95 Å для MV и 2.89 Å для PMGL2. Ухудшение пространственного разрешения РСА кристаллов из-за рассеяния рентгеновского излучения на ПММА в микрофлюидной ячейке для используемых белков составило порядка 50% от разрешения, полученного на извлеченных кристаллах.

2. Впервые продемонстрирована возможность *in situ* наблюдения динамики кристаллизации белков в МФЯ из ПММА с плоскопараллельными кварцевыми окнами методом малоуглового рентгеновского рассеяния.

3. Впервые проведена успешная термическая спайка компонентов микрофлюидных устройств из ПММА при давлениях не более 1500 мбар и температурах ниже 100°C. В изготовленных МФУ не было выявлено признаков разгерметизации и протечек при длительной прокачке водных и белковых растворов, а также вязких масел с общим потоком до 65 мкл/мин, что показывает их полную пригодность для практического использования.

Практическая значимость

В работе получен ряд результатов, имеющих практическую значимость:

1. Разработана технологическая цепочка для оперативного прототипирования и создания разборных МФУ из ПММА методами лазерной абляции и термической спайки. При этом достигнуто существенное упрощение процесса изготовления МФУ в сравнении с другими существующими альтернативами, что создает перспективы удешевления и ускорения процедуры прототипирования МФУ.

2. Показана возможность многократного (до трёх раз) вскрытия МФУ из ПММА для извлечения/загрузки пробы исследуемого материала и повторной термической спайки.

3. Изготовлены МФЧ для кристаллизации белка методом микробатч, МФЯ для проведения исследований белковых растворов методом МУРР, а также прототипы микрофлюидной электрохимической ячейки для улавливания ^{18}F - и микрофлюидный чип-фотобиореактор (генератор кислорода) на основе микроорганизмов хлорелла вульгарис.

В ходе исследований созданы 2 ноу-хау и оформлен патент на полезную модель №182997.

Достоверность и надежность результатов подтверждается воспроизводимостью результатов экспериментов, проведенных на различном лабораторном и измерительном оборудовании, сопоставлением с известными результатами и соответствием результатам других авторов.

Положения, выносимые на защиту

1. Существенное упрощение технологии создания МФУ из ПММА по сравнению с существующими, достигается за счет механической полировки неровностей, образующихся при профилировании поверхности ПММА. Благодаря этому термическая спайка компонентов МФУ может быть проведена под давлениями не более 1500 мбар при температуре 120°C , а предварительная обработка ПММА озоном позволяет снизить эту температуру до $90\text{--}100^{\circ}\text{C}$.

2. Использование МФЧ из ПММА позволяет осуществлять кристаллизацию белков из растворов методом микробатч и проводить РСА полученных кристаллов непосредственно в МФЧ с использованием синхротронного излучения, в том числе:

- идентифицировать белковые кристаллы, отличать их от квазикристаллов или кристаллов плохой морфологии;

- отбирать кристаллы наилучшего кристаллического совершенства (дифракционного качества) непосредственно в чипе;

- определять структуру кристаллизованного белка с пространственным разрешением лучше 3Å , не извлекая кристалл из чипа.

3. МФЯ из ПММА с плоскопараллельными кварцевыми окнами позволяет проводить *in situ* исследования процессов кристаллизации белков из растворов методом МУРР с использованием синхротронного излучения. Ячейки подобной конструкции позволяют снизить объем исследуемого препарата более чем в 7 раз по сравнению со стандартными кварцевыми капиллярами, применяемыми в МУРР для изучения белковых растворов при сопоставимом соотношении сигнал/шум. При использовании в качестве рентгенопрозрачного окна особо чистого кварцевого стекла толщиной 60 мкм собственный уровень фона рассеяния ячейкой в диапазоне измеряемых углов меньше, чем у кварцевых капилляров, что обеспечивает возможность увеличения точности измерений.

Личный вклад диссертанта

Автор участвовал в постановке задач исследований и выборе методов их решения. Также личный вклад автора заключается в самостоятельной разработке технологической цепочки для создания МФУ из ПММА и проведения всех экспериментальных работ по изготовлению МФУ, посредством лазерного гравера и термического бондинга. Автор внес определяющий вклад в эксперименты по низкотемпературному бондингу (до 100°C) МФУ из ПММА с помощью УФ-озонатора, эксперименты по качественному и прецизионному бондингу многослойных структур, эксперименты по нанесению металлических тонких плёнок методом магнетронного напыления после обработки поверхности ПММА плазмой. Автором работы были реализованы прототипы микрофлюидной электрохимической ячейки для улавливания радиоактивного изотопа ^{18}F - и микрофлюидный чип-фотобиореактор, а так же изготовлены МФЧ для кристаллизации белка методом микробатч, МФЯ для проведения исследований белковых растворов методом МУРР. Автор активно участвовал в постановке

экспериментов по проведению РСА полученных белковых кристаллов и исследований динамики начальных стадий кристаллизации белков методом МУРР.

Публикации автора:

1. Попов А.М., Миронова А.А., Занавескин М.Л., Микрофлюидика и её перспективы в медицине // Молекулярная медицина 2012, № 5, с. 9-16

2. Попов А.М., Миронова А.А., Занавескин М.Л., Мамичев Д.А., Банникова Н.А., Марченков Н.С., Марченко Н.В., Применение микрофлюидных технологий для синтеза радиофармпрепаратов, меченных ^{18}F // Медицинская физика 2013, № 4 (60), с. 44-52

3. Попов А.М., Миронова А.А., Занавескин М.Л., Влияние реактивного ионного травления на поверхность полиметилметакрилата // Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования 2014, № 5, с. 37-42

4. Попов А.М., Бойкова А.С., Волков В.В., Дьякова Ю.А., Ильина К.Б., Конарев П.В., Марченкова М.А., Петерс Г.С., Писаревский Ю.В., Ковальчук М.В., Микрофлюидная ячейка для изучения структуры предкристаллизационной стадии растворов белков методом малоуглового рассеяния рентгеновских лучей // Кристаллография, 2018, том 63, № 5, с. 697-702

5. Попов А.М., Дороватовский П.В., Мамичев Д.А., Марченкова М.А., Николаева А.Ю., Разработка микрофлюидного чипа для кристаллизации белка методом микробатч // Кристаллография – принято к печати.

Доклады на семинарах и конференциях:

- 6-ая Международная биотехнологическая выставка-ярмарка «РосБиоТех – 2012». (Москва, ноябрь 2012)

- «XIV Курчатовская молодежная научная школа» (Москва, ноябрь 2016)

- Первый Российский кристаллографический конгресс «От конвергенции наук к природоподобным технологиям» (Москва, ноябрь 2016)

- Объединенный семинар ИК РАН // ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН. (Москва, март 2017)
- Россия 360 – Россия Устремленная в будущее // Микрофлюидные технологии для кристаллизации белковых молекул. (Москва, ноябрь 2017)

Структура и объем диссертационной работы

Диссертация состоит из введения, 5 глав, заключения и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 149 страницах машинописного текста, включая 74 рисунка, 3 таблицы и 156 ссылок на литературные источники.

1. Литературный обзор

Микрофлюидные технологии нашли свое применение в большом количестве областей и дисциплин. Возможность прецизионно управлять малыми объемами жидкостей сделала микрофлюидику востребованным инструментом для научных исследований в физике, химии, биологии и медицине. Особую роль микрофлюидика играет в исследовательских областях, связанных с изучением процессов протекающих в живых организмах, и в частности – в исследованиях свойств белковых соединений.

Использование даже простых микрофлюидных устройств существенно повышает эффективность научных исследований, поскольку дает возможность снизить расходы биоматериалов, ускорить эксперименты и предоставить возможности, недоступные при эксплуатации стандартных методов и оборудования. Наиболее наглядно это показывают достижения активно развивающегося направления Lab-On-Chip (лаборатория на чипе), позволившего, например, сделать многие виды медицинской диагностики более доступными (например, глюкометр), заменив сложные исследовательские комплексы оборудования на биочипы малых размеров, которые можно найти в открытой продаже по разумным ценам.

Такая характеристика, как «доступность», однако, сейчас применима только к стандартизированным МФУ, которые массово выпускаются в промышленных масштабах. Для научных исследований, напротив, чаще всего требуются единичные устройства с уникальной конструкцией и специфическими свойствами. Принципиальная немасштабируемость исследовательских МФУ делает их создание стандартными (технологии кремниевой электроники) методами дорогим, сложным и, длительным процессом для большинства лабораторий.

Существующий запрос на более экономичные в создании исследовательские микрофлюидные системы (МФС) стал причиной проведения активных исследований, направленных на поиск упрощения технологических

цепочек по их созданию. Подобные работы активно ведутся во всем мире, и, хотя они и приносят результаты, несерийные МФУ по-прежнему сложно назвать доступными.

Исследования в представленной работе были направлены на поиск подходов удешевления и ускорения создания микрофлюидных устройств, а также на создание МФУ, представляющих новые функциональные возможности для научных исследований. В частности, в задачи работы входили создание и демонстрация работоспособности микрофлюидных ячеек для *in situ* наблюдения за динамикой кристаллизационных процессов в белковых растворах и микрофлюидных чипов для кристаллизации и рентгеноструктурных исследований белков непосредственно в чипе с использованием синхротронного излучения.

В свет ежегодно выходят тысячи публикаций, посвященных микрофлюидным технологиям, исследованиям белков и изучению их свойств с применением микрофлюидики. Эти области на сегодняшний день настолько обширны, что провести их исчерпывающий обзор представляется довольно сложной задачей. По этой причине, приведенный далее обзор сосредоточен на работах, имеющих наиболее близкое отношение к целям работы. Обзор включает три части. В первой (1.1) рассмотрены и сопоставлены наиболее распространенные, а также наиболее интересные с точки зрения простоты и доступности методы создания МФУ. Во второй части (1.2) рассматриваются принципы и методы получения кристаллов белковых молекул для изучения функциональных свойств белков, а также роль микрофлюидных технологий в этой области. Обзор завершается краткими выводами.

1.1. Создание микрофлюидных систем

Рассмотрение способов изготовления МФУ следует начать с особенностей их конструкции. МФУ должны содержать в себе каналы и объемы, по которым будет перемещаться жидкость. Современные МФУ чаще всего представляют из себя сэндвич-структуры, состоящие минимум из двух слоев. На поверхности одного из слоев каким-либо способом формируется система каналов и/или

функциональных элементов, а второй слой выступает в роли крышки, герметизирующей систему.

При создании МФУ такой конструкции выделяются два основных этапа создания:

- формирование рисунка (создание микроканалов и резервуаров);
- герметизация системы (соединение пластины с каналами и крышки).

Создание микроканалов и функциональных элементов – это, пожалуй, наиболее критичная стадия изготовления МФУ, с которой связана значительная часть стоимости и времени разработки. Для их формирования используются множество методов: фотолитография, нанопечатная и мягкая литография, лазерная микрообработка, LIGA-технологии и т.д.

Соединение частей МФУ в единое изделие является не менее важной процедурой и тоже сопряжено с техническими особенностями и сложностями. Методы соединения (спайки) частей устройства определяются, в первую очередь, материалами. На ранних стадиях развития микрофлюидики, микроканалы в биочипах (для геномного секвенирования, ПЦР и др.) изготавливались из кремния [1, 2], стекла [3] или в сочетании кремний-стекло [4]. В настоящее же время появилась устойчивая тенденция применения полимерных материалов. Сильными аргументами в пользу использования полимеров послужила их дешевизна, лёгкость обработки и оптическая прозрачность.

Ниже рассмотрены наиболее распространенные способы формирования микроканалов, а затем и используемые в микрофлюидике материалы. Описание материалов сопровождается способами монтажа изготавливаемых из них МФУ.

1.1.1. Формирование микроканалов

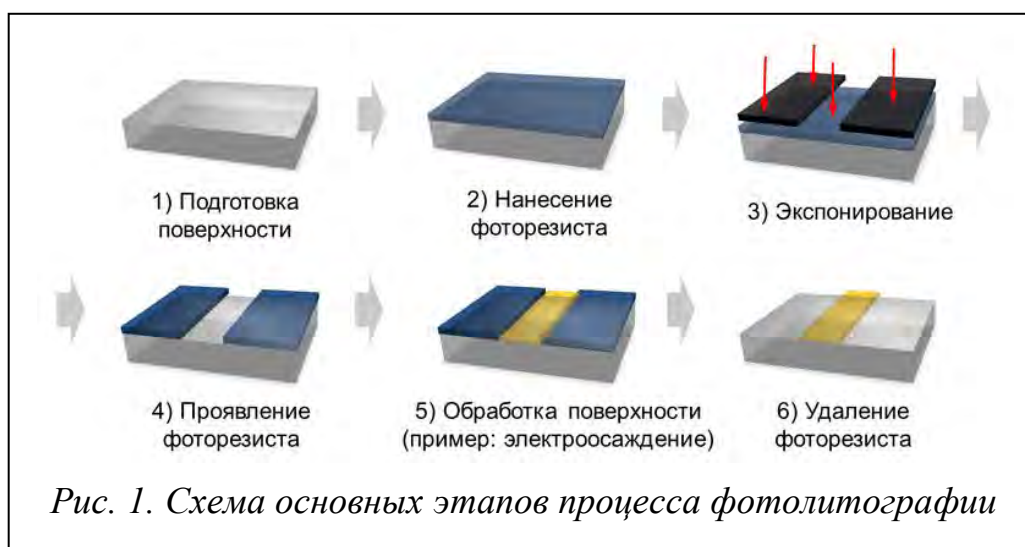
Литографические методы (Масочные)

Существует множество методов создания микрофлюидных систем, и значительная доля этих методов представляет собой разновидности литографии.

Одним из наиболее распространенных видов литографии является **фотолитография** (photolithography), суть которой состоит в нанесении на поверхность светочувствительного вещества (фоторезиста), которое подвергается

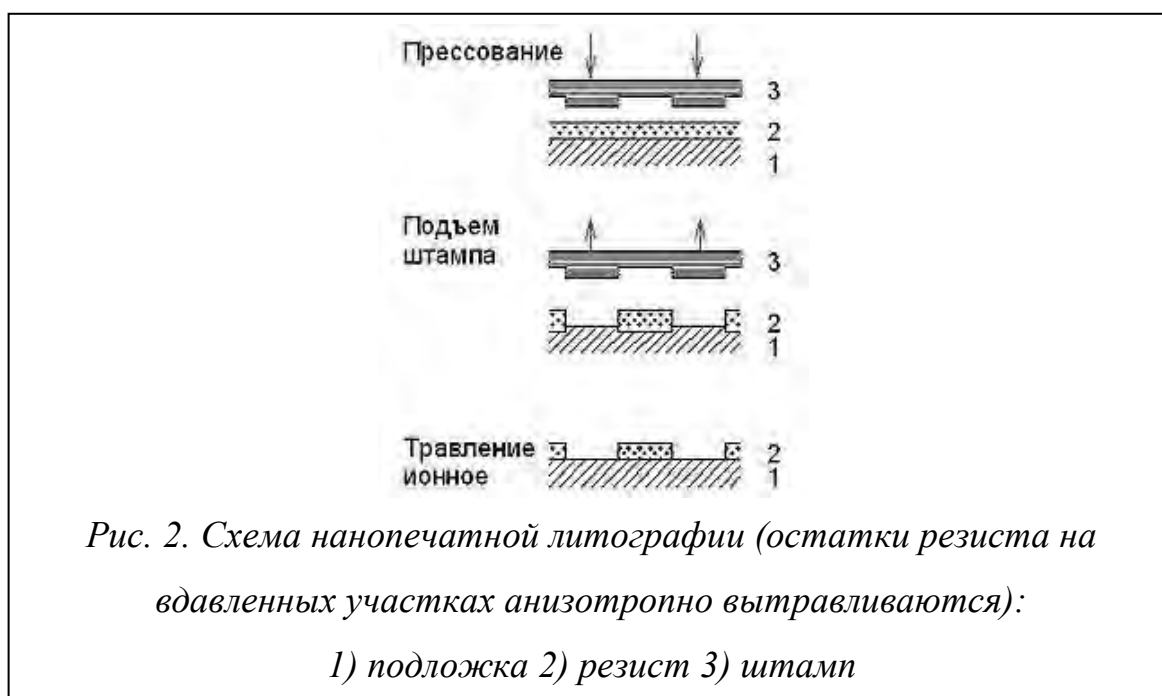
локальному воздействию света. Затем, в зависимости от типа фоторезиста, засвеченные или не подвергнутые экспонированию области удаляются специализированным химическим составом. Различные вариации фотолитографии используются в производстве полупроводниковых приборов [5].

Суть процесса **контактной фотолитографии** сводится к тому, что на обрабатываемую поверхность наносится фоторезист, который экспонируется светом через фотошаблон с заданным рисунком, приведенный в контакт с поверхностью подложки. Далее проэкспонированные участки фоторезиста удаляются в проявителе (позитивный процесс). Получившийся на фоторезисте рисунок используется для создания каналов непосредственно на подложке, методом травления в жидкости или плазме, или же путем нанесения тонкой плёнки с последующим lift-off процессом (взрывная литография) [6] (Рис. 1). Экспонирование в этой технике производится ультрафиолетовым излучением ($\lambda \approx 400$ нм) – ртутной лампой, а минимальные размеры получаемых структур составляют $0.5\text{--}1$ мкм [7,8]. Использование современной проекционной фотолитографии позволяет достигать пространственного разрешения менее 100 нм, однако этот метод крайне дорог и его использование оправдано лишь при серийном производстве.



Ещё один метод, используемый для получения микро и наноструктур – **нанопечатная литография** (nanoimprinting). В нанопечатной литографии изображение образуется за счёт механической деформации полимерного

покрытия (резиста) пресс-формой (штампом) [9]. На подложку наносится тонкая плёнка резиста, в которую затем вдавливаются заранее изготовленная пресс-форма, с необходимой топологией. Оставшийся резист, служит в качестве защитной плёнки, в то время как чистая часть подложки подвергается плазменному или жидкостному травлению. Остатки резиста сгорают/смываются либо в процессе травления, либо уже после окончания процесса снимаются растворителем (Рис. 2) [10,11]. Посредством нанопечатной литографии можно получать наноструктуры размером *менее 10 нм* на достаточно больших площадях. Исключение из технологического процесса облучения резиста через маску упрощает производство, но из-за того, что нанопечатная литография работает с исключительно гладкими поверхностями, этот метод невозможно использовать в технологических цепочках, где необходима многоступенчатая литография [12]. Нельзя не отметить, что данная технология создания МФУ крайне негибкая, то есть не позволяет оперативно изменять топологию изготавливаемых устройств. Стоит также обратить внимание на стоимость масок для этой технологии – она в разы дороже тех масок, что используются в классической контактной фотолитографии. Таким образом, нанопечатная литография – метод подходящий исключительно для массового производства [13,14].

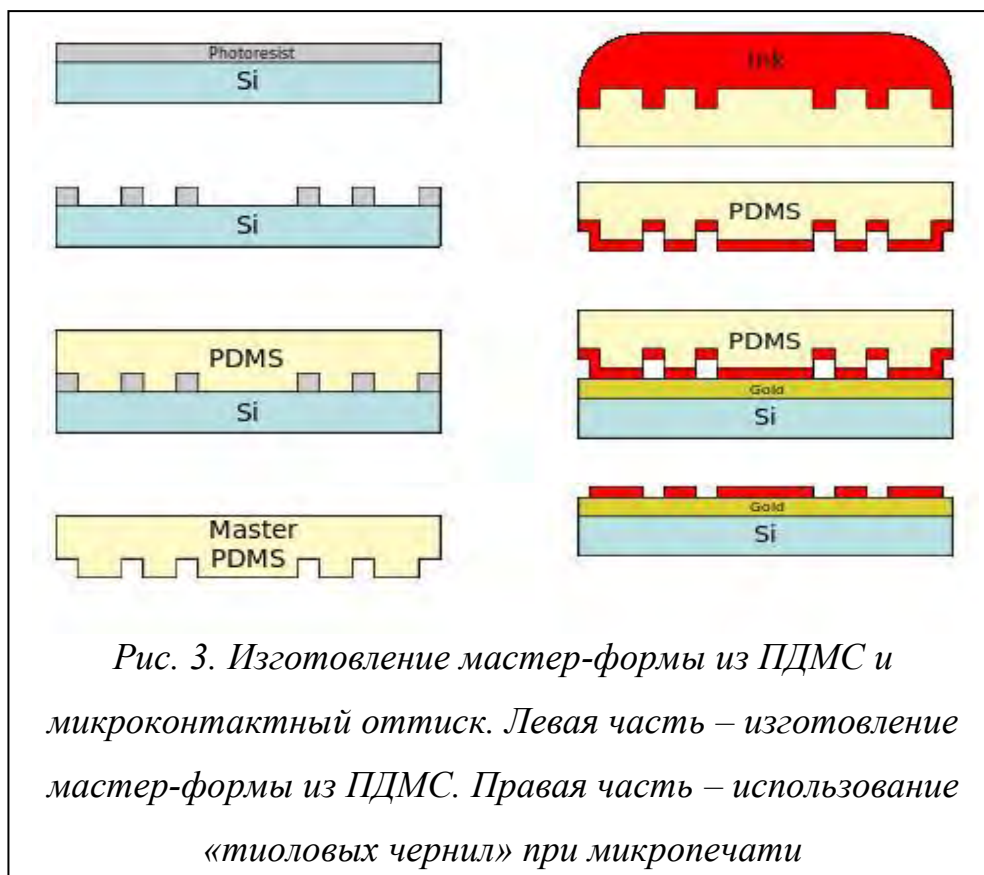


Мягкая литография (soft lithography) – эта совокупность методик представляет собой способы формирования микроструктур (размером *от сотен нанометров до сотен микрометров*) без применения ультрафиолетового, рентгеновского или любого другого вида излучения. В мягкой литографии используются эластомерные штампы, пресс-формы (молды) и эластичные фотомаски, изготовленные из относительно мягких и/или эластичных материалов [15,16]. Одним из наиболее распространенных и исследованных полимеров для применения в этом методе, является полидиметилсилоксан (ПДМС). Основными способами создания устройств с использованием ПДМС-структур, являются микроконтактный оттиск/печать (microcontact printing) [17], репликационное микролитье (replica micromolding) [18,19] и термоформирование (thermoshaping) [20].

Для осуществления мягкой литографии создается мастер-форма из ПДМС (Рис. 3., лев.) [21,22]. Сначала с помощью фотолитографии и последующего травления из кремния создается негативный штамп. Этот штамп используется как форма для отливки, которая заполняется жидким ПДМС. Далее, затвердевшую эластичную мастер-форму можно использовать в разных технологических цепочках. При микроконтактном оттиске/микропечати, ПДМС покрывают тиоловыми чернилами, которые образуют на поверхности самоорганизующиеся монослои (CM / SAMs – Self-Assembled Monolayer), которые и переносятся в последующем на материал будущего МФЧ (Рис. 3., прав.) [23].

Самоорганизующиеся монослои (SAM) формируются из так называемых амфифильных молекул, то есть молекул, разные концы которых имеют различные химические свойства. Типичными примерами являются соединения, молекулы которых на одном конце являются гидрофобными, а на другом конце – гидрофильными. Тонкие плёнки (несколько десятков – сотен нм) из самоорганизующихся монослоев (CM) могут менять такие свойства поверхности, как поверхностная энергия. В связи с этим, гидрофобная поверхность металлов и полупроводников может быть преобразована в гидрофильную без потери

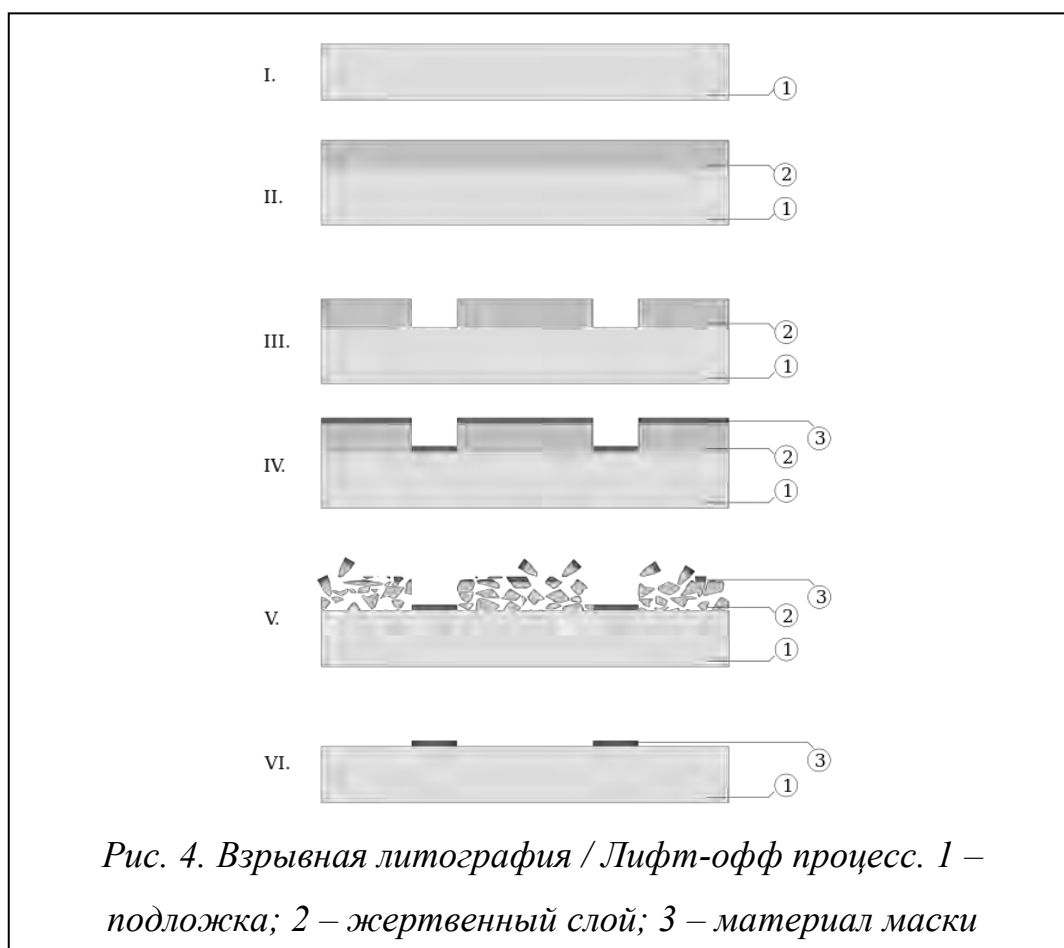
материалами свойств проводимости. Эти свойства СМ нашли широкое применение в биосенсорах и биоанализаторах [24,25].



Мягкая литография получила широкое применение в создании биотехнологических устройств. ПДМС мастер-форму можно использовать практически неограниченное число раз, однако процесс её создания является не менее затратным и сложным, чем классическая фотолитографическая технологическая линейка [26,27].

Все литографические методики (масочная литография) получения МФС, перечисленные выше, позволяют получить на поверхности слой полимерного резиста с нужным рисунком. Сами каналы формируются на этапе травления, который и определяет пространственное и аспектное соотношение итоговой структуры [28,29]. Проблемы могут возникнуть, если необходимо получить микроканалы большой глубины (сотни микрон) или с высоким аспектным отношением глубины к ширине. Резист не может выступать в качестве маски для создания глубоких каналов, так как стравится или сгорит в процессе травления. Кроме того, травление материала происходит не только вглубь образца, но и в

стороны. Чтобы иметь возможность проводить глубокое травление на поверхности создают рисунок из стойкого к травлению металла или диэлектрика. Для этого формируют негативный рисунок на резисте, затем проводят запыление поверхности маскирующим материалом и взрывное удаление резиста. Таким образом, на поверхности остается маскирующий слой в областях проявки резиста, через который и проводится глубокое травление рабочего материала микрофлюидного чипа (Рис. 4) [30,31]. Само травление должно производиться методом, который обеспечит требуемое аспектное соотношение сечения канала, поэтому предпочтительным является плазменное травление, обладающее селективностью по направлениям. Таким образом, в случае использования описанных выше литографических методов для создания глубоких каналов необходимо усложнение технологического маршрута.



Одним из методов создания микроразмерной структуры с большим аспектным соотношением, является **LIGA-технология** (немецкий акроним для **L**ithographie, **G**alvanoformung, **A**bformung – рентгенолитография,

гальванопластика и формовка). X-Ray LIGA ($\lambda \approx 3 \text{ \AA}$) – это методика, которая для получения микроструктур использует синхротронное рентгеновское излучение [32].

В классической последовательности LIGA-процесс состоит из трех технологических этапов: глубокая рентгеновская литография, гальванопластика и формовка (штамповка) [33,34,35]. Толстый слой резиста, сформированный на проводящей подложке, облучается синхротронным излучением через маску. После проявления на подложке остаются полимерные формы, внутри которых электрогальванопластикой формируются металлические компоненты. После осаждения металлический микрорельеф можно отделить от подложки и использовать для массового тиражирования деталей литьем или штамповкой (Рис. 5). При использовании классической фотолитографии сложно достигнуть таких значений аспектного соотношения. В качестве резистов в LIGA-процессе обычно используются ПММА и SU-8, а материалами для металлизации подложек выступают никель, медь, золото, и сплавы, такие как кобальт-никель и железо-никель.

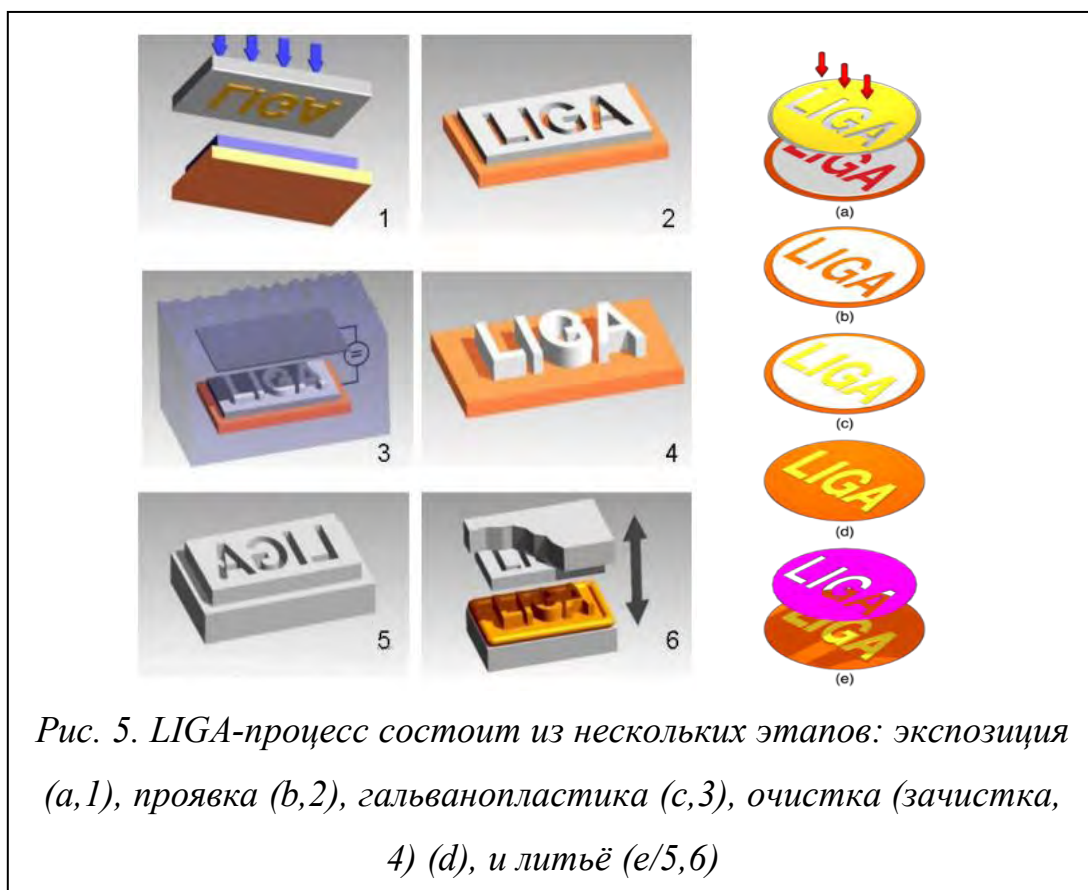
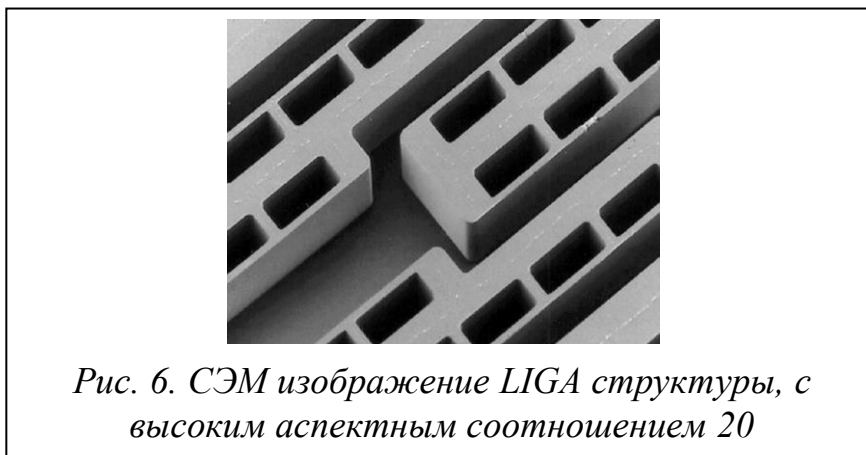


Рис. 5. LIGA-процесс состоит из нескольких этапов: экспозиция (a,1), проявка (b,2), гальванопластика (c,3), очистка (зачистка, 4) (d), и литьё (e/5,6)

На рисунке 6 показано изображение элемента полимерной LIGA-микроструктуры, полученного методом прессования, с глубиной в 120 микрон, а шириной самого маленького элемента – 6 мкм [36].



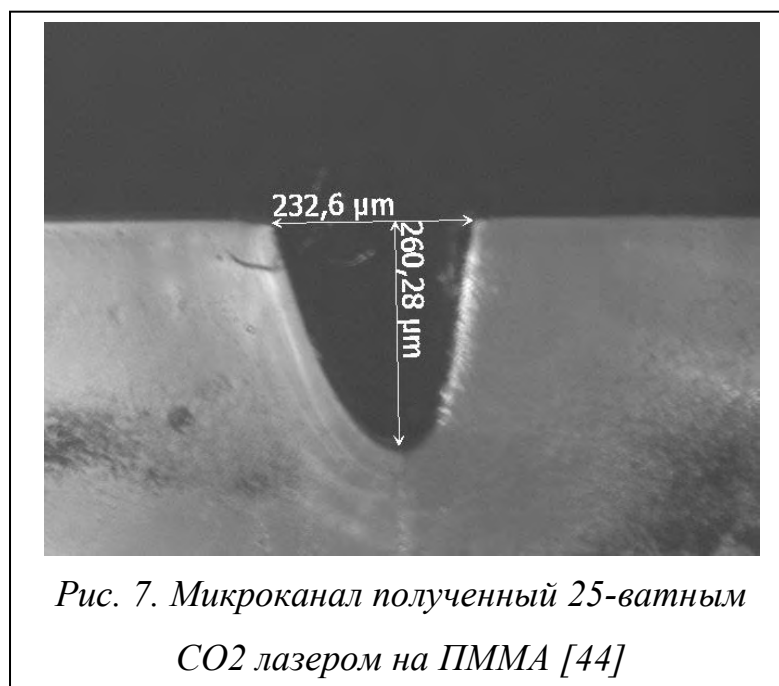
Несмотря на то, что посредством LIGA можно получать такие сложные элементы, как микрореакторы, ловушки для частиц, расщепители микропотоков и другие устройства, эта технологическая цепочка крайне затратна и сложна. Помимо источника рентгеновского излучения необходим ряд других установок, которыми оборудованы далеко не все лаборатории [37,38,39]. При этом, несмотря на сложности, связанные с использованием LIGA, иными методами литографии сложно создать структуры произвольного дизайна со столь высокими аспектными отношениями, параллельными стенками и низкой дефектностью [32].

Безмасочные методы

Вышеперечисленные методы относятся к дорогостоящим и требующим сложного оборудования технологиям. Существуют и более простые методы механической обработки поверхности и формирования микроразмерных каналов – лазерная абляция и гидроабразивная обработка.

Лазерная резка, в англоязычных источниках часто именуемая micromachining – широко применяющийся метод удаления вещества с поверхности лазерным импульсом. При низкой мощности углекислотного лазера (до 50 Вт), вещество испаряется или сублимируется в виде свободных молекул, атомов и ионов (лазерная абляция) [40,41,42]. Посредством этого метода можно быстро получать образцы с необходимой топологией на полимерных пластинах.

Некоторую сложность представляет создание данным методом каналов с требуемыми размерами и аспектным отношением. Геометрические параметры получаемых микроструктур зависят от таких характеристик лазера, как мощность, скорость пищащей головки и диаметров лазерного пучка/пятна, а так же от материала подложки и её температуры [43]. Характерная форма получаемых каналов – параболическая, а минимальные ширина и глубина составляют порядка сотни микрон. На рисунке 7 [44] представлен характерный канал полученный методом лазерной абляции на ПММА [45].



Такой вид механического воздействия на поверхность, как, **гидроабразивная обработка** (hydroabrasive treatment / water jet cutting) используется для работы с более твёрдыми, но более ломкими материалами, чем полимеры – керамика и стекло [46,47]. Вместо лазера, подложки обрабатываются струёй воды или иной жидкостью под высоким давлением, около 4000 атмосфер [46] (Рис. 8). Если воду под таким давлением пропустить через отверстие менее 1мм, то она потечет со скоростью, превышающую скорость звука в 3 – 4 раза. А с добавлением частиц абразива ее режущая способность возрастает в сотни раз, и она способна разрезать почти любой материал [48,49].

Этот метод используется наряду с методом лазерной абляции, в тех случаях, где не нужно высокое аспектное соотношение, а нужно быстро изготовить

необходимую структуру и получить опытную модель чипа. Гидроабразивная обработка, позволяет получать каналы порядка $100 \div 200$ микрон, с шероховатостью порядка десятков нанометров [50]. В основном, этот метод используют для работы с боросиликатным (химически стойким) стеклом, для создания многоразовых медико-аналитических устройств. Надо отметить, что, с точки зрения предельно допустимого разрешения и аспектного соотношения, холодная абразивная обработка мало чем отличается от лазерной абляции.



1.1.2. Материалы и способы их соединения

Как отмечено выше, МФ системы обычно представляют собой сэндвич-конструкции, и важным этапом является герметизация – послойный монтаж устройства.

Для соединения разных материалов используются разные методы. Обычно используется специальное оборудование – бондеры (установка для спайки пластин), многие модели которых позволяют несколько методов спайки: прямой бондинг, термический, анодный, адгезивный и реактивный [51]. Известны и примеры монтажа без применения специализированного оборудования. Так, на

рисунке 9 представлен микроканал в чипе из ПММА, пластины которого были соединены под давлением в конвекционной печи [44].



Рис.9. Спаянные термическим методом ПММА пластины

Поскольку метод соединения компонентов тесно связан с типом материалов, из которых изготовлено МФУ, эти аспекты (выбор материалов и способов их соединения) будут рассмотрены параллельно.

а) Кремний. Кремний является одним из основных материалов микроэлектроники [52], поэтому технологии его обработки сильно развиты и позволяют получать структуры микро- и нанометровых размеров любой сложности с необходимой точностью. Например, методом фотолитографии и жидкостного травления на кремниевых подложках могут быть сформированы структуры (каналы и микрореакторы) размером от единиц до сотен микрометров с шероховатостью порядка 50 нм [53].

Герметизация каналов и реакторов обработанных кремниевых пластин может быть осуществлена термическим бондингом (температура от 200 до 700°C) [53,54] и методом анодного связывания (при напряжении 250–1500 В) [54,55,56]. Также, хорошо изучены способы термического связывания кремний-стекло (пирекс) [57,58]. И несмотря на то, что использование пирекса позволяет задействовать методы оптического детектирования, как в случае изучения конечных продуктов кристаллизации белка, получить сквозное изображение (на просвет) не представляется возможным. Но его свойства полупроводника и

высокую теплопроводность можно использовать в разработке гибридных микрофлюидных систем с микроэлектронными компонентами [51].

Следует отметить, что использование технологических мощностей современных микроэлектронных предприятий, экономически оправданно лишь в случае необходимости массового выпуска МФУ.

б) Кварц и стекло. Эти материалы являются оптически прозрачными в широкой области спектра, что позволяет использовать оптические методы детектирования, в том числе и флуоресцентные. Следует также отметить широкий ассортимент марок стекол, который дает возможность выбора материала с требуемыми свойствами – жаро- и/или химическая стойкость. Технологии обработки кварца и стекол схожи с технологиями обработки кремния [59]. Коэффициент теплопроводности стекол ниже, чем у кремния, и лежит в интервале (0.51–1.28) Вт·м⁻¹·К⁻¹. Герметизация стеклянных микрочипов может быть осуществлена методами термического бондинга (при температуре 500–1050°C), анодного связывания (температура 70–500°C, напряжение 50–1200 В), склеивания полимерными композитами (в том числе, фотоотверждаемыми полимерами), методом глубокого оптического контакта (ГОК) и др. [59,60,61,62].

Встречаются конструкции гибридных чипов, в которых используются кремниевые пластины с микроканалами, а в качестве пластины-крышки используется стеклянная подложка, которые спаяны между собой методом анодного бондинга [63]. Существенным недостатком микрочипов, как на основе кремния, так и на основе кварца и/или стекла является их высокая стоимость. Поэтому такие микрочипы, обычно, многократно используются после специальных методов очистки – регенерации [64]. В случаях, когда необходимо однократное применение микрочипа или же создание опытного образца, более целесообразным является использование полимерных материалов.

в) Полимеры. В настоящее время в микрофлюидике наметилась устойчивая тенденция широкого применения полимерных материалов [63]. Наиболее применяемыми являются: полидиметилсилоксан (polydimethylsiloxane, PDMS), поликарбонат (polycarbonate, PC), полиметилметакрилат (poly(methylmethacrylate) PMMA), полиэтилентерефталат (poly(ethylene- terephthalate) PET), полиимид (polyimide, PI), SU-8, parylene C (poly(paraxylene)). Каждый материал обладает особыми свойствами и поэтому имеет свои преимущества и недостатки.

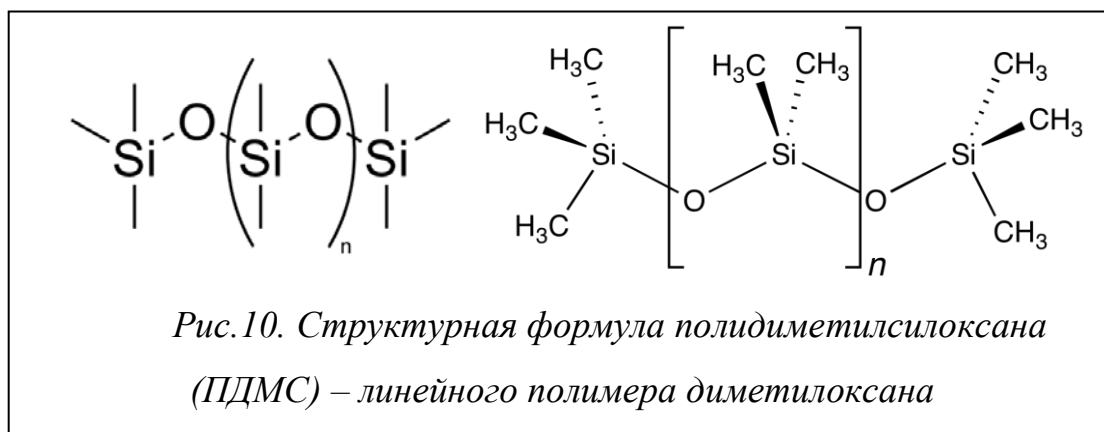
Полимеры стали широко использоваться не только из-за низкой стоимости материала, но ещё из-за дешевизны обработки, и, как следствие, низкой себестоимости изделий при массовом производстве. Эти качества позволяют использовать одноразовые МФЧ из полимеров для работы с биологическими пробами, химически активными материалами, радиофармпрепаратами и т.д. [65].

Более простыми (по сравнению с кремнием, керамикой и стеклами) являются и способы герметизации этих устройств и систем. Обычно используются способы термического связывания, но при значительно более низких температурах, чем в случае кремниевых и стеклянных материалов, склеивание полимерными композициями (в том числе и фото- или термотверждающими клеями), ламинирование и др. [66,67,68]. Полимеры обладают более низким, чем у стекла, коэффициентом теплопроводности ($0.1-0.3$) Вт·м⁻¹·К⁻¹, что необходимо учитывать при разработке конструкции микрочипа.

Рассмотрим особенности наиболее часто используемых полимеров:

Полидиметилсилоксан (ПДМС) – (наиболее часто используется марка Sylgard, производимый Dow Corning) относительно недорогой эластомерный материал, обладающий хорошей оптической прозрачностью и хорошей биосовместимостью, а так же устойчивостью к кислотам и щелочам (Рис. 10) [69]. Коэффициент теплопроводности – 0.17 Вт·м⁻¹·К⁻¹. ПДМС позволяет создавать простые и дешевые чипы однократного применения [70]. Однако его газопроницаемость в 15 – 20 раз превышает проницаемость натурального каучука,

поэтому использование ПДМС может привести к потерям биологического образца из-за взаимодействия с окружающей средой. В то же время, высокая газопроницаемость имеет и положительную сторону – ПДМС можно использовать для создания микрофлюидных устройств со «слепыми» каналами. Несмотря на отсутствия выхода, такой канал может быть полностью заполнен жидкостью, которая вытеснит газ при заполнении канала [71]. Адсорбционная способность может быть изменена путем добавления поливинилпирролидона (polyvinylpyr-rolidone, PVP) в реагенты [72,73]. Пористость ПДМС может быть устранена путем покрытия полимера пленкой парилена, имеющей низкую влагопроницаемость и долговременную температурную стабильность [74].



Полиметилметакрилат (ПММА/Оргстекло) (марки Perspex, Plexiglas, Асгума, ТОСП и др.). Основными преимуществами данного материала, относящегося к группе термопластов, является его коммерческая доступность и простота обработки. Микрофлюидные устройства на его основе могут быть изготовлены без применения дорогостоящего технологического оборудования (например, литографического и плазмохимического) или дорогостоящих химических реагентов для последующих процессов формирования микрофлюидных каналов. Например, методом лазерной абляции (гравировки) можно сформировать структуры, пригодные для ПЦР-амплификации [75]. Кроме того, данный материал является биосовместимым, достаточно прочным, устойчивым к большому количеству кислот, оснований и растворителей и обладает низким уровнем поглощения воды. Прозрачность ПММА в видимом диапазоне спектра позволяет проводить *in situ* наблюдение за процессами,

происходящими в микрофлюидном устройстве. ПММА пропускает ультрафиолетовое и рентгеновское излучения лучше, чем большинство видов стёкол (за исключением специальных УФ-прозрачных разновидностей), отражая при этом инфракрасное. Общее светопропускание оргстекла несколько ниже – 92–93 %, против 99 % у лучших сортов силикатного стекла.

Определенные проблемы для широкого применения ПММА создает низкая температура стеклования $T_g = 85\text{--}105^\circ\text{C}$. Кроме того, хоть ПММА и устойчив к ряду кислот, щелочей, масел, он неустойчив к действию спиртов (кроме изопропанола), ацетона и бензола. Коэффициент теплопроводности ПММА – $0.16\text{--}0.24 \text{ Вт}\cdot\text{м}^{-1}\cdot\text{К}^{-1}$.

Поликарбонат (ПК) (марки: Makrolon, Calibre, Lexan, Triplex). Этот полимер устойчив к спиртам и кислотам, имеет температуру стеклования ($125\text{--}150^\circ\text{C}$), обладает хорошей прозрачностью в широком спектральном диапазоне. Коэффициент теплопроводности ПК – $0.19 \text{ Вт}\cdot\text{м}^{-1}\cdot\text{К}^{-1}$. Выборочная биосовместимость различных видов поликарбонатов создает препятствия для широкого применения. Тем не менее, ПК успешно применяется для создания ПЦР-микрочипов [76,77,78].

Полимер SU-8 (IBM-Watson Research Center, Yorktown Height, USA) – негативный фоторезист, специально разработанный для микроэлектроники, в 1996 г. был адаптирован для применения в МЭМС (EPFL-Institute of Microsystems and IBM, Zurich). SU-8 – макромолекула, содержащая 8 эпоксидных групп. Может быть нанесен на подложку слоем толщиной до 2 мм. Методами стандартной УФ-литографии получено аспектное соотношение для формируемых структур (глубина/ширина) около 25. Может обрабатываться плазмохимическими методами, химическим травлением и т.д. Фоторезист устойчив к кислотам, щелочам, большинству растворителей. Температура стеклования 210°C . Этот материал нашел широкое применение при создании лабораторных микрофлюидных и МЭМС устройств [79,80].

В таблице 1 представлено сравнение характеристик некоторых полимерных материалов компании Dolomite, используемых в производстве МФУ и МФС (www.dolomite-microfluidics.com).

Таблица. 1. Сравнительная таблица характеристик материалов, используемых в производстве МФУ.

Параметр	Полимеры	Стекло
	Критерии эффективности	
Оптические свойства	Хорошие	Отличные
Механические свойства	Удовлетворительные	Очень хорошие
Химическая стойкость	Неудовлетворительная (в большинстве случаев)	Отличная
Температурные свойства	Неудовлетворительные	Очень хорошие
Эффективность затрат	Удовлетворительная – для прототипирования, отличная – для крупносерийного производства	Отличная – для прототипирования, удовлетворительная – для крупносерийного производства
Повторное использование	Как правило, одноразовые	Как правило, многоразовые
Срок службы	Удовлетворительный	Очень хороший

Диаграмма на рисунке 11 показывает, что наиболее широко в массовом производстве микрофлюидных устройств и систем используются полимеры, на которые приходится почти 50% рынка. Стоит обратить внимание на то, что они задействованы не во всех сферах. Так, например, занимая порядка 80% в разработке клинических и ветеринарных диагностических устройств, полимеры проигрывают в такой области применения как разработка адресной доставки лекарственных веществ (point drug delivery), в которой они задействованы лишь на 5% (кремний и стекло на 93%) [81]. В производстве микрореакторов для

химического синтеза и изучения кинетики реакций полимеры практически не используются – эту нишу разделили между собой кремний и боросиликатное стекло [63,82]. В то же время, в силу своего разнообразия, низкой стоимости и простоты обработки, полимеры широко используются при разработке прототипов различных МФС и МФУ.



1.2. Микрофлюидные устройства для изучения структуры белков

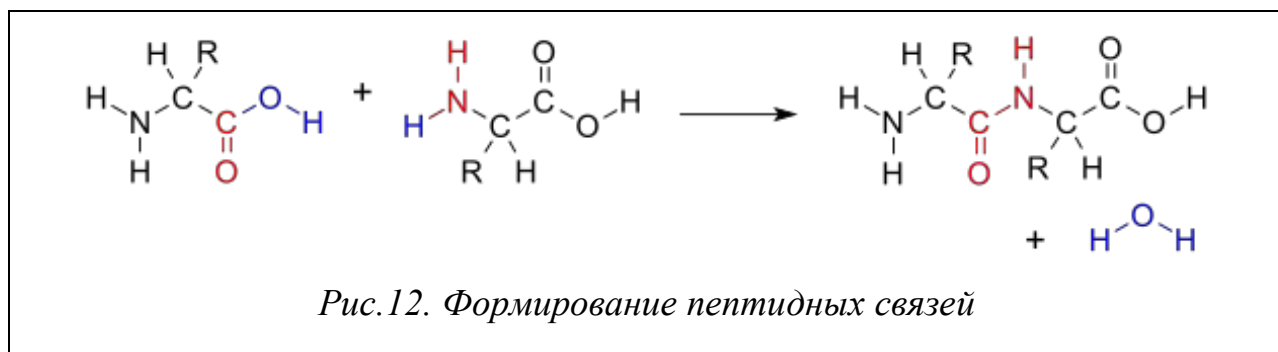
Кристаллизация белков и установление их структур являются одними из самых перспективных направлений в современной биомедицине [83,84]. Белковые молекулы играют основную роль в обмене веществ человека и других живых организмов. Свойства белков преимущественно определяются трехмерной структурой их молекул, установить которую можно с помощью рентгеноструктурного анализа [85], проводимого на белковых кристаллах. Проблемой структурных исследований белков состоит в том, что из всех известных белковых молекул на сегодняшний день кристаллизовать удалось лишь 5%. Микрофлюидные технологии открывают новые возможности для повышения эффективности кристаллизационных экспериментов. Ниже рассмотрены базовые

принципы анализа структуры белков, получения их кристаллов для этих целей, а также роль микрофлюидных технологий в этих направлениях.

1.2.1. Структура белковых молекул

Белки являются важнейшими функциональными и структурными элементами живых систем. Белки играют роль катализаторов буквально во всех биохимических реакциях, протекающих в живых организмах. Такое невероятное разнообразие функций реализуется простым исходным набором структурных элементов.

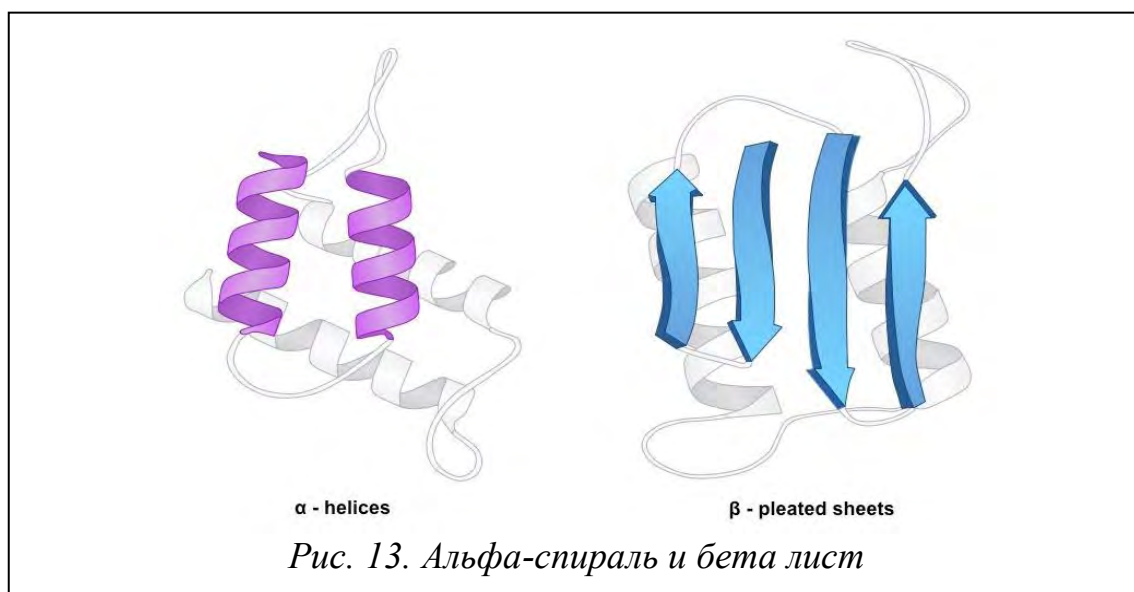
Строительными блоками для белков являются аминокислоты, которые представляют собой небольшие органические молекулы, состоящие из центрального атома углерода, связанного с аминной группой, карбоксильной группой, атомом водорода и варьирующимися компонентами, называемыми радикалами. Внутри белка множественные аминокислоты связаны друг с другом пептидными связями в длинные цепи. Пептидные связи формируются за счет биохимической реакции, в ходе которой аминная группа одной молекулы соединяется с карбоксильной группой другой с выделением молекулы воды (Рис. 12) [86]. Линейная последовательность аминокислот рассматривается как **первичная** структура белка.



Цепи протеиновых молекул собираются из набора, включающего всего 20 аминокислот (из 500, встречающихся в природе), каждая из которых имеет уникальный радикал. Радикалы различаются по своей химической активности. Половина протеиногенных аминокислот (10 из 20) составляют молекулы с неполярными электрически нейтральными радикалами. Прочие аминокислоты

обладают полярными и/или заряженными радикалами [86]. Химия радикалов аминокислот важна для структуры белка, поскольку радикалы могут образовывать связи друг с другом, создавая белковые молекулы определенной формы. Заряженные радикалы могут формировать ионные связи, а полярные – водородные. Гидрофобные радикалы взаимодействуют друг с другом посредством слабых Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий. Основная масса образующихся между радикалами аминокислот связей нековалентные. По сути, ковалентные связи способен формировать только цистеин. Таким образом, из-за связей между радикалами, порядок и положение аминокислот определяет, как будет изгибаться и складываться протеиновая цепочка [86].

Формирование связей между радикалами линейной цепочки полностью определяет уникальную трехмерную форму белка. Водородные связи между аминными и карбоксильными группами в соседних участках цепочки часто задают специфические регулярные белковые структуры – альфа-спирали и бета листы (Рис. 13), которые составляют **вторичную** структуру белка. Большинство белков содержат спирали и листы в сочетании с менее распространенными структурами. Общий ансамбль всех образований и свертываний белковой молекулы, состоящей из одной цепочки (полипептида), задает его **третичную** структуру – конформацию. Объединение нескольких полипептидов в конгломераты создает **четвертичную** структуру [86].



Свежесформированный белок обычно принимает наиболее выгодную с точки зрения общей энергии форму. Перед тем, как принять свою финальную форму, которая является уникальной, белки в процессе свертывания образуют разнообразные конформации. Свернувшиеся белковые молекулы стабилизируются тысячами нековалентных связей между аминокислотами. Вклад в форму протеиновой молекулы и ее стабильность вносят химические связи между белком и окружающей его средой. Например, белки, растворенные в цитоплазме клетки имеют гидрофильные химические группы на своей поверхности, в то время как гидрофобные элементы белка стремятся оказаться внутри. Напротив, белки, внедренные в мембраны клеток, выносят на свою поверхность гидрофобные части, особенно в участках, контактирующих с мембранными липидами. Важно отметить, что полностью свернувшиеся белки не являются статичными, и атомы в них могут совершать небольшие движения.

1.2.2. Методы исследования структуры белков

Поскольку конформация белка определяет его функции в биохимических реакциях, знание структуры протеиновых молекул является критически значимым. Первичная структура полипептида, то есть последовательность аминокислот в цепи, может быть определена с помощью стандартных методов секвенирования. Этого, однако, оказывается недостаточно для определения свойств большинства белков, поскольку их функции в большей степени определяются не последовательностью аминокислот в цепи, а общей трехмерной структурой. И, хотя первичная структура и определяет форму свернувшегося белка, установить конечную трехмерную конфигурацию протеиновой молекулы на основании порядка аминокислот в цепи зачастую оказывается невозможно из-за большого количества межмолекулярных взаимодействий.

Хотя белки рассматриваются как макромолекулы, они слишком малы, чтобы наблюдать их визуально даже с помощью микроскопа. В итоге, для изучения их структуры приходится использовать непрямые подходы. Наиболее распространенным методом изучения структуры белков является

рентгеноструктурный анализ [87]. В данном методе кристаллы очищенных белков помещаются под рентгеновский пучок, а возникающая при этом дифракционная картина используется для определения позиций атомов в кристалле [88]. РСА использовался для получения структуры порядка 90% расшифрованных белков. Структура около 9% белков была установлена с помощью ядерного магнитного резонанса (ЯМР). Для изучения больших белковых комплексов возможно использование криогенной электронной микроскопии, которая по максимальному разрешению догоняет ЯМР и РСА.

Для рентгеноструктурного анализа белка важно не просто получить кристалл, но и вырастить его достаточной величины, так как интенсивность рентгеновской дифракционной картины приблизительно пропорциональна объему кристалла и обратно пропорциональна объему элементарной ячейки. Как правило, для качественной дифракционной картины, достаточной для установления основных параметров ячейки, необходим кристалл размером порядка 0.1 мм (не менее 80 мкм, для лизоцима) по всем направлениям (Рис. 14).



Рис. 14. Кристалл белка в растворе

Из-за особой роли белков в функционировании живых систем, сотни лабораторий в самых разных странах мира занимаются исключительно вопросами кристаллизации протеиновых молекул [89]. Информацию об уже кристаллизованных структурах белков можно найти в «Банке Данных Белка» (Protein Data Bank) [90].

1.2.3. Общие принципы получения кристаллов белков

Кристаллизация обычно проводится при температурах от +4 и до +20°C и используются белковые растворы с чистотой не менее 90%. Рост кристаллов белков осуществляют из газовой или жидкостной фазы. В обоих случаях можно выделить три стадии процесса кристаллизации: зародышеобразование, рост кристаллов, и прекращение роста с достижением равновесия. Для проведения успешной кристаллизации необходимо создать такие условия и факторы, которые приводят к образованию зародышей, а также способствуют росту малого числа крупных кристаллов [91].

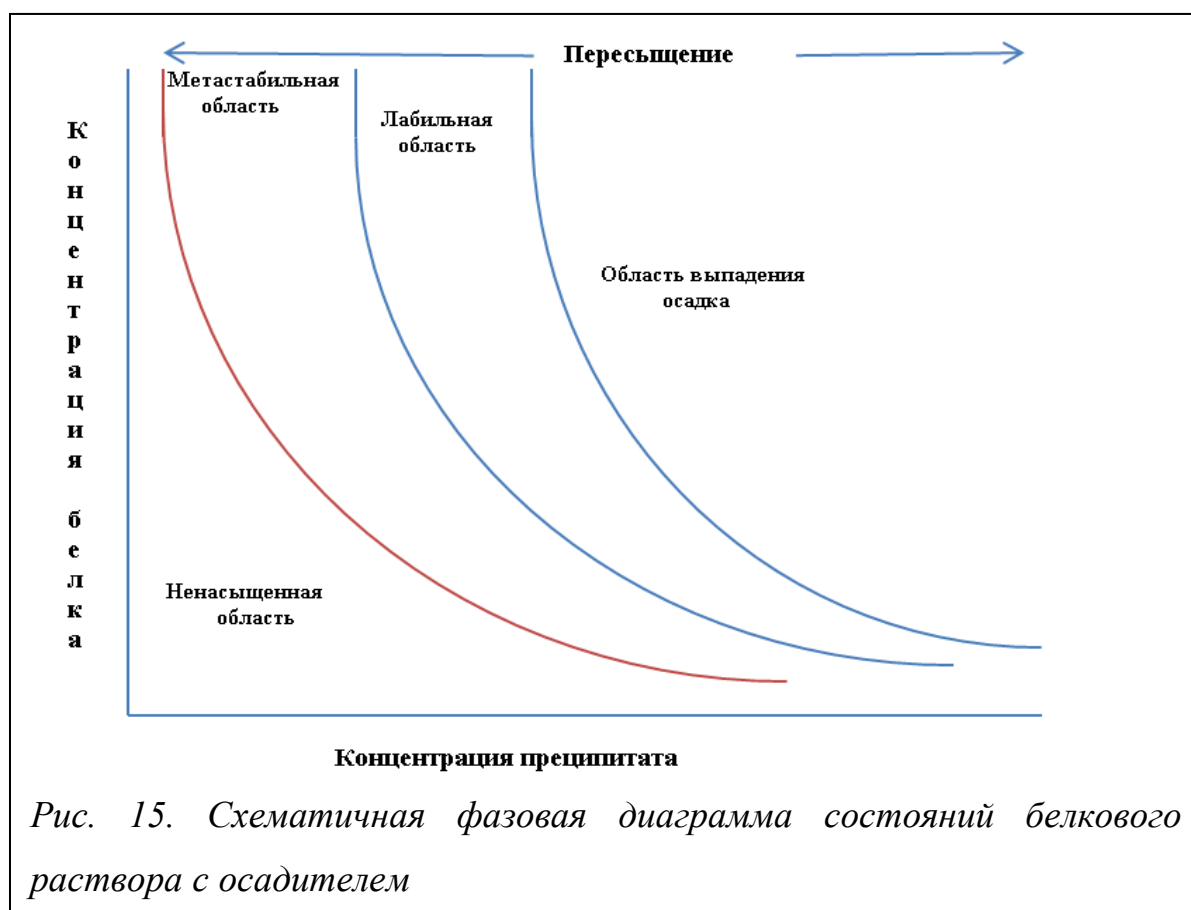
Процессы кристаллизации обычно проводятся в условиях пересыщения [91]. Пересыщение — это избыточная концентрация вещества, содержащегося в растворе или паре, сверх растворимости, то есть сверх концентрации, соответствующей насыщенному раствору или насыщенному пару при заданных условиях. Пересыщение задается формулой $s = (n/n_{\infty} - 1)$, где n — концентрация растворенного вещества, а n_{∞} — концентрация вещества в насыщенном растворе при заданных условиях.

Интуитивные соображения подсказывают, что выпадение кристаллов должно начинаться при бесконечно малых пересыщениях. На практике же, при слабых пересыщениях спонтанного зародышеобразования кристаллов не происходит, и рост протекает исключительно на присутствующих в растворе зернах зародышеобразования [91]. Существует некоторое конечное значение пересыщения, ниже которого вероятность образование зародышей твердой фазы практически равна нулю, а в его окрестности резко возрастает. При дальнейшем повышении пересыщения число зародышей возрастает лавинообразно, и растворенное вещество выпадает в осадок. Такое граничное пересыщение называется *критическим*.

Состояние критического пересыщения может быть достигнуто за счет повышения температуры раствора. К сожалению, нагрев в большинстве случаев не может быть использован для создания условий пересыщения в растворах белковых молекул, поскольку их третичная структура денатурирует при

повышении температуры. По этой причине для создания пересыщений используют специальные вещества – преципитаты (осадители), которые будучи в растворе белка резко снижают его растворимость. В качестве осадителей, обычно, используют хлорид натрия, сульфат аммония, полиэтиленгликоль (ПЭГ) и органические растворители [92].

На рисунке 15 представлена схематичная фазовая диаграмма, на которой показаны различные состояния белкового раствора с осадителем. Отображены ненасыщенная область, в которой зарождение кристаллов и их рост отсутствуют, метастабильная зона, где критическое пересыщение еще не достигнуто, лабильная зона, где спонтанно появляются кристаллы и зона высокого пересыщения, где происходит выпадение осадка.



Как видно на представленной диаграмме, постепенное добавление осадителя в раствор приводит к образованию пересыщенного раствора белка и выпадению кристаллов. С увеличением степени пересыщения скорость образования зародышей возрастает, но, чтобы уменьшить число зародышей, степень пересыщения должна быть как можно более низкой.

При кристаллизации обычно возникают две проблемы: во-первых, достижение точки пересыщения, при которой образуются кристаллы, а во-вторых, выращивание кристаллов достаточной для рентгеноструктурного исследования величины [93].

1.2.4. Факторы, влияющие на кристаллизацию белков

Обычно требуется тщательное изучение условий кристаллизации конкретного белка: рН (водородный показатель), концентрации белка, осадителя и других параметров. Скорость образования зародышей, число и размеры кристаллов, образующихся при определенном комплексе условий (величина рН, растворитель, температура, ионная сила и т.п. [93]), зависят от присутствия в растворе посторонних частиц, размеров и формы сосуда, концентрации и степени пересыщения раствора белка. Варьируя физические (температура, давление, вибрация), химические (рН, преципитат и его концентрация, ионная сила, концентрация белка) и биохимические (чистота растворов) параметры, можно менять состояние раствора вплоть до насыщения или пересыщения [94,95,96].

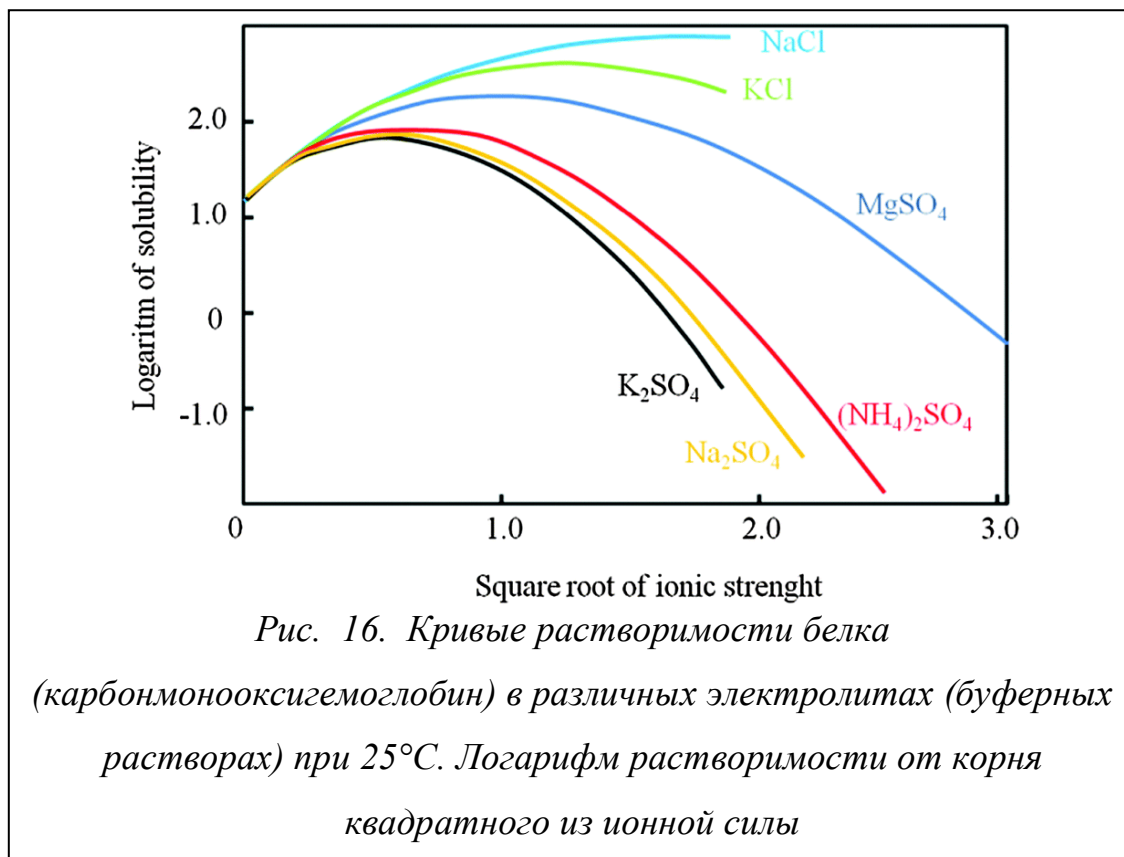
Ионная сила (раствора)

Ионная сила раствора — мера интенсивности электрического поля, создаваемого ионами в растворе (сила зависит от основы электролита, например, фосфаты, сульфаты, цитраты, хлориды и т.д.). По мере увеличения концентрации ионов в растворе, вокруг каждого иона стремится образоваться «зона» из ионов противоположного знака. Эта ионная область изменяет характер взаимодействия ионов с молекулами воды и, следовательно, изменяет и растворимость [93]. При *низких концентрациях солей* влияние ионного облака *вызывает увеличение растворимости белка*, поскольку оно увеличивает вероятность благоприятных взаимодействий с молекулами воды.

Увеличение растворимости при низких значениях ионной силы, свойственное большинству ионов, обычно наблюдается и для белков, которые в присутствии небольшого количества электролита (солевого раствора) более растворимы, чем в чистой воде. Это явление носит название «всаливание».

При увеличении ионной силы, ионы начинают конкурировать друг с другом и с растворимым веществом за окружающую воду. Вызванное этим удаление молекул воды из растворимого вещества приводит к **уменьшению растворимости белка** (Рис. 16).

Эффект уменьшения растворимости при высоких значениях ионной силы получил название «высаливание». Это явление свойственно всем растворимым в воде частицам – ионам, органическим молекулам, газам и белкам [97].



В целом, растворимость белка тем выше, чем больше его суммарный заряд. Белок имеет наименьшую растворимость, когда его общий заряд равен нулю.

Величина pH

Водородный показатель – важный элемент буферных смесей, от него так же зависит показатель растворимости. Величина pH буферного раствора сильно зависит от его состава. Существуют три вида таких составов: слабая кислота и её соль с сильным основанием, слабое основание и его соль с сильной кислотой или же кислая соль и средняя соль слабой кислоты с сильным основанием [98]. Вот диапазоны значений для некоторых буферных растворов при температуре 20°C:

ацетатный буфер (3.8–6.3 рН), аммонийный/аммиачный буфер (8–10 рН) и карбонатный буфер (9.2–11 рН).

К сожалению, нельзя заранее предсказать требуемые значения показателя рН, так как для различных белков требуются различные буферные растворы, где в свою очередь, в зависимости от способа кристаллизации подбирают рН в заданном диапазоне.

Температура

Как было показано выше, температура существенно влияет на показатель растворимости. Однако стоит отметить, что температурный коэффициент растворимости изменяется от белка к белку, а также при изменении таких параметров, как ионная сила и присутствие органических растворителей. То есть при *высокой ионной силе* большинство белков менее растворимы при 25°C, чем при 4°C, а иногда белки имеют минимальную растворимость около 25°C. При *низкой* же – растворимость увеличивается с повышением температуры.

Таким образом, крайне сложно сделать обобщение о зависимости растворимости белков от температуры, потому что белковый раствор к состоянию насыщения может привести как повышение, так и понижение температуры.

Органические растворители (осадители)

Добавление органических растворителей также приводит к заметным изменениям растворимости белков в водных растворах. В присутствии значительных количеств органического растворителя, растворимость белка обычно уменьшается с понижением температуры. Органические растворители часто денатурируют белки, и это влияние следует свести к минимуму, работая при низких температурах.

Наиболее распространенный осадитель (преципитат) – это этанол, но часто его заменяют ацетоном, в связи с его более мягким воздействием на раствор, но не стоит забывать, про высокую летучесть данных растворителей. Поэтому в итоге гораздо чаще используют менее летучие растворители, смешивающиеся с

водой – 2-метилпентадиол-2,4 (МПД), диметилсульфоксид, диметилформаид, ацетонитрил и другие.

1.2.5. Методы кристаллизации белков

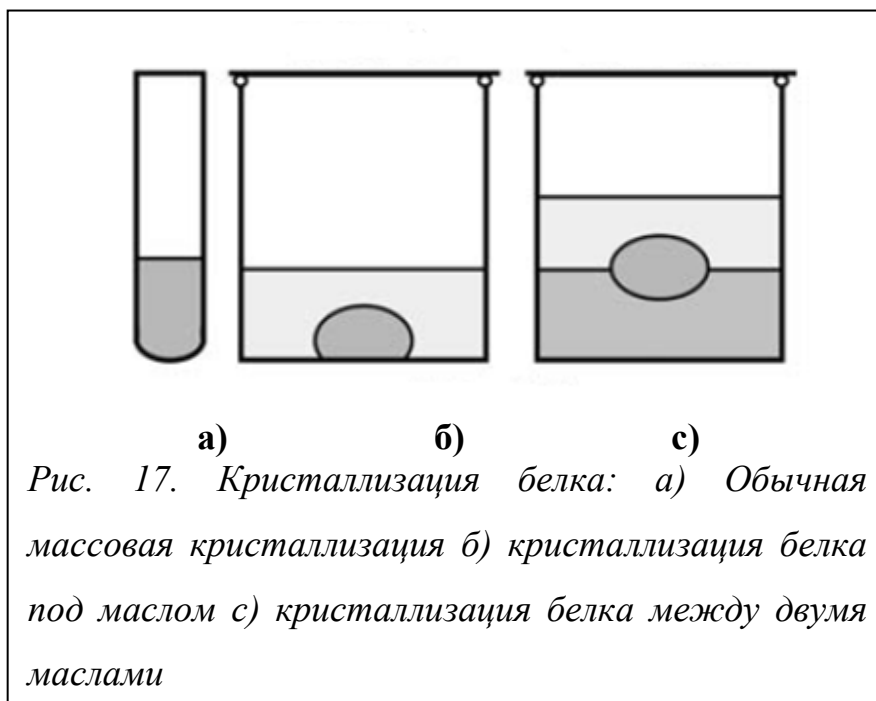
Выше были рассмотрены параметры, варьированием которых раствор белка можно привести в состояние слабого пересыщения, способствующие образованию малого количества зародышей и росту крупных кристаллов. Далее будут описаны методы, которыми достигаются благоприятные для формирования кристаллов условия.

Объемная кристаллизация(batch)

Объемная кристаллизация – это наиболее простой метод из существующих (Рис. 17) [99], который состоит в смешивании раствора макромолекул с преципитатом. Кристаллизация может осуществляться в каплях, которые помещаются в масло для предотвращения испарения, изменения концентрации компонентов в микрокаплях и ограничения от воздушных загрязнений (например: парафиновое масло низкой плотности). Таким образом, кристаллизационные капли, которые намного плотнее, чем масло, остаются под ним защищенными. Процесс кристаллизации занимает 1 – 3 недели [100]. В дальнейшем этот метод был адаптирован для кристаллизации белков в виде капель, взвешенных между двумя слоями масла. Благодаря такому усовершенствованию контакт между маточным раствором и твердой поверхностью контейнера отсутствует, что приводит к уменьшению числа зародышей и образованию более крупных кристаллов [101].

Существует частный случай «объемной/серийной» кристаллизации – микропорционный (microbatch). Это метод, при котором все компоненты напрямую собраны в единый перенасыщенный белковый раствор, который в течение всего эксперимента остается изолированным от окружающей среды. Эта технология может быть миниатюризирована посредством формирования микрокапель с раствором, помещенных в инертное масло [102]. Масло, в свою очередь, предотвращает выпаривание образца или же не даёт высохнуть и

деформироваться уже сформированному кристаллу. Два важнейших преимущества данной методики – малый расход раствора и практически полное отсутствие возможности загрязнения образцов [103].



Методы диффузии паров

Используются две разновидности метода диффузии паров: метод «висящей капли» и метод «сидящей капли». Обе разновидности метода имеют один принцип кристаллизации и отличаются только расположением капли относительно раствора осадителя. В первом методе раствор белка помещают над резервуаром с осадителем, а во втором - раствор белка помещают на пьедестал, возвышающийся над резервуаром с осадителем. Эти два метода подразумевают манипулирование условиями в белковых растворах путем диффузии через воздух [99,103].

Рассмотрим более подробно метод «висящей капли» (Рис. 18). В этом случае, капля раствора белка, содержащего предпороговую концентрацию преципитата, помещается на внутреннюю сторону поверхности, закрывающей резервуар, в котором находится более концентрированный раствор осадителя. Благодаря испарению воды из менее концентрированного раствора в капле в более концентрированный раствор в резервуаре, концентрация преципитата в

капле медленно нарастает. Это приводит к выпадению и росту кристаллов. Время формирования кристаллов составляет от нескольких дней до одного месяца.

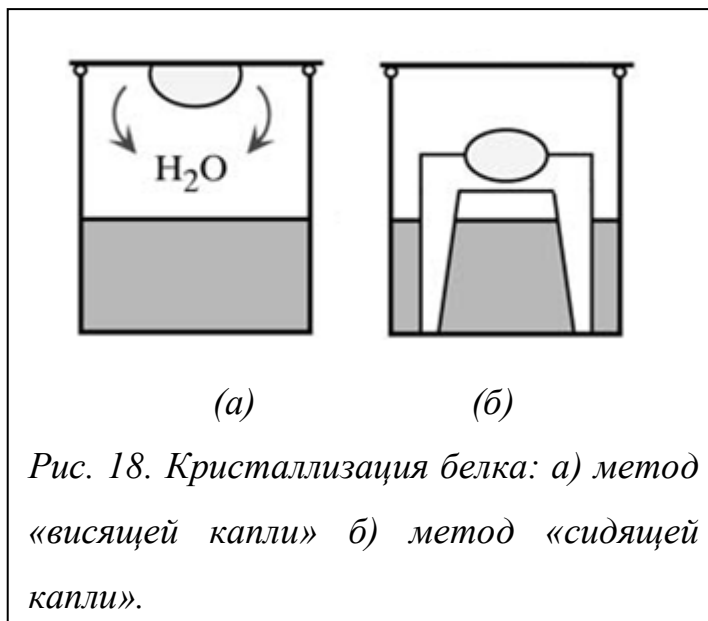


Рис. 18. Кристаллизация белка: а) метод «висящей капли» б) метод «сидящей капли».

Равновесный диализ

Систем для кристаллизации белка посредством микродиализа существует множество [91,92]. Сам процесс происходит за счет отделения макромолекул от общего объема растворителя при помощи полупроницаемой мембраны (Рис. 19). Полупроницаемая мембрана пропускает низкомолекулярные вещества, но не пропускает высокомолекулярные вещества (макромолекулы). Обычно используют диализный мешочек, представляющий собой диализную мембрану, который погружают в подходящий буфер с преципитатом. Первоначально в диализной мембране содержится раствор белка. Постепенно концентрация диализирующего вещества в диализируемой жидкости и в наружном растворе становится одинаковой. Плавно изменяя состав наружного раствора можно постепенно подходить к состоянию пересыщения, требуемого для зарождения и роста кристаллов.



Кристаллизация порциями

Кристаллизация порциями – это классический метод, в котором осадитель добавляют малыми порциями, медленно доводя раствор до состояния пересыщения [92]. Выпавшие кристаллы можно вновь растворить обратным изменением условий в сосуде. Таким образом, можно проводить несколько попыток кристаллизации.

Микродиффузия (свободная и встречная)

Микродиффузионные капилляры/ячейки изготавливаются, как правило, из стекла или плексигласа. Раствор белка вводят в капилляр (ячейку), на одном из выводов которого находится полупроницаемая мембрана. Второй конец капилляра закрывается тонкой парафинированной лентой или парафилмом, и ячейку погружают в подходящий для эксперимента буферный раствор (Рис. 20).

Важной особенностью метода **встречной диффузии** через раствор вязкого буфера, используемого при выращивании кристаллов в капиллярах, является то, что в отличие от классического метода висячей или сидячей капли этот метод дает возможность изучения большого ряда условий кристаллизации в одном единственном эксперименте, поскольку концентрация осадителя меняется вдоль капилляра. Таким образом, этот эксперимент эквивалентен проведению большого числа опытов с висячей каплей. Кроме того, процесс кристаллизации все время направлен в сторону равновесия и поэтому эксперимент встречной диффузии сам

по себе ищет оптимальный сценарий кристаллизации. И, наконец, нет необходимости проверять кристаллы в разных каплях для поиска кристаллов с более высоким качеством. В эксперименте встречной диффузии самыми лучшими кристаллами являются те кристаллы, которые образовались в местах, далеких от точки раздела между протеином и осаждающим раствором [104].

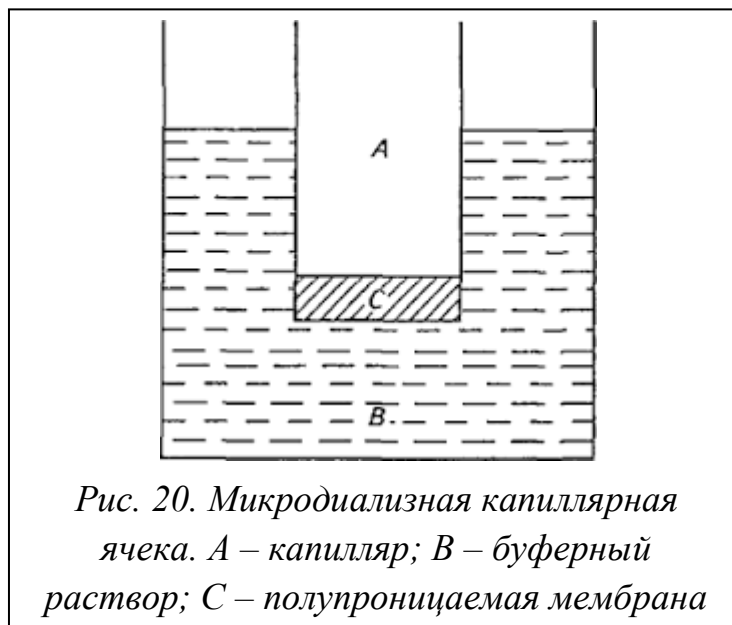


Рис. 20. Микродиализная капиллярная ячейка. А – капилляр; В – буферный раствор; С – полупроницаемая мембрана

Кристаллизация белка в условиях микрогравитации

Известно, что белковые кристаллы более плотные, чем основной кристаллизационный раствор, так что основными преимуществами кристаллизации белка в условиях микрогравитации являются устранение седиментации кристаллов, и сведение к минимуму конвективных потоков [105,106]. Ведь они вероятны из-за зон истощения и создания локальных областей уменьшения пересыщения вокруг растущих кристаллов белков, а также приводит к локальным повышениям температуры, которые вызывают уменьшение растворимости и инициирует образование нежелательных зародышей. Кристаллизация белка в условиях микрогравитации позволяет кристаллам расти путем диффузионного переноса.

1.2.6. Начальные стадии кристаллизации и способы их исследования

Эксперименты по кристаллизации обычно требуют большого числа опытов для установления оптимальных условий роста кристаллов. Кроме того,

формирование белковых кристаллов – длительный процесс, и неудачные попытки приводят не только к потере исследовательского белкового материала, но и времени.

В подобной ситуации желательно иметь критерии, которые позволяют предсказать итог кристаллизационного эксперимента на начальных стадиях. По этой причине одной из центральных проблем биологической кристаллографии сейчас является более точное понимание процесса зарождения белкового кристалла [107].

Недавно был предложен новый подход, который может существенно облегчить поиск оптимальных условий кристаллизации. Он основан на анализе структуры предкристаллизационных зародышей белка и выделении возможных олигомеров, которые могут являться “строительными элементами” белкового кристалла [108]. При этом, в литературе давно обсуждается возможность образования в растворе кластеров, влияющих на зародышеобразование и рост кристалла [109]. Определяя экспериментально наличие образования такой предкристаллизационной фазы можно уже в первые десятки минут определять наиболее подходящие условия для роста кристаллов.

Наиболее перспективным экспериментальным методом исследования органических наноразмерных структур в растворе, является метод малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР) [110]. Малоугловое рассеяние – когерентное диффузное рассеяние монохроматических рентгеновских лучей и нейтронов вблизи первичного луча на аperiодических флуктуациях электронной плотности в материалах. Источниками рентгеновского излучения являются рентгеновские трубки (длина волны излучения $\lambda = 0.1\text{--}0.2$ нм) и синхротронное излучение ($\lambda = 0.03\text{--}0.35$ нм). Монохроматичность узкого пучка первичного излучения достигается с помощью специальных коллимационных систем. Проходя сквозь образец, пучок рассеивается и регистрируется при помощи детекторов. Размер и форму частиц находят на основе зависимости интенсивности рассеянного излучения от угла рассеяния.

Наличие в полидисперсной системе равномерно распределенных неоднородностей, размеры которых лежат в диапазоне от 1 до 100 нм, приводит к рассеянию рентгеновских лучей под малыми углами (меньше 30°). При исследовании зависимости интенсивности рассеянного излучения от угла рассеяния можно определить такие характеристики наноразмерных элементов, как их форма и размер, фазовый состав, внутренняя структура, ориентация и распределение.

Применение метода МУРР позволяет определить форму и распределение различных олигомеров в растворе белка, а также сопоставить структуру полученных олигомеров со структурой кристалла. В настоящее время метод МУРР является одним из наиболее эффективных дифракционных методов экспериментального исследования органических наноструктур в растворах. Важнейшей особенностью метода малоуглового рассеяния является возможность анализа внутренней структуры разупорядоченных систем. Зачастую его применение – единственный способ получения структурной информации о системах с хаотическим распределением неоднородностей плотности [111].

Метод МУРР позволяет изучить поведение отдельных белковых молекул в растворе на самых ранних стадиях процесса кристаллизации, когда в растворе еще нет упорядоченных кластеров молекул [112]. Зная, как происходит процесс зародышеобразования, можно разрабатывать методики контролируемого роста белковых кристаллов.

Пока что большинство работ по исследованию процесса кристаллизации проводилось на модельных белках, таких как лизоцим. В недавних исследованиях на примере белка лизоцима было показано, что уже в первые десятки минут после создания условий кристаллизации и добавления осадителя к раствору белка происходит образование предкристаллизационной фазы: белковые молекулы организуются в октамеры. При этом, чем выше доля октамеров, образовавшихся в растворе, тем быстрее происходит выпадение кристаллов белка [113,114].

1.2.7. Микрофлюидные системы для кристаллизации белков.

Основные достижения белковой кристаллографии в последние десятилетия связаны с уменьшением размеров всевозможных устройств и улучшением их технологических характеристик. Вместо кристаллизации белка в относительно больших объемах (несколько микролитров), исследователи перешли на луночные планшеты, в которых можно создавать сотни микрореакторов с разными условиями кристаллизации в них. Весь процесс в таких системах в настоящее время полностью автоматизирован [83,88,115]. Многие компании, такие как Hampton Research (www.hamptonresearch.com), Corning (www.corning.com), Greiner Bio-One (www.greinerbioone.com) и др. поставляют все необходимое для кристаллизации оборудование и реагенты.

В 2007 году в России начались эксперименты по кристаллизации белка в капиллярах «JAXA-PCG» в условиях микрогравитации с использованием японского оборудования для кристаллизации белков PCRF. Полученные результаты показали, что в космосе удастся получить структуры более совершенные, чем до этого удавалось на Земле.

Автоматизированные системы кристаллизации позволили существенно повысить продуктивность кристаллизационных экспериментов, однако очевидным их недостатком является высокая стоимость. Для определенных направлений, например кристаллизации в условиях космической микрогравитации, проблемой становятся их массогабаритные характеристики.

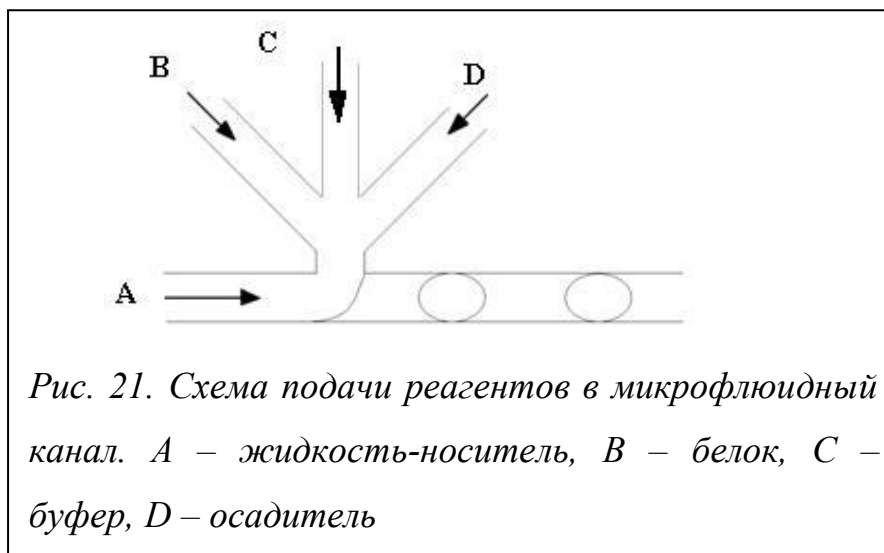
Внедрение микрофлюидного подхода можно рассматривать как следующую ступень развития эффективных методов кристаллизации белков. Многие ведущие компании (такие как, Hitachi, Agilent Technologies, Dolomite и др.) фокусируют свое внимание на успехах микрофлюидики, они финансируют исследования в этом направлении, так как новые технологии позволяют им достичь принципиально новых результатов. Коммерческая привлекательность МФС увеличивается, особенно в странах Европы. Многие научные издания публикуют статьи на эту тему (Science, Nature, Chemical Society Reviews, Biosensors &

Bioelectronics), существуют и специализированные журналы (Lab on a Chip, Microfluidics and Nanofluidics, Biomicrofluidics).

В основе микрофлюидного кристаллизатора лежит идея о создании в протяженном микроканале большого числа капель-микрореакторов, в которых реализуются условия для кристаллизации белковых молекул, разделенных между собой жидкостью-носителем, которая не смешивается с содержимым микрореакторов. При этом, различное соотношение буферного раствора, белка и осадителя в каплях-микрореакторах создается за счет точного управления потоками жидкостей, поступающих в микрокапиляры из автоматически управляемых шприцевых насосов.

L. Li и D. Mustafi предложили удобное и простое микрофлюидное устройство, подходящее для кристаллизации белка [102]. Конструкция имеет 4 входа и 1 выходное отверстие (Рис. 21). В эксперименте готовятся водные растворы белка, осадителя и буферный раствор. Каждый из растворов подается с помощью шприцевых насосов через отдельный вход, и смешиваются внутри микрофлюидного чипа. Через еще один вход подается жидкость-носитель.

Смесь водных растворов непрерывно поступает в текущий поток жидкости-носителя (А). За счет отсутствия смешивания жидкости-носителя и остальных растворов образуются капли, представляющие собой микрореакторы, в которых происходят зарождение и рост кристаллов. Рабочий канал такого устройства может содержать сотни микрореакторов, в которых концентрация компонентов (белка и осадителя) различается в результате подачи большего или меньшего количества белка и преципитата. Авторами приведенной выше работы в одном канале было создано 1000 микрореакторов объемом 50–150 нл с 20 различными вариациями концентраций.



Приведенная работа, как и многие другие, показывает, что МФУ достаточно простой конструкции открывают принципиально новые возможности для исследования процессов кристаллизации белков, в числе которых уход от дорогих автоматизированных систем и снижение расхода белкового материала.

Заключение

По итогам анализа литературы, посвященной созданию МФУ и одной из важнейших областей их применения – изучение процессов кристаллизации белков – можно сделать следующие выводы:

– Технологии создания МФУ отличаются широким разнообразием и позволяют формировать изделия с практически произвольной топологией. При этом многие подходы, используемые на сегодняшний день, целесообразны только при массовом выпуске МФУ и не приспособлены под выпуск единичных устройств для научных исследований из-за высокой стоимости оборудования и трудоемкости процессов.

– Критическими этапами формирования МФУ являются изготовление микроканалов и соединение компонентов устройства в герметичную систему. Одним из самых доступных способов формирования каналов является лазерная абляция, которую можно осуществить на относительно недорогих лазерных граверах. Такой метод профилирования подразумевает использование полимерных материалов. При этом, дополнительным преимуществом полимеров

является возможность соединения изготовленных из них частей МФУ доступными экономичными средствами, например, термической спайкой.

– В области кристаллизации белков микрофлюидные технологии уже стали играть значительную роль благодаря тому, что позволяют проводить серии кристаллизационных экспериментов с использованием простого лабораторного оснащения и при минимальных затратах исследуемого материала – белка. Подобными работами занимаются многие исследовательские коллективы по всему миру, что показывает актуальность разработки простых и доступных способов изготовления МФУ. Особый интерес представляет использование микрофлюидных кристаллизационных систем для изучения кристаллизации протеиновых молекул в условиях невесомости. Компактное микрофлюидное устройство является альтернативой современным роботизированным автоматическим кристаллизаторам, массогабаритные характеристики и принцип работы которых не позволяют использовать их на орбите.

Что касается исследования предкристаллизационной фазы, то на настоящий момент методики исследования растворов белков МУРР требуют затрат большого количества раствора, так как для работы с капилляром необходимо предварительное смешивание белка с осадителем в определённой концентрации. А это в случае работы с редким, дорогим белком очень критично, такой расход вещества неэффективен, так как нет гарантии положительного исхода эксперимента. Так же, работа с кристаллизационным капилляром не позволяет проводить *in situ* исследований, то есть не даёт возможности отслеживать влияние изменения условий кристаллизации на процессы, происходящие в растворе. Подобные недостатки стандартных систем могут быть устранены с использованием даже простейших МФУ.

Использование микрофлюидных технологий позволяет оперировать с очень малыми количествами анализируемого вещества, кроме того, использование микрофлюидной ячейки, с системой шприцевых насосов для подачи анализируемых растворов, позволяет осуществлять очень точный контроль количества растворов белка, подаваемых в ячейку, для проведения *in situ* анализа.

2. Методическая часть

В данной главе представлены основные экспериментальные методики и оборудование, использованные в исследованиях. В разделе 2.1. приведено описание ПММА – материала, использованного в работе для изготовления МФУ. В разделе 2.2. представлено описание методов и оборудования для формирования МФУ. В Разделе 2.3. описаны аналитические методики, привлекавшиеся для изучения и контроля свойств и параметров МФУ на разных стадиях исследования. В разделе 2.4. описаны экспериментальные методы и аппаратное оснащение, использовавшиеся в процессе разработки и тестирования МФУ для изучения кристаллизации белков.

2.1. Материал

Все разрабатываемые МФУ изготавливались из литого полиметилметакрилата $[-CH_2C(CH_3)(COOCH_3)-]_n$ (оргстекло) производства фирмы ACRYMA (Рис. 22).

Оргстекло получают двумя способами: экструзией и литьём. Сам способ производства накладывает ряд ограничений и определяет некоторые свойства пластика. Экструзионное оргстекло — от англ. *extrusion*, от нем. *Extrudiert* — получают методом непрерывной экструзии (выдавливания) расплавленной массы гранулированного ПММА через щелевую головку с последующим охлаждением и резкой по заданным размерам. Блочное (в России утвердился термин «литьевое» — англ. *cast*) — получают методом заливки мономера ММА между двумя плоскими стёклами с дальнейшей его полимеризацией до твёрдого состояния.



Рис. 22. Полиметилметакрилат (ПММА), Органическое стекло (оргстекло) — синтетический полимер метилметакрилата, термопластичный прозрачный пластик

Сравнение боросиликатного стекла и ПММА

- ПММА легче: его плотность (1190 кг/м^3) приблизительно в два раза меньше плотности обычного стекла;
- ПММА более мягок, чем обычное стекло и чувствителен к царапинам (этот недостаток исправляется нанесением стойких к царапинам покрытий);
- ПММА может быть легко деформирован при температурах выше $+100^\circ\text{C}$, при охлаждении приданная форма сохраняется;
- ПММА легко поддаётся механической обработке обычным металлорежущим инструментом;
- ПММА лучше, чем неспециальные, разработанные с этой целью виды стёкол, пропускает ультрафиолетовое и рентгеновское излучения, отражая при этом инфракрасное; светопропускание оргстекла несколько ниже (92—93% против 99% у лучших сортов силикатного);
- ПММА неустойчив к действию спиртов, ацетона и бензола.

2.2. Комплекс методов и оборудования для создания МФУ

Лазерный гравер

Основные эксперименты, по созданию опытных образцов МФУ и их функциональных элементов, проводились методом лазерной абляции, на лазерном гравере VersaLaser VLS 3.50.

Лазерная абляция – метод удаления вещества с поверхности лазерным импульсом. При низкой мощности лазера вещество испаряется или сублимируется в виде свободных молекул, атомов и ионов.

Лазерный гравер VLS 3.50 оснащен инфракрасным импульсным CO₂ лазером, с мощностью в 50 Вт и длиной волны 10.6 микрон (ИК диапазон) (Рис. 23). Стандартная двухдюймовая линза, применяемая в CO₂-лазерах, позволяет фокусировать луч в точку диаметром 0.075 мм (75мкм). Основными рабочими параметрами гравера, являются, мощность (% от максимальной мощности), скорость «пишущей» каретки (% от номинала) и разрешающая способность (PPI, точка на дюйм). Мощность (P) изменяется за счет изменения частоты лазерных импульсов. Максимальная скорость (V) «пишущей» каретки в векторном режиме работы равняется 10 дюймам (25,4 см) в секунду, в растровом – 50, а максимальное разрешение (PPI) 1000 точек на дюйм.

Гравер оснащен программируемой системой управления, которая автоматически переносит на обрабатываемую поверхность заранее подготовленный рисунок (чертёж). Топологические рисунки создавались в графическо-чертёжной программе AutoCAD, но драйвер гравера позволяет также использовать Illustrator, PhotoShop, CorelDraw и другие CAD-среды, а также текстовые редакторы.



*Рис. 23. Установка лазерной абляции
VersaLaser VLS 3.50*

Шлифовально-полировальная машина Saphir 530

Шлифовка поверхности обработанных ПММА заготовок и удаление наплывов вдоль каналов и отверстий проводилось на шлифовально-полировальной машине Saphir 530 (Рис. 24). Скорость шлифовального диска – 50–600 оборотов в минуту. Для полировки образцов использовался диск – Silicon Carbide 1200/4000 (карбид кремния).



*Рис. 24. Шлифовально-полировальная машина
Saphir 530*

Установка магнетронного напыления MagSput TORR (Instruments) International и установка реактивного ионного травления (РИТ 100 НИИ ТМ)

Нанесение металлических тонких плёнок на подложки из ПММА проводилось посредством магнетрона MagSput (Рис. 25 а). Работы велись с особо чистыми металлическими мишенями диаметром 2 дюйма из серебра, хрома и

титана. Диапазон рабочих мощностей 50–600 Вт, а расход рабочего газа (аргона) 0–10 (л/ч).

На установке реактивного ионного травления (Рис. 25 б) проводилась обработка поверхности ПММА плазмой для придания гидрофобных и гидрофильных свойств, и активации поверхности для более качественного нанесения тонких плёнок металлов. Диапазон рабочих мощностей установки 30–200 Вт, а расход газов 0–3.6 (л/ч), рабочие газы: Ar, O₂, SF₆, CF₄, C₄F₈.



Конвекционная печь Binder ED23

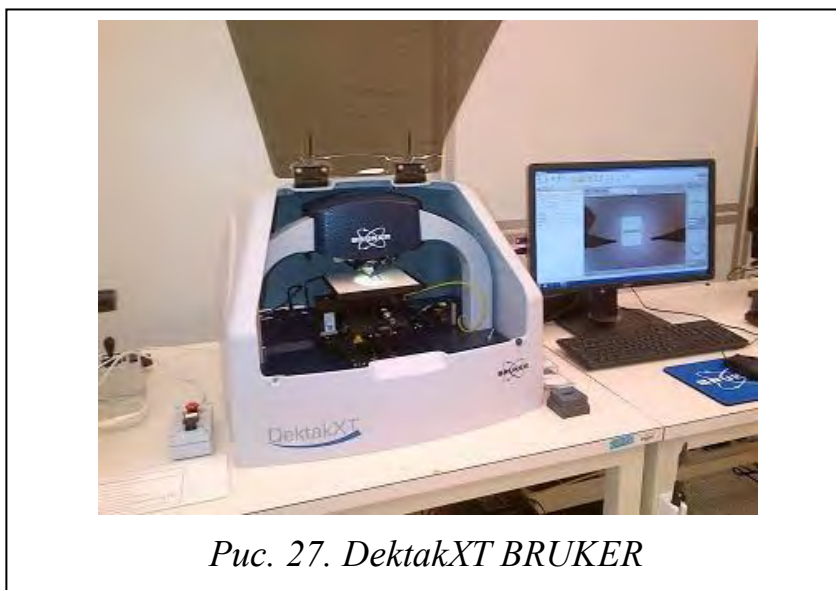
Конвекционная печь Binder (Рис. 26) использовалась для проведения бондинга МФУ из ПММА. Максимальная рабочая температура – 300°C.



2.3. Комплекс микроскопии (диагностика)

Установка контактного измерения профиля поверхности (и анализа поверхностных напряжений) DektakXT BRUKER

Контактный профилометр (Рис. 27) использовался для исследования формы и профиля сформированных микроканалов и микроструктур на подложках ПММА. Диаметр наконечника стилоуса профилометра – 25 мкм, верхняя рабочая зона стилоуса – 125 мкм. Точность конечного измерения – до единиц микрон.



Оптические микроскопы Leica EZ4 и Nikon Eclipse L200N

Для оптического контроля и анализа микроструктур МФУ использовался микроскоп Nikon L200N (Рис. 28 б) с возможным многократным (от 5 до 100) увеличением. Так же он использовался для детектирования процессов формирования капле-микрореакторов.

Микроскоп Leica EZ4 (Рис. 28 а) с четырехкратным увеличением использовался для наблюдения и отработки процесса формирования капле-микрореакторов в МФЧ и исследования поведения жидкостей в других МФУ.

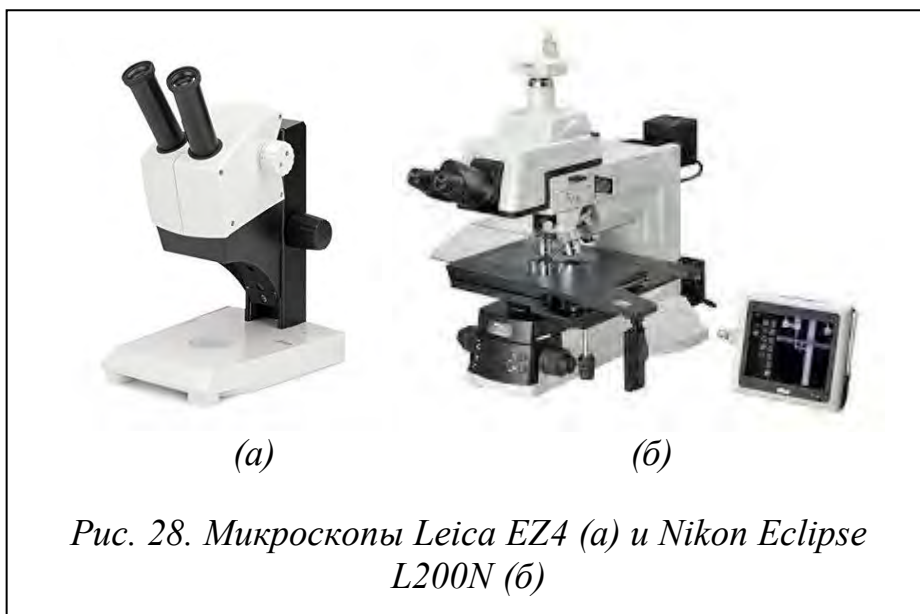


Рис. 28. Микроскопы Leica EZ4 (а) и Nikon Eclipse L200N (б)

Растровая электронная микроскопия (РЭМ) Quanta 3D 200i (FEI Company)

Поверхность обработанных подложек из ПММА и микроструктуры МФУ исследовались методом растровой электронной микроскопии с помощью двухлучевой системы Quanta 3D 200i (FEI Company) (Рис. 29). На образцы предварительно наносилась тонкая металлическая пленка. Электронная пушка данной системы оснащена вольфрамовым термокатодом. Данный метод позволяет детально исследовать поверхность микроканалов с разрешением порядка 10 мкм.

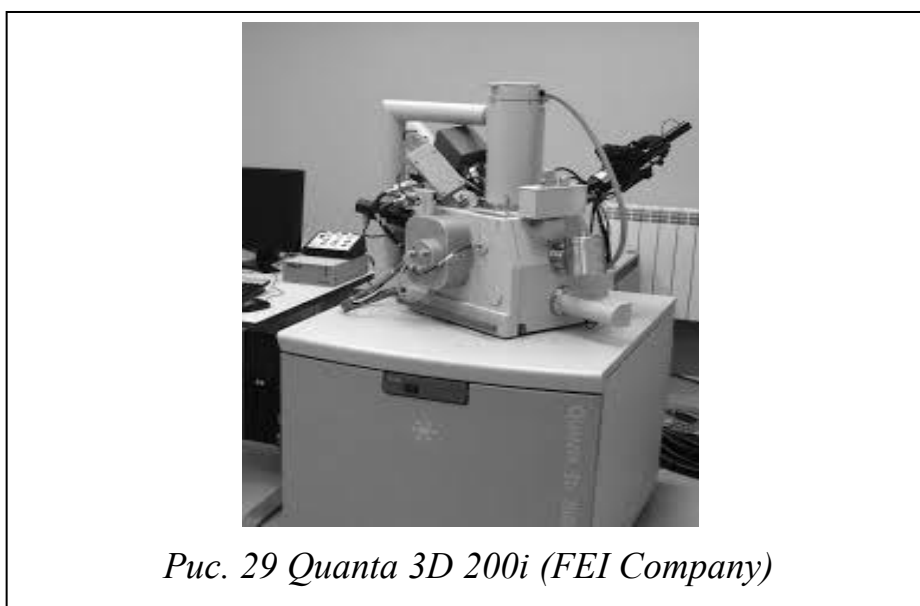


Рис. 29 Quanta 3D 200i (FEI Company)

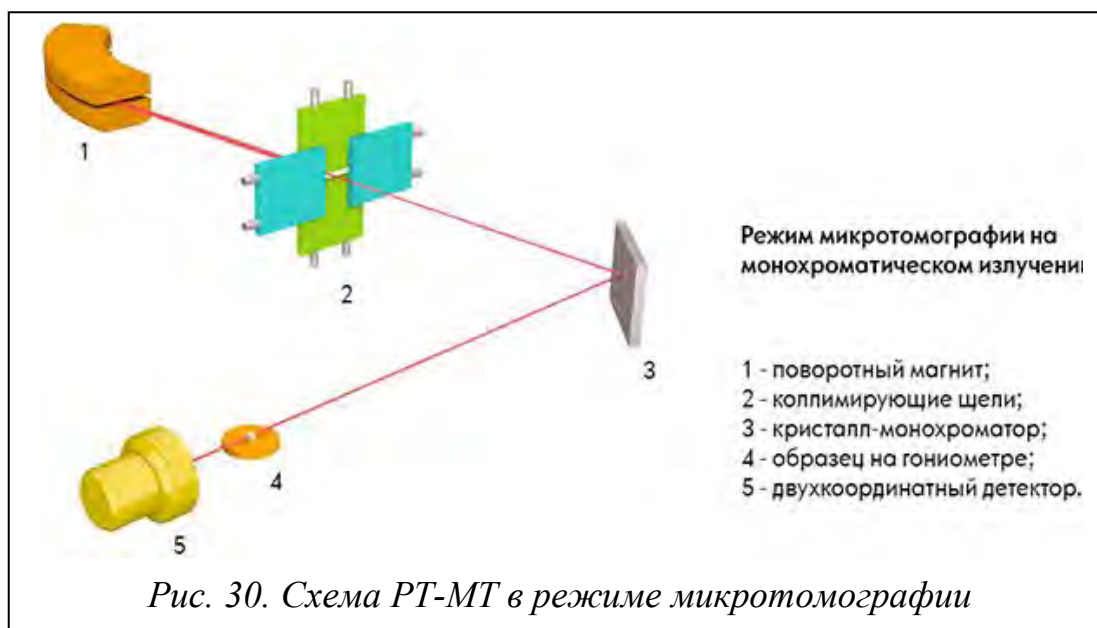
2.4. Курчатовский специализированный источник синхротронного излучения ("КИСИ-Курчатов")

Ускорительно-накопительный комплекс (УНК) Курчатовского специализированного источника синхротронного излучения имеет в своем составе три ускорительные установки: линейный ускоритель электронов на энергию до 80 МэВ, малое накопительное кольцо (МНК) на энергию 450 МэВ и большое накопительное кольцо (БНК) на энергию до 2.5 ГэВ. Основным источником синхротронного излучения (СИ) является большое накопительное кольцо. Малый накопитель служит для промежуточного ускорения электронов от 80 до 450 МэВ и инъекции в БНК и является источником СИ в области вакуумного ультрафиолета и мягкого рентгена. В состав УНК также входят каналы перепуска электронов между ускорителями, технологические и инженерные системы для обеспечения их работы.

Накопители генерируют яркие пучки электромагнитного излучения от инфракрасного до жесткого рентгеновского в диапазоне длин волн от 0.1 до 2000 Е . Для получения более интенсивных фотонных потоков в прямолинейных промежутках БНК устанавливаются специзлучатели, так называемые встраиваемые устройства (вигглеры, ондуляторы).

Экспериментальная станция РТ-МТ

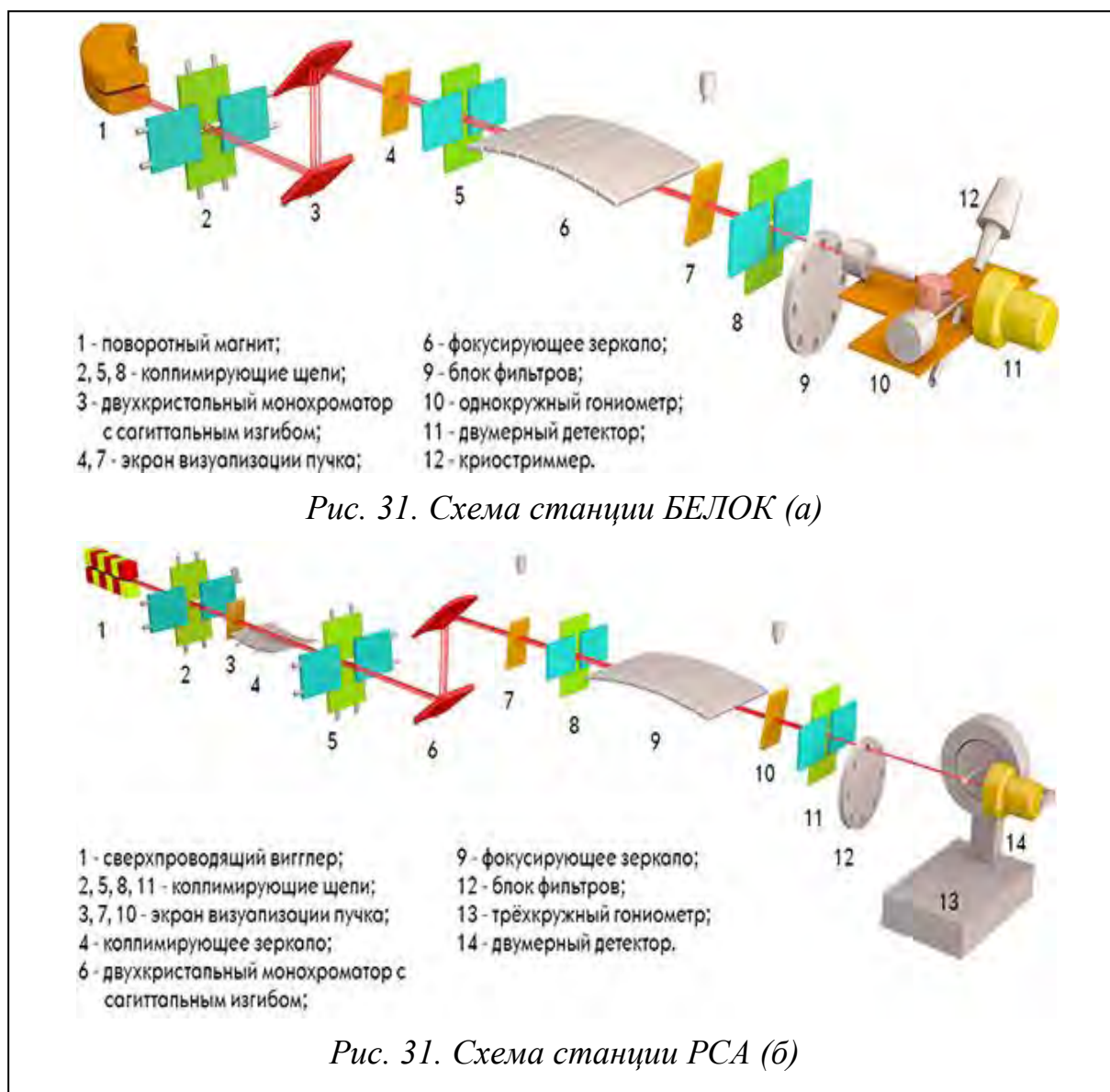
Чтобы детализировать топологию каналов МФУ, был использован метод рентгеновской микротомографии, реализованный на станции Курчатовского источника синхротронного излучения (Рис. 30). Томография позволяет по набору теневых проекций восстановить распределение поглощающей плотности в образце. Использование монохроматического излучения обеспечивает получение точных значений показателя поглощения, но требует предварительного выбора длины волны в зависимости от размера и химического состава исследуемого объекта. Эксперимент проводился при энергии источника в 12.5 кэВ ($\lambda = 1.17\text{\AA}$) на детекторе с размером пикселя 2.5 мкм при поле зрения в 1.5 мм.



Экспериментальные станции БЕЛОК и РСА

Исследование пространственных структур биологических макромолекул проводилось методом РСА на станции БЕЛОК Курчатовского источника синхротронного излучения (Рис. 31 а, б), предназначенной для исследования атомной и реальной структуры методами моно- и поликристалла при помощи 2Θ -сканирующего двумерного детектора. Возможно получение наборов дифракционных данных с разрешением $1\text{--}1.2\text{\AA}$ для кристаллов с параметрами решетки до 100\AA , с разрешением $1.6\text{--}1.8\text{\AA}$ для кристаллов с параметрами решетки 200\AA .

Гониометр дифрактометра построен по трехкрусной схеме с независимым вращением исследуемого образца вокруг двух осей (ω , Φ) и детектора вокруг оси 2Θ , коаксиальной ω . Оси ω , 2Θ расположены горизонтально, а ось Φ под фиксированными углами $X1=35.3^\circ$, $X2=0^\circ$. Модуль регистрации создан на основе двумерного детектора.

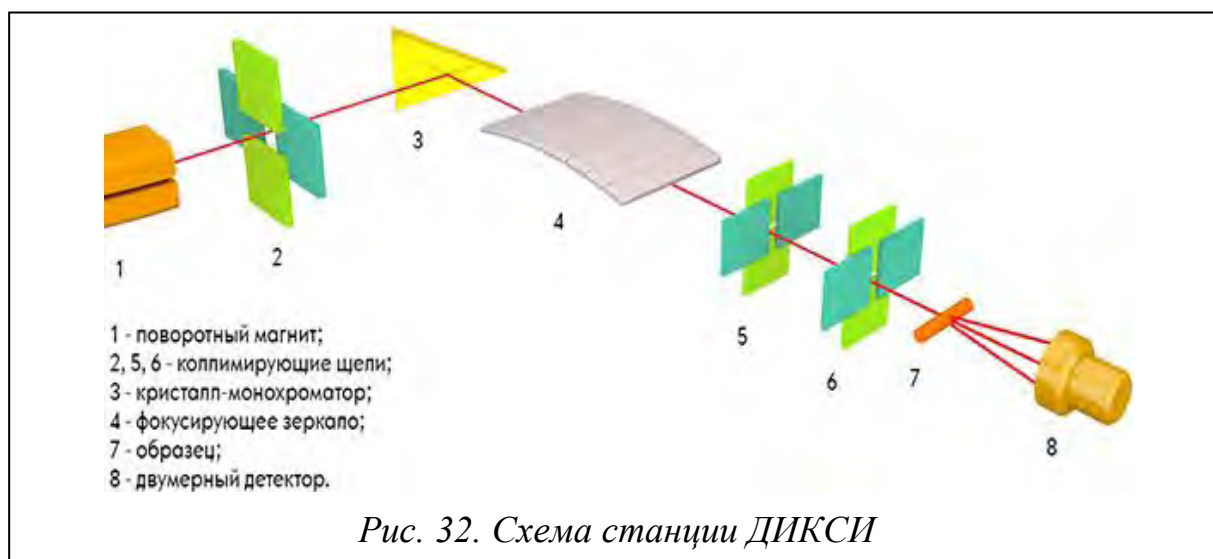


Для исследования кристаллов выращенных в микрофлюидной ячейке и оценки возможности получения наборов дифракционных данных с целью решения структуры исследуемого белка использовалось монохроматическое излучение с длиной волны 0.8024 \AA . Образцы монтировались на гониометр Marresearch dtb. Дифракционная картина регистрировалась двумерным детектором Rayonix SX165 (диаметр 165 мм, разрешение 2048×2048 пикселей). Расстояние образец-детектор составляло 80 мм. Для первичной обработки использовалась программа Automar (MarXperts).

Исследование растворов белков в МФЯ методом МУРР на экспериментальной станции ДИКСИ

Изучение механизмов кристаллизации белковых молекул в растворе проходило посредством МФЯ на экспериментальной станции ДИКСИ.

ДИКСИ (НИЦ «Курчатовский институт», г. Москва) – станция исследования структуры биологических объектов в статике и динамике методами дифракции и рассеяния в области малых и больших углов SAXS/WAXS на монохроматическом рентгеновском излучении. Станция была создана для определения структуры и структурной динамики слабоупорядоченных объектов «soft matter» (Рис. 32).



Для более детального изучения взаимодействия молекул белков в кристаллизационном растворе и определения, что является строительным блоком белкового кристалла, необходимо использовать более мощное излучение и исследовать кристаллизационные растворы при условиях, когда кристаллизация не происходит, когда она затруднена и при оптимальных условиях кристаллизации. Подбирать условия кристаллизации можно путем изменения концентраций белка и осадителя, однако в таком случае исследуемый раствор будет всегда разным.

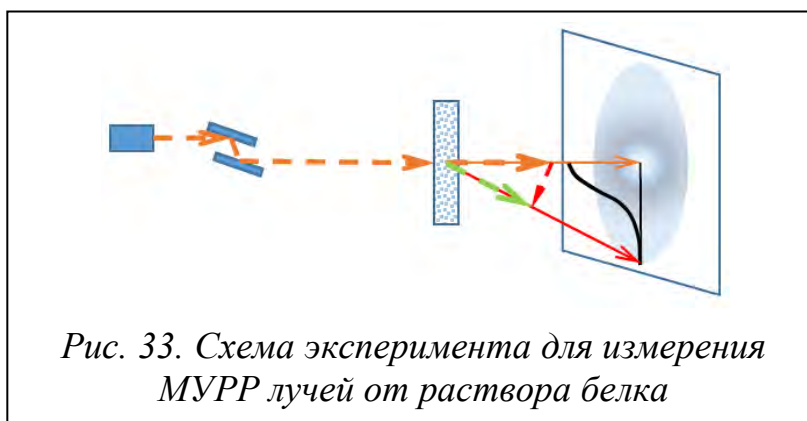
Измерения на синхротронной станции ДИКСИ проводились при фиксированной длине волны 1.62 Å. Картины рассеяния регистрировали

высокоскоростным двумерным детектором Pilatus3 1M при расстоянии образец-детектор 300 мм и времени экспозиции 5 мин. Сечение пучка, сформированного по трехщелевой схеме коллимации, было равно 0.4x0.6 мм. Калибровку угловой шкалы измерений проводили путем обработки дифракционной картины от поликристаллического порошка бегената серебра [111]. Для интегрирования двумерных картин рассеяния и первичной обработки использовали программы Fit2D [112] и Primus (из пакета ATLAS) [113].

Исследование растворов белков в МФЯ методом МУРР на дифрактометре АМУР-К

Малоугловое рассеяние рентгеновского лучей – один из наиболее эффективных дифракционных методов экспериментального исследования органических наноструктур в растворах [116]. Важнейшей особенностью метода малоуглового рассеяния является возможность анализа внутренней структуры разупорядоченных систем. Зачастую его применение – единственный способ получения структурной информации о системах с хаотическим распределением неоднородностей плотности.

Наличие в полидисперсной системе равномерно распределенных неоднородностей, размеры которых от 1 до 100 нм, приводит к рассеянию рентгеновских лучей под малыми углами ($< 30^\circ$). При исследовании зависимости интенсивности рассеянного излучения от угла рассеяния можно определить такие характеристики наноразмерных элементов, как их форма и размер, фазовый состав, внутренняя структура, ориентация и распределение (Рис. 33).



Методом МУРР в работе были исследованы растворы лизоцима и лизоцима с осадителем в условиях кристаллизации тетрагональной формы лизоцима.

Измерения интенсивности рассеяния проводились на автоматическом малоугловом рентгеновском дифрактометре «АМУР-К» [117] (Рис. 34) с линейным беспараллаксным однокоординатным позиционно-чувствительным детектором ОДЗМ при фиксированной длине волны излучения $\lambda = 0.1542$ нм (CuK α -линия острофокусной трубки с медным анодом, монохроматор из пиролитического графита), и коллимационной системой Кратки. Сечение рентгеновского пучка на образце составляло 0.2×8 мм. МФЯ устанавливали в вакуумную камеру дифрактометра на расстоянии 700 мм от камеры детектора. Время измерений одного образца составляло 1 час.

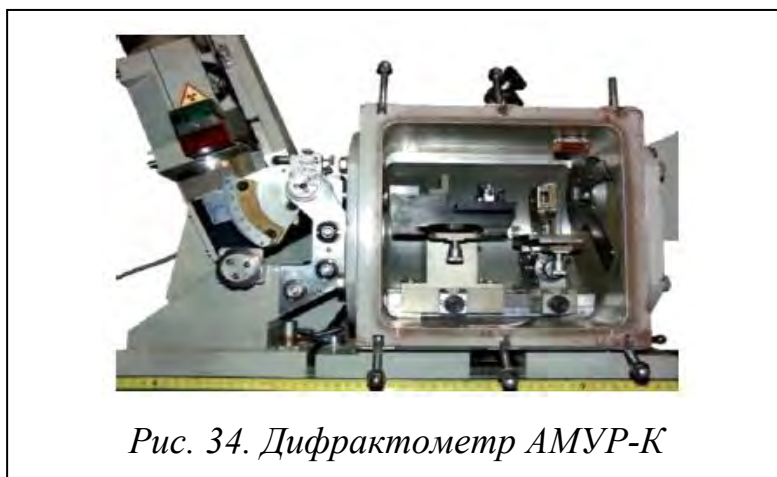


Рис. 34. Дифрактометр АМУР-К

3. Разработка технологической цепочки по созданию различных микрофлюидных устройств на основе ПММА (Чип-за-День)

Микрофлюидные устройства и системы используются во многих областях науки и техники, от систем охлаждения в МЭМС, до микромолекулярных исследований, для их производства используются различные материалы и технологические цепочки. Наиболее распространенными материалами, используемыми при создании МФУ, являются боросиликатное стекло и ПДМС. Несмотря на то, что стоимость самих материалов относительно невелика, изготовление микрофлюидных устройств из них является трудоемким и

дорогостоящим процессом: для создания микроканалов и функциональных элементов используются технологии масочной литографии, применяемые в микроэлектронике.

В задачи данной работы входила разработка относительно простой, быстрой и экономичной технологической цепочки изготовления микрофлюидных устройств без привлечения литографических методов. По очевидным причинам, в ряде областей востребована высокая скорость разработки и создания прототипов МФУ, поэтому, желательно, чтобы технология позволяла формировать МФУ за короткий срок (идеология «чип за день»).

Особое внимание уделено процессам формирования микроканалов и сращивания полимерных пластин, поскольку эти операции требуют наиболее дорогостоящего оборудования и/или временных затрат.

3.1. Основные технологические этапы создания МФУ

Разрабатываемая технологическая цепочка предполагает создание МФУ для решения разнообразных задач, в числе которых:

- чипы для роста кристаллов и проведения рентгеноструктурного анализа;
- ячейки для *in-situ* исследований белковых растворов методом малоуглового рассеяния;
- устройства капельной микрофлюидики для формирования прямых и обратных эмульсий;
- микрочипы фотобиореакторы, как элемент генератора кислорода;
- электрохимические ячейки для очистки препаратов радиационной фармакологии.

Несмотря на широкое разнообразие применений, для всех перечисленных типов устройств можно выделить общие этапы технологического процесса их изготовления. Простейшее микрофлюидное устройство состоит из двух пластин, в одной из которых формируются углубления-микроканалы, а вторая выступает в роли «крышки», герметизирующей систему. Сами каналы должны обладать

определенными характеристиками смачивания, которые определяются типами используемых жидкостей. Таким образом, наиболее общие этапы создания МФУ включают:

- Формирование микроканалов в/на подложке;
- Специализированная обработка стенок микрофлюидных каналов для контроля их смачивания. В частности, придание стенкам каналов гидрофобных или гидрофильных свойств;
- Закрытие каналов, путем соединения подложки с каналами и подложки-«крышки».

Стоит также отметить, что для ряда применений требуется формирование проводящих электродов, т.е. нанесение металлических пленок. Также имеет место задача обеспечения прецизионного совмещения многослойных МФУ.

В данном разделе диссертации изложены результаты исследования, направленные на разработку технологии формирования согласованной цепочки методов, обеспечивающих упрощение и удешевление процесса изготовления МФУ по сравнению с существующими подходами. Особое внимание было уделено процессам формирования микроканалов и бондинга МФУ, на которые приходится основные временные и финансовые затраты.

Выбор метода формирования микроканалов

Конкретная реализация элементов технологии создания МФУ определяется выбором материалов и средств их обработки. Наиболее критичным этапом стоит считать формирование микроканалов. Из-за привлечения литографических методов именно на эту стадию приходится основные временные и финансовые затраты.

Для снижения стоимости и времени формирования каналов было решено отойти от длительных и дорогих масочных литографических методов. В качестве относительно доступного инструмента для безмасочного формирования углублений (каналов) была выбрана лазерная гравировка. В лазерном гравере материал обрабатываемого образца удаляется путем абляции инфракрасным

импульсным лазером, соответственно, изменение параметров излучения лазера и скорости перемещения пучка над поверхностью образца позволяет варьировать геометрические размеры формируемых углублений. Кроме того, современные автоматические лазерные граверы позволяют переносить на поверхности рисунки любой сложности, что обеспечивает гибкость метода.

В работе использовался лазерный гравер с инфракрасным импульсным CO₂ лазером с длиной волны 10.6 мкм и мощностью 50 Вт.

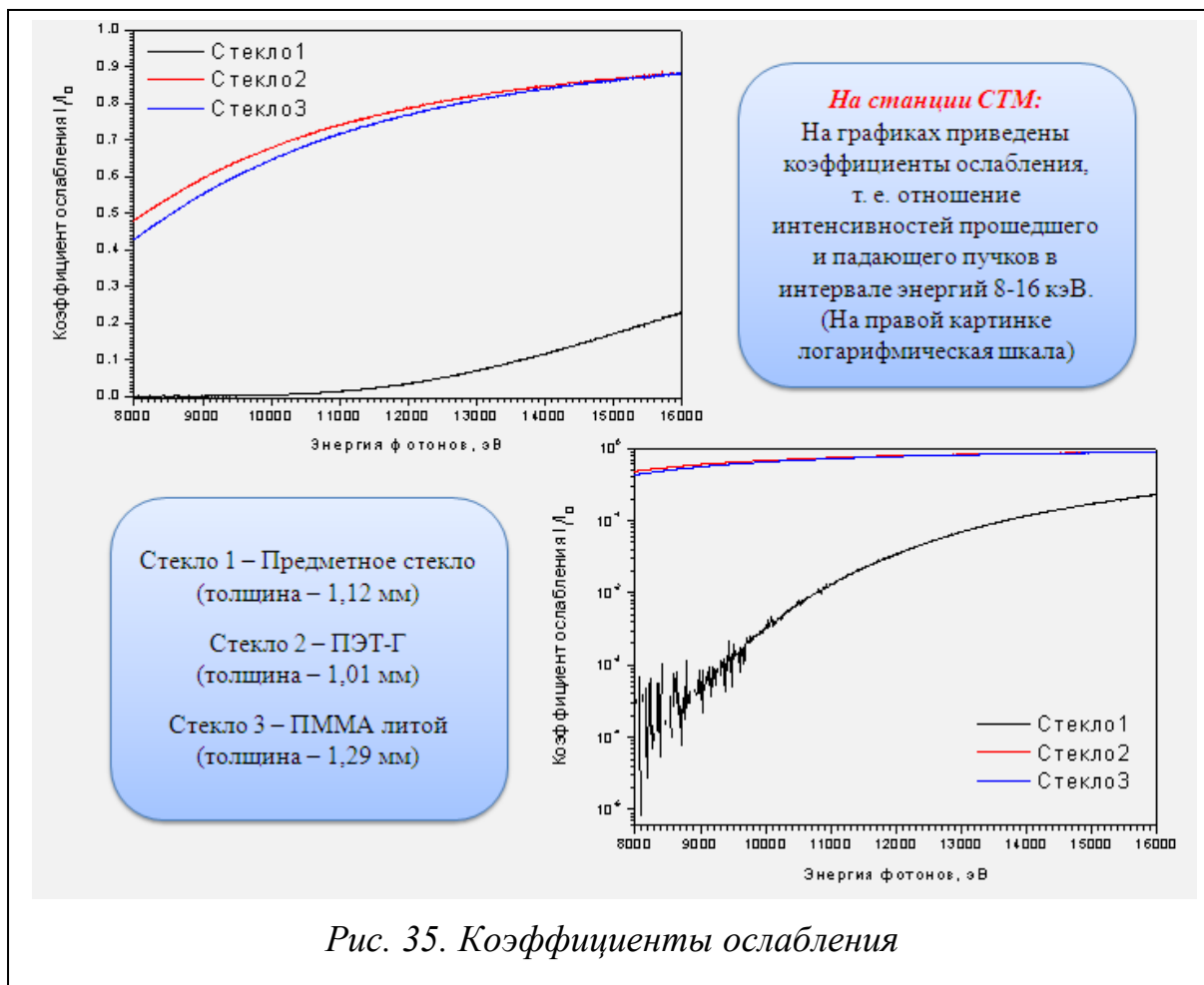
Выбор материала для МФУ

Для сопоставления были выбраны боросиликатное стекло, ПММА и ПЭТ-Г. На боросиликатном стекле, в виду его химической стойкости и биологической инертности, выполняется значительная доля МФУ для экспериментальной работы с биологическими объектами. ПММА и ПЭТ-Г обладают существенно меньшей химической стойкостью, однако, также успешно применяются для создания МФУ для работы с белковыми растворами [118,119,120,121], но при этом имеют меньшую стоимость и широко доступны. ПММА может быть получен методом экструзии или литья. Для работы был выбран последний, поскольку, при химической стойкости, сопоставимой с экструзионным полиметилметакрилатом, литой ПММА имеет меньшую стоимость и лучшую способность к термическому спаиванию (бондингу).

Поскольку в число задач работы входила разработка чипов и ячеек для исследований белковых растворов и кристаллов рентгеновскими методами, важным критерием для выбора материала являлась величина ослабления прошедшего рентгеновского излучения.

Экспериментальное сопоставление пропускающей способности материалов было выполнено на станции структурного материаловедения «СТМ» Курчатовского источника синхротронного излучения (НИЦ «Курчатовский институт», Москва). Для сравнения были взяты образцы боросиликатного стекла, ПЭТ-Г и ПММА близких толщин (порядка 1 мм). Коэффициенты ослабления, т. е. отношение интенсивностей прошедшего и падающего пучков, в интервале

энергий 8–16 кэВ представлены на рисунке 35. Как видно из представленных данных, ПЭТ-Г и ПММА обладают близкими коэффициентами поглощения, тогда как предметное стекло сильно уступает им по прозрачности во всей исследованной области рентгеновского спектра.



Затем ПММА и боросиликатное стекло были также проверены на пригодность к обработке методом лазерной резки. Предпринятые в ходе работы попытки сформировать в стекле микро-углубления показали, что воздействие лазерного луча приводит к растрескиванию стекла, а сами каналы содержат трещины, сколы и имеют шероховатость в десятки микрон (Рис. 36). Таким образом, стекло не подходит для формирования каналов МФУ методом лазерной резки.

По итогам проведенного сопоставления материалов дальнейшую работу было решено вести исключительно с ПММА.

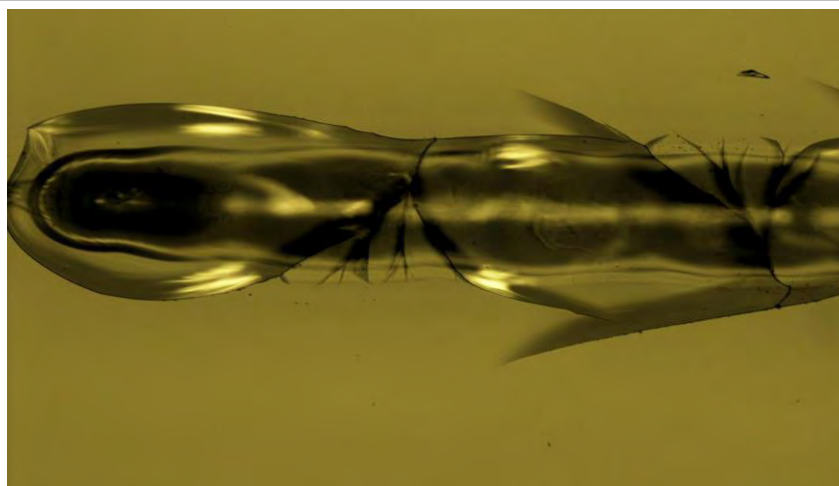


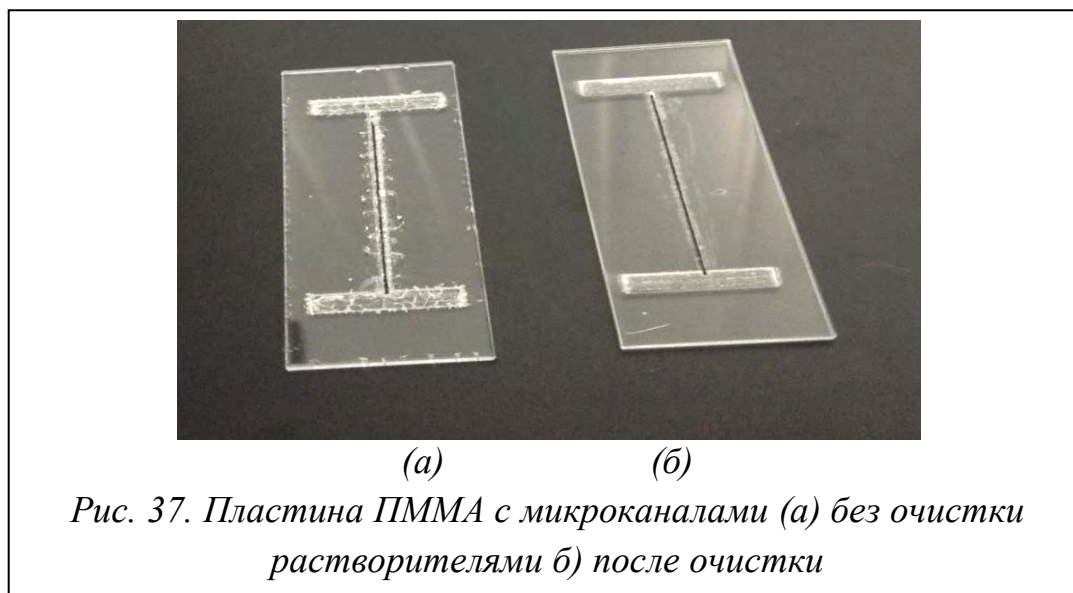
Рис.36. Микроканал на стеклянной подложке, полученный лазерным гравером

3.2. Создание микроканалов

Очистка поверхности

Перед обработкой лазерной абляцией образцы из ПММА проходят очистку деионизированной водой в ультразвуковой ванночке. Затем, если на поверхности подложек все ещё остаются жирные следы и микрочастицы пыли, образец промывается в водном растворе изопропанола (этот спирт не вступает в химическую реакцию с ПММА). Далее, образцы подвергаются нагреву с целью снижения напряжения межмолекулярных связей перед обработкой, при температуре в 75–80°C, в течение нескольких часов. После лазерной резки отмывка в ультразвуке и растворителях повторяется (Рис. 37).

Этиловый спирт, ацетон и бензол не подходят в качестве чистящих средств для отмывки образцов. Даже кратковременное воздействие одного из растворителей в процессе очистки образца, в дальнейшем, испортит подложку.



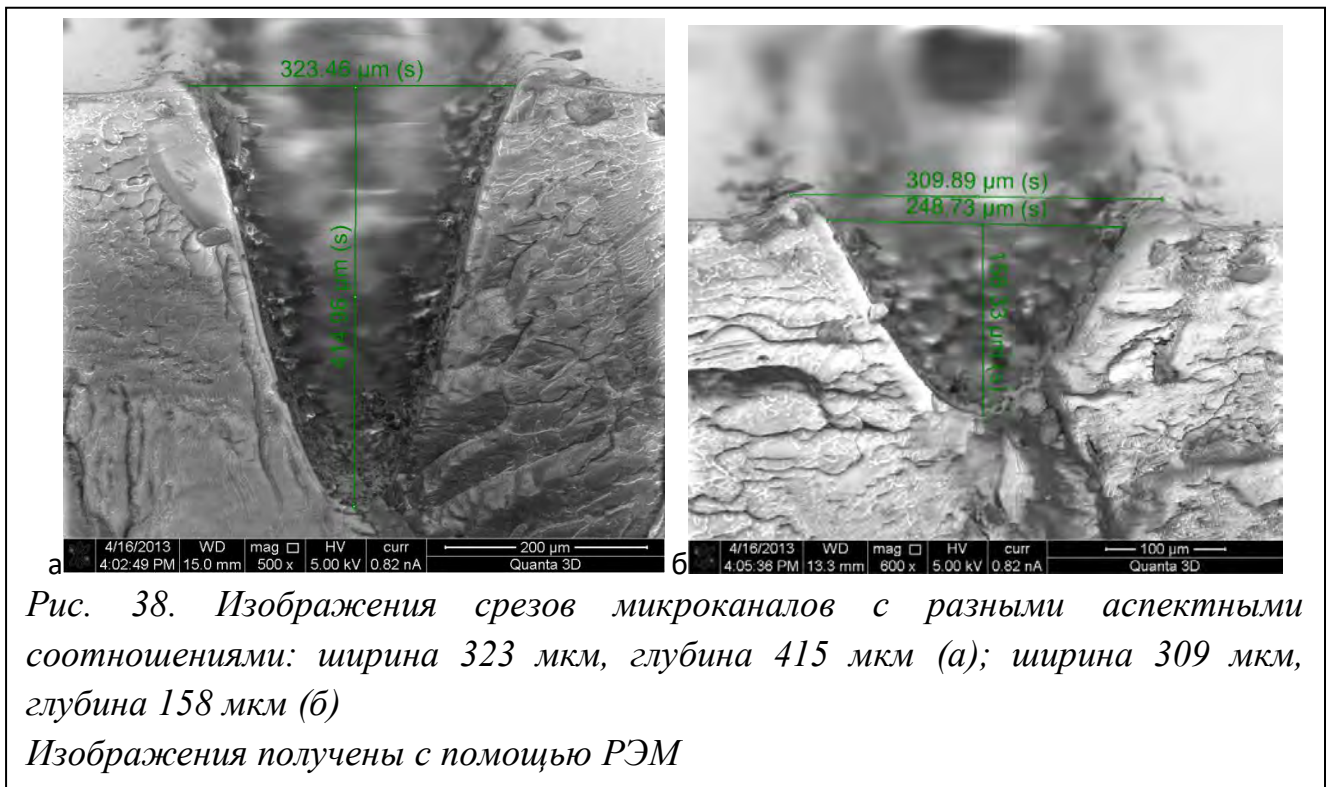
Параметры формирования канала лазером

Размеры микроканалов необходимо контролировать в соответствии с требованиями к геометрии каналов для конкретного типа МФУ. Углубления, создаваемые лазером в ПММА, имеют форму Гауссиана с параболическим профилем. Лазерный гравер имеет несколько настраиваемых параметров, от которых зависят высота и ширина канала: мощность лазера, скорость движения лазерной головки над поверхностью (перемещение между точками поверхности) и количество точек на единицу длины пути лазера (PPI – points per inch).

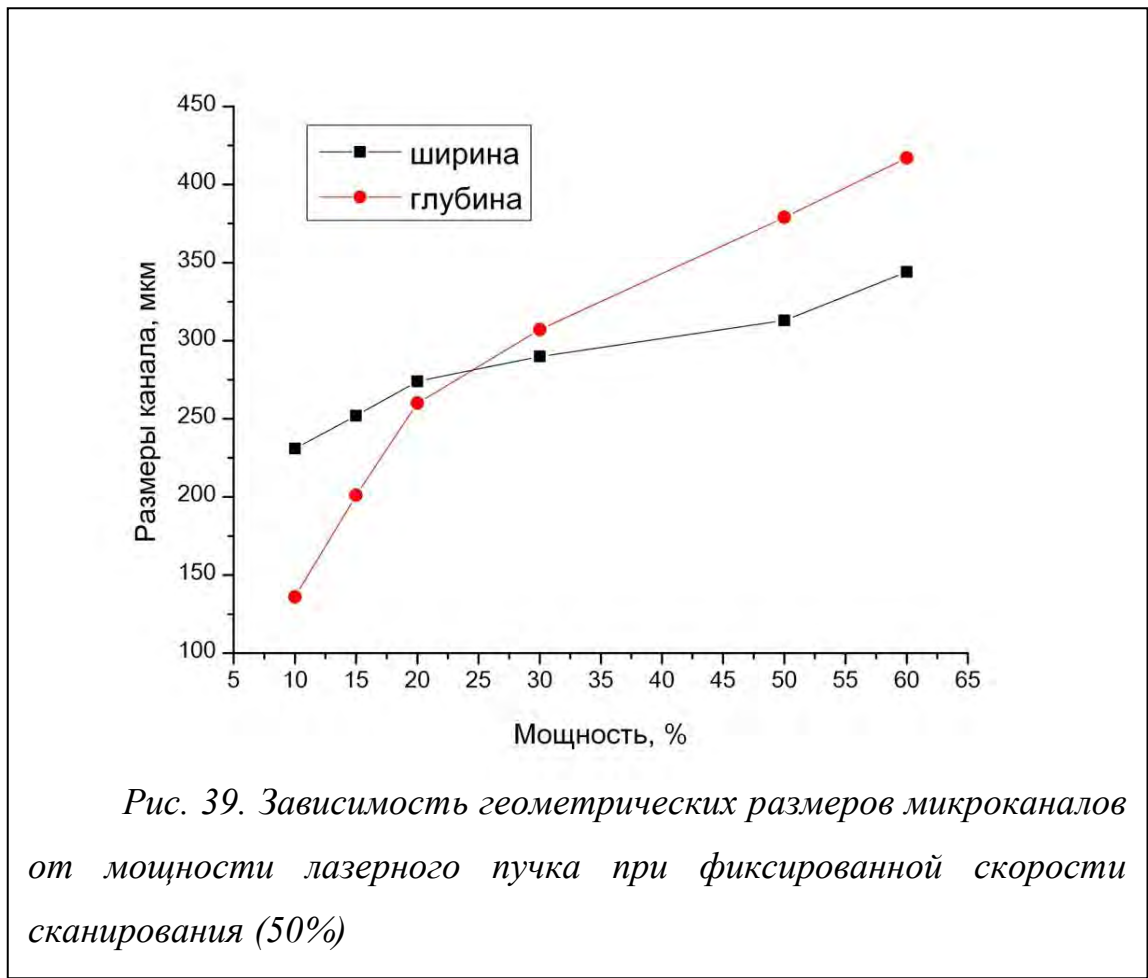
Варьирование мощности лазера и скорости его перемещения изменяют ширину и глубину каналов, причем непропорционально [122]. Для анализа связи между параметрами лазерной обработки и размерами микроканалов была изготовлена серия образцов, в которой варьировались как скорость движения лазера, так и его мощность. Данные параметры выражаются в процентах от максимальных значений. Разрешающая способность во всех экспериментах выставлялась на максимальное значение 1000 PPI, поскольку ее уменьшение увеличивало неоднородность рельефа вдоль каналов.

Геометрия сечений каналов определялась с помощью контактного профилометра Bruker DektakXT и сканирующего растрового электронного микроскопа комплекса Quanta 3D (FEI). Сопоставление данных двух методов показало, что форма зонда профилометра не позволяет полноценно изучить

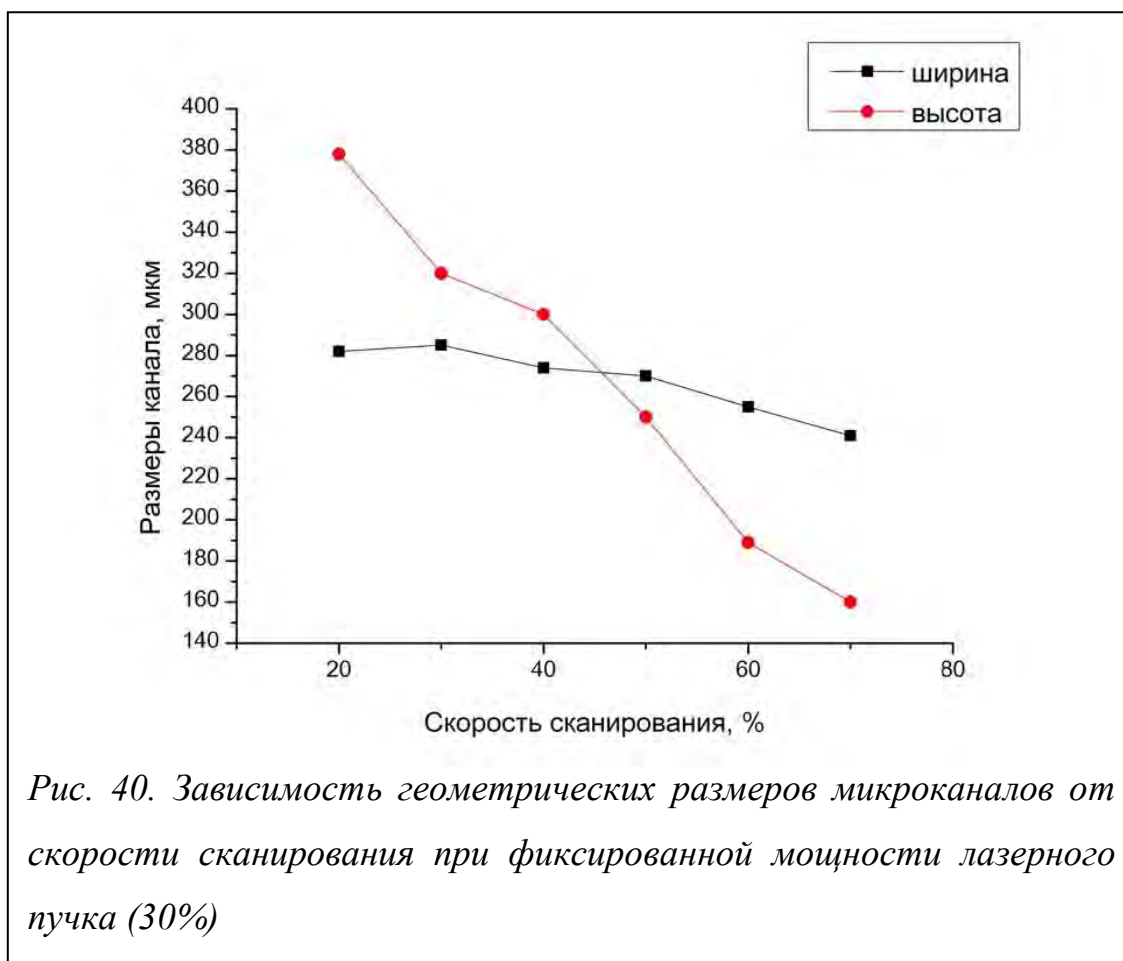
профили каналов, однако позволяет определить их глубину и ширину. Примеры изображений, полученные с помощью РЭМ, показаны на рисунке 38.



На графике (Рис. 39) представлены зависимости длины и ширины каналов от мощности лазера при фиксированной скорости 50%. Видно, что обе величины монотонно возрастают с увеличением мощности лазера. Кроме того, для фиксированной скорости перемещения, существует значение мощности, при котором формируется канал с соотношением высоты и ширины равном единице. Крайняя правая точка на графике соответствует изображению на рисунке 38 (а).



На графике (Рис. 40) показана зависимость геометрических размеров канала от скорости при постоянной мощности в 30% от максимальной. Из приведенных данных видно, что увеличение скорости перемещения пучка приводит к монотонному уменьшению ширины и глубины канала. Крайняя правая точка на графике соответствует изображению на рисунке 30 (б).



При варьировании каждого из двух параметров изменение глубины каналов является в разы более значительным, чем изменение их ширины. Это позволяет формировать каналы с различными аспектными отношениями. В частности, в исследованном диапазоне мощностей лазера и скоростей перемещения лазерного пучка можно достичь отношения ширины канала к глубине от 1.7 до 0.7. Параметры, обеспечивающие соотношение высоты каналов к ширине, близкое к единице, соответствует глубине канала 270–300 мкм.

На изображениях РЭМ хорошо видны наплывы по краям канала (рис. 41), которые образовались из-за переосаждения распыленного лазером материала. Высота наплывов варьировалась от 10 до 30 мкм, возрастала с увеличением мощности лазера и падала с увеличением скорости перемещения пучка.

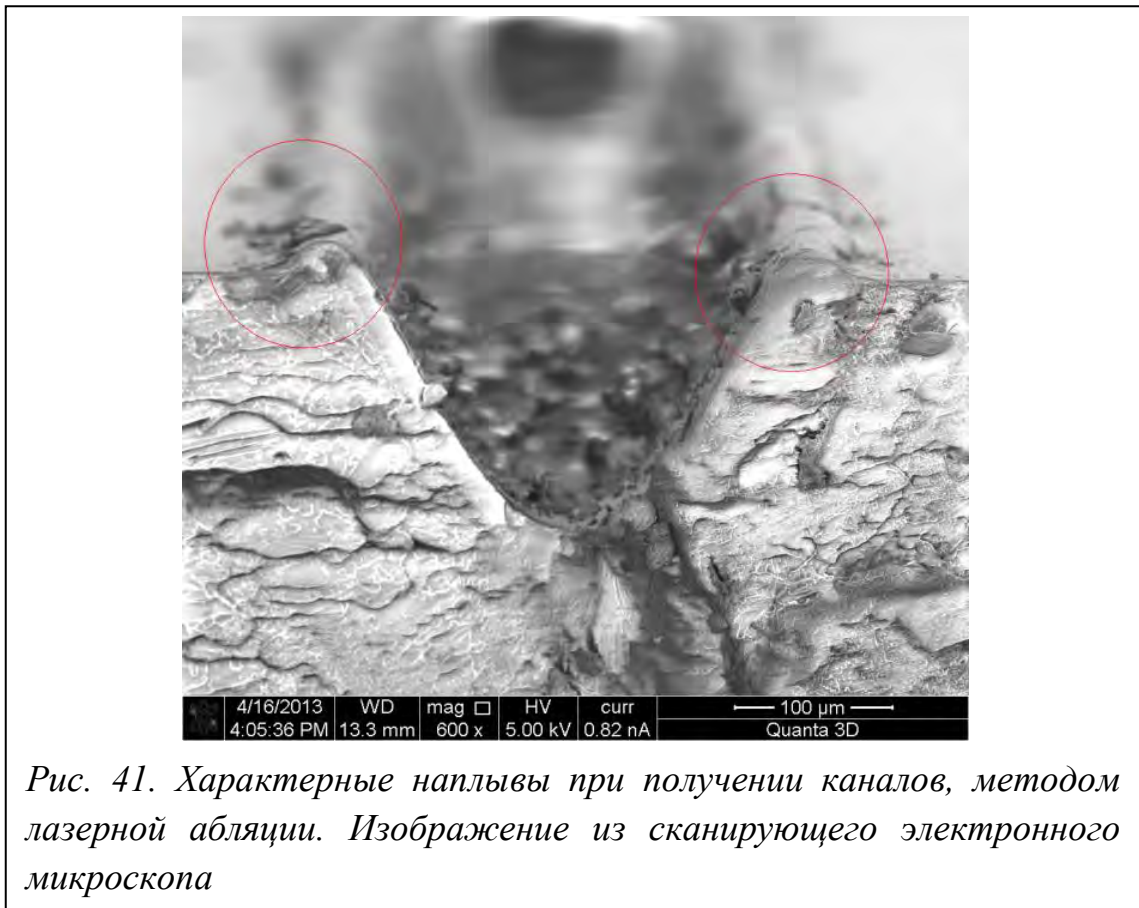
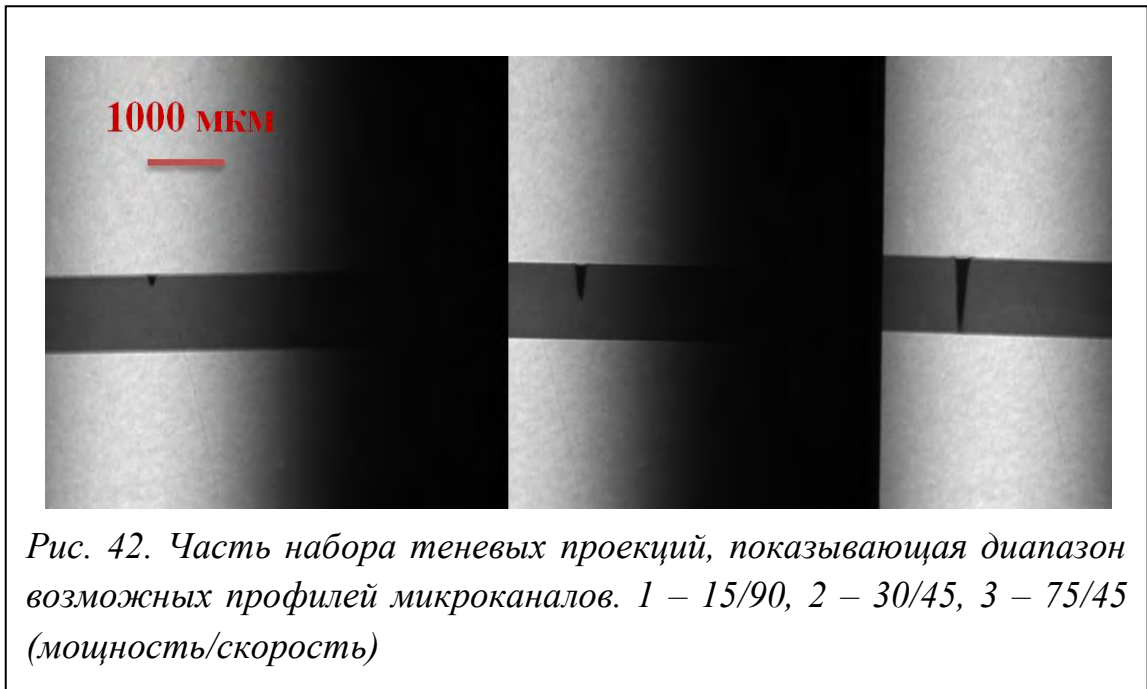


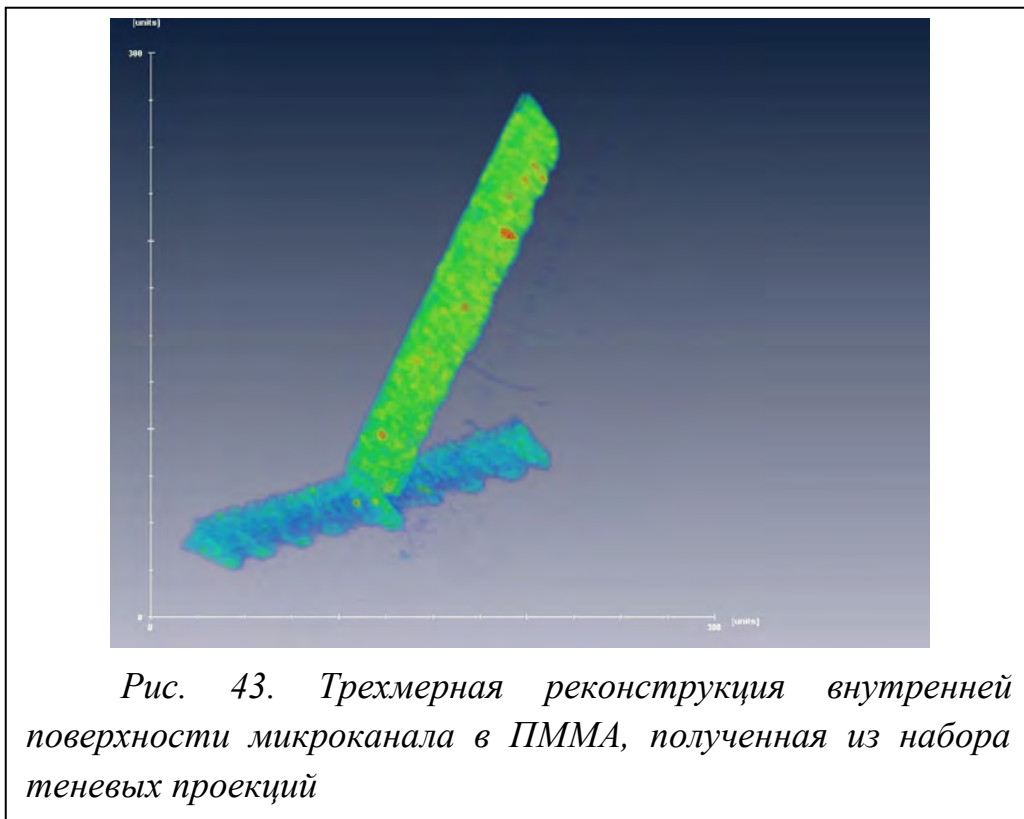
Рис. 41. Характерные наплывы при получении каналов, методом лазерной абляции. Изображение из сканирующего электронного микроскопа

Методы оптической микроскопии и РЭМ позволяют изучить только профиль определенного сечения канала. Чтобы рассмотреть полную топологию (профиль) каналов был использован метод рентгеновской микротомографии, реализованный на станции Курчатовского источника синхротронного излучения (СИ). Томография позволяет по набору теневых проекций восстановить распределение поглощающей плотности в образце. Использование монохроматического излучения обеспечивает получение точных значений показателя поглощения, но требует предварительного выбора длины волны в зависимости от данных о размерах объекта и химическом составе. Эксперимент проводился при энергии источника в 12.5 кэВ ($\lambda = 1.17\text{\AA}$) на детекторе с пикселем 2.5 мкм при поле зрения в 1.5 мм.

Примеры полученных теневых проекций для разных параметров пучка представлены на рисунке 42.



На рисунке 43 показана трехмерная модель внутренней поверхности канала, восстановленная из набора теневых проекций. Таким образом, подобный метод позволяет полностью визуализировать особенности рельефа микроканалов (в частности дна), микрополостей и их стыков.



По итогам экспериментов исследования влияния параметров лазерного гравера можно сделать несколько выводов:

- Увеличение мощности лазера и снижение скорости сканирования поверхности пучком приводят к монотонному увеличению глубины и ширины каналов. При этом, глубина более чувствительна к изменению обоих параметров, что позволяет формировать каналы с различным аспектным соотношением.

- Для использованного в работе лазерного гравера, каналы с аспектным соотношением, близким к единице, могут иметь ограниченную глубину в диапазоне 270–300 мкм.

- По краям всех каналов образуются наплывы высотой 10–30 мкм из пересаженного материала.

3.3. Бондинг (термическая спайка)

Существует широкий спектр методов, позволяющих соединять полимерные пластины из ПММА между собой: термическое сращивание (бондинг) [123,124,125], сращивание с УФ излучением [123], сращивание растворителями [123,126], микроволновое сращивание [123,127,128], сварка трением. Все перечисленные способы обычно требуют дорогого специализированного оборудования. Например, для термического сращивания используются прецизионные машины горячего тиснения или бондеры для микроэлектронной промышленности. Для УФ обработки используют лампы высокой мощности (225 мДж на см² в [129]) со строго определенной длиной волны порядка 220 нм. Более того, термическая обработка при сращивании может вызывать деформацию каналов и полостей в микрофлюидном устройстве [125]. Использование растворителей является дешевым, простым и быстрым способом, обеспечивающим сильное связывание полимерных пластинок [125,130-132]. Метод позволяет существенно снизить температуру сращивания, но также приводит к деформации микроканалов, что ограничивает его применимость. Наиболее экономичным является объединение температурного и химического бондинга, в котором объединяются достоинства обоих методов и

преимущественно устраняются их недостатки. За счет разбавления и смешения растворителей можно добиться активации процесса плавления при более высокой температуре, которая, в то же время, будет ниже температуры плавления, а сращивание будет происходить при достаточно низких давлениях на полимерные пластины [133,134]. В работе [135] данным методом достигнуто надежное сращивание пластин ПММА с сохранением формы микроканалов при температуре 85°C и давлении, создаваемом двумя канцелярскими скрепками. При этом, по-прежнему требуется тонкий контроль температурных условий и состава смеси-растворителя.

Далее будет показано, что бондинг пластин ПММА может быть проведен при низких давлениях и низких температурах без использования растворителей, что существенно упрощает технологию изготовления МФУ.

Сращивание гладких пластин ПММА

Первая серия экспериментов по термическому сращиванию ПММА была проведена на пластинах без микроканалов. Перед соединением пластины подвергались процедуре отмывки в растворителях, описанной ранее. Давление на пластины создавалось с помощью металлических грузов цилиндрической формы. Чтобы исключить прилипания и повреждения ПММА, использовались прокладки из монокристаллических пластин кремния толщиной 0.6 мм. Груз был подобран так, чтобы давление на пластины составляло порядка 1 кг/см² (атм). Для использованных чипов это достигалось нагрузкой весом порядка 10 кг.

Нагрев осуществлялся в конвекционной (вентилируемой) печи. Изменение температуры осуществлялось со скоростью 1°C в минуту. Температуры стеклования и плавления используемого ПММА при атмосферном давлении составляют порядка 105°C и 135°C, соответственно, что ограничивает интервал термических условий для бондинга. Исходя из этого, для сращивания были выбраны температуры 110, 115 и 120°C. Для достижения равномерного прогрева и релаксации внутренних напряжений в пластинах, нагрев проводился ступенчато с остановками длительностью 10 минут на 80, 90 и 100°C, с последующим

непрерывным нагревом до конечной температуры. Дополнительно был проведен эксперимент с непрерывным нагревом до 120°C. На конечной температуре образцы выдерживались 15 и 30 минут, после чего плавно остужались.

Для контроля качества бондинга использовался визуальный осмотр пластин невооруженным взглядом и в оптический микроскоп на предмет наличия воздушных карманов. Прочность соединения оценивалась сгибанием и скручиванием спаянных пластин, которые проводились без динамометрического контроля, руками. Дальнейшая работа показала достаточность такого критерия прочности.

Анализ группы образцов, спаянных описанными способами, показал, что при температуре бондинга в 120°C при ступенчатом нагреве воздушные карманы между пластинами ПММА отсутствовали. При меньших температурах присутствовали пузырьки воздуха. После спаивания на 105°C соединение между образцами легко разрушалось. Существенных различий при спаивании в течение 15 и 30 минут обнаружено не было, как и при снижении давления до 1000 мбар.

Критичным оказался режим нагрева сращиваемых пластин: непрерывный нагрев до 120°C и выдерживание в течение 15–30 минут при давлении 1500 мбар не позволил достичь качественного соединения. Между пластинами оставались заметные невооруженным глазом воздушные карманы, а само соединение легко разрушалось.

Главным выводом из полученных результатов является то, что пластины ПММА могут быть качественно спаяны при температуре 120°C под давлением величиной всего 1 кг/см², которое легко достигается подручными средствами. Нужно особо подчеркнуть, что в литературе *не было найдено* упоминаний об успешном проведении сращивания пластин микрофлюидных устройств из ПММА при сочетании таких низких температур и давлений без использования растворителей. Ниже будут показаны причины такого странного несоответствия полученного результата и данных публикаций.

Сращивание пластин с микроканалами

Ранее было показано, что неотъемлемым артефактом лазерной обработки ПММА являются наплывы высотой 15–30 мкм по краям микроканалов. Эти наплывы образуются за счет переосаждения материала из канала, не устраняются подбором параметров абляции и могут быть обнаружены практически во всех работах, посвященных созданию полимерных микрофлюидных чипов [44,118,119,123].

Наличие наплывов по краям микроканалов привело к тому, что бондинг пластин при давлении и температуре, определенных ранее как достаточные для спаивания гладких пластин, не дал удовлетворительного результата. В окрестности каналов между чипами присутствовали видимые невооруженным глазом воздушные карманы (Рис. 44) Более того, прокачка жидкости через чип приводила к разгерметизации каналов и вытеканию их содержимого, причем нарушение целостности каналов происходило в первую очередь у воздушных карманов.

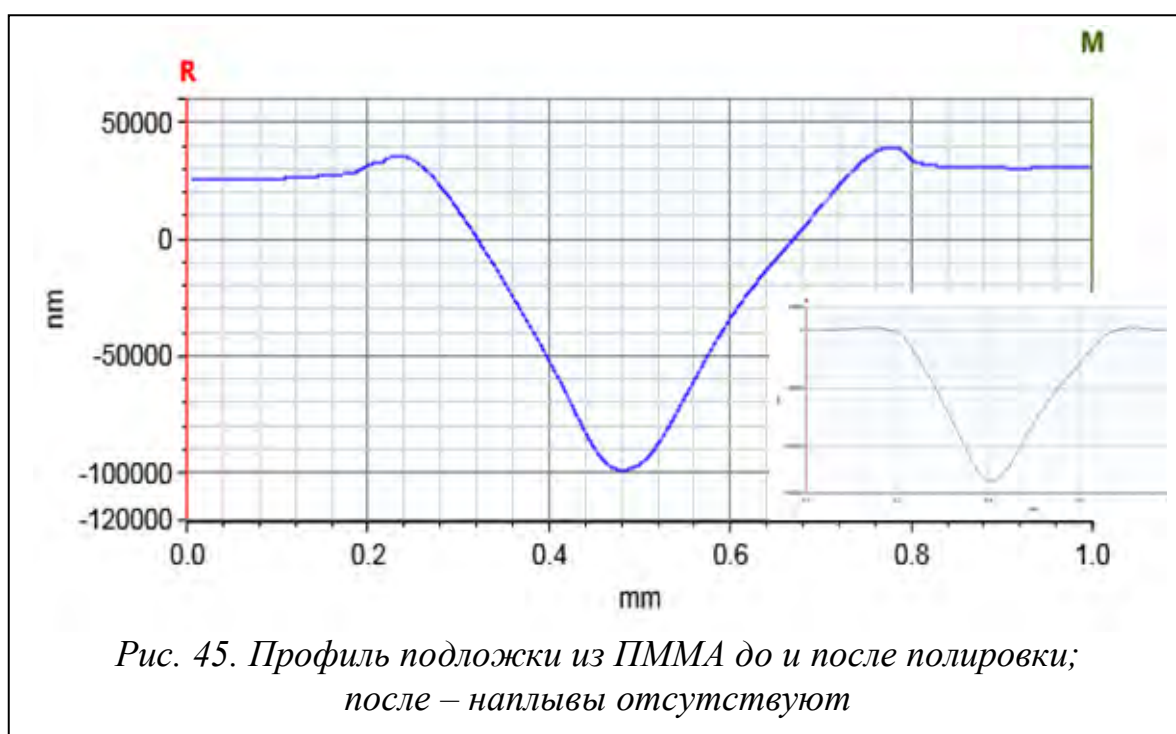


Первой попыткой решить эту проблему было проведение спаивания при более высокой рабочей температуре в 130°C – со ступенчатым нагревом до неё. К сожалению, из-за слишком высокой температуры, близкой к температуре плавления ПММА (135–140°C), происходила деформация каналов, а также

деформация вводных и выводных отверстий. В связи с этим было решено вернуться к рабочему значению температуры равной 120°C.

Вторая попытка разобраться с «пузырьками воздуха» заключалась в изменении давления, приложенного к ПММА подложкам. Повышение давления на пластины в несколько раз снизило число и размеры воздушных каналов, но не позволило добиться герметизации каналов при прокачке жидкости. Дальнейшее увеличение давления было нецелесообразным, поскольку требовало использования специализированных установок и не соответствовало идеологии исследования, направленного на упрощение и удешевление процесса изготовления МФУ.

Благодаря опытам с гладкими пластинами ПММА было очевидно, что причиной формирования воздушных карманов являются именно наплывы по краям каналов. Для устранения наплывов был опробован метод механической полировки. В данной работе использована шлифовально-полировальная машина Saphir 530 с мелкодисперсным абразивом. Скорость вращения полировального диска составляла – 80 об/мин, «жесткость» шлифовочного листа – Silicon Carbide 800/2400. Среднее время шлифовки составляло – 60 ÷ 120 секунд. Важно отметить, что аналогичная механическая полировка может быть проведена на большом количестве недорогих и доступных аналогов использованной машины. После полировки пластина с микроканалами подвергалась повторной отмывке в водном растворе изопропанола. На рисунке 45 показаны профили канала до и после абразивной обработки. Как видно из представленных изображений, остаточная высота наплывов не превышает 3 мкм, а форма канала не изменилась.



После устранения напылов пластинку с каналами удалось успешно спаять с гладкой крышкой без заметных воздушных карманов при 120°C и давлении 1000 мбар. Проверка герметичности каналов путем прокачки подкрашенной жидкости *не выявила протечек*. Дополнительное варьирование температуры сращивания и давления показали, что герметичность каналов в отсутствие их деформации сохраняется в интервале температур от 117 до 123°C при давлениях 1000–1500 мбар.

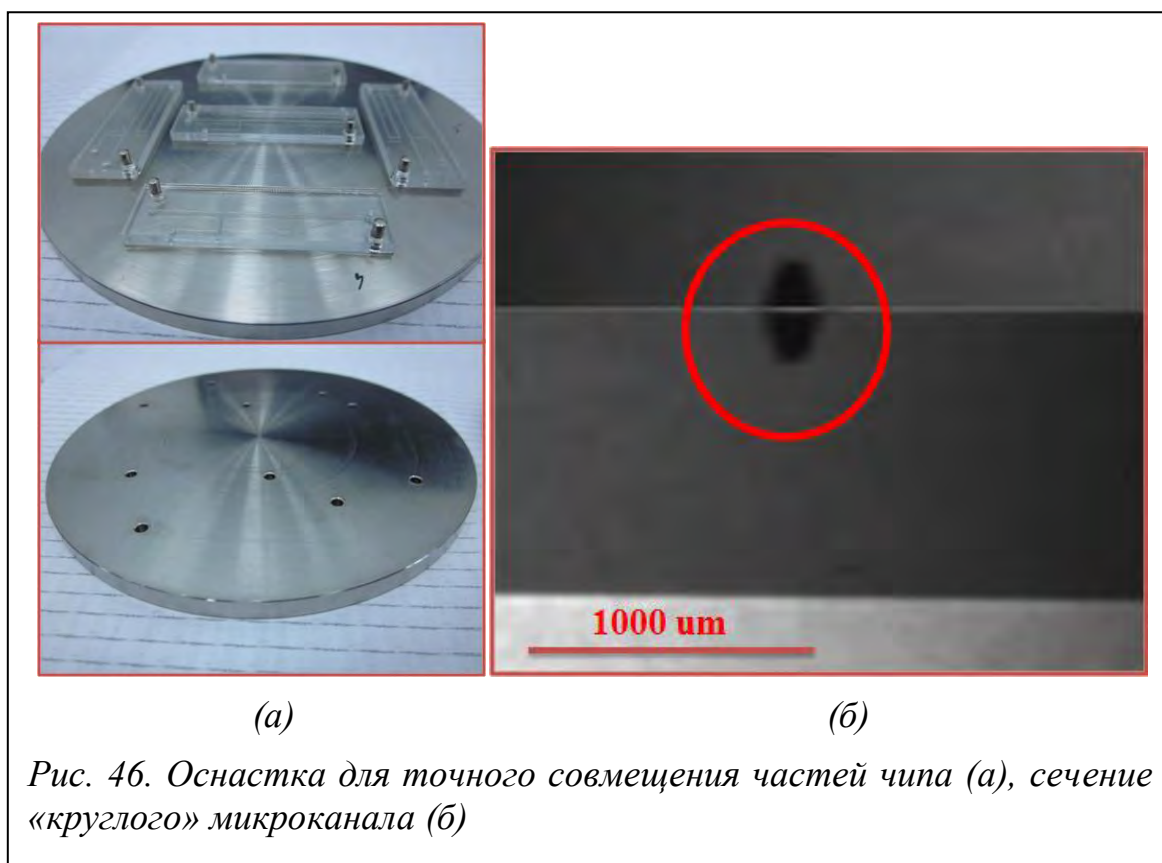
Важным следствием спайки пластин ПММА при низком давлении и температуре ниже температуры плавления стало то, что пластины могут быть достаточно легко рассоединены с помощью острого лезвия и повторно спаяны до трёх раз. В ряде применений это является большим достоинством чипа. В частности, в случае использования МФУ для кристаллизации белка необходимо иметь возможность извлечь кристаллизованный материал не повредив его. Нужно еще раз подчеркнуть, что, не смотря на простоту разъединения пластин, каналы между ними являются герметичными и не нарушаются при протекании жидкости под давлением. Также, спаянные пластины выдерживают обычные манипуляции, умеренный сгиб и надавливания, не разрушаясь.

Результаты описанных экспериментов показывают, что основной причиной использования высоких температур, экстремальных давлений и растворителей в большинстве работ по сращиванию пластин ПММА является наличие наплывов из переосажденного материала. Их устранение простой полировкой существенно расширяет диапазон температур и давлений для спайки и делает эту процедуру более доступной и простой.

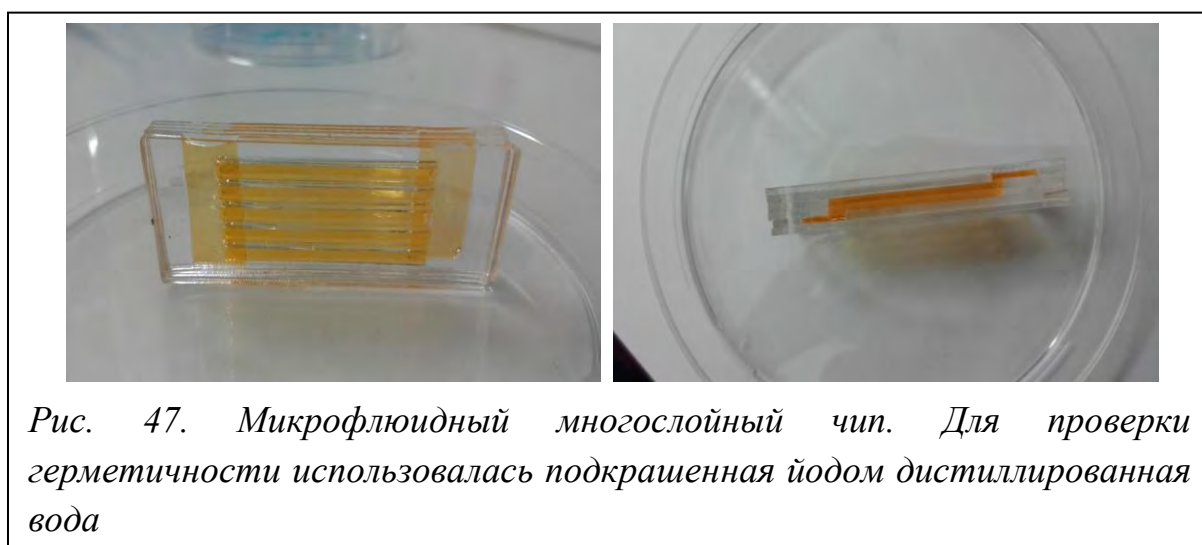
Совмещение пластин ПММА

Во многих существующих МФУ для создания ламинарных потоков, увеличения «пропускной способности» и более стабильного формирования капель используются микроканалы с симметричным сечением. Для их изготовления методом лазерной резки канавки формируются на обеих пластинах. Такой подход требует надёжного совмещения пластин, исключающего относительное смещение каналов при спайке. Кроме того, часто используются многоуровневые системы каналов и резервуаров, состоящие более чем из двух пластин, которые также нужно совмещать при спайке.

Для надёжного совмещения пластин ПММА при термическом бондинге была разработана специализированная оснастка (Рис. 46 а), в которой совмещение слоев достигается нанизыванием пластин на цилиндрические направляющие. Отверстия для направляющих формируются лазерным гравёром, что обеспечивает погрешность совмещения меньше 25 микрон.



На рисунке 46 б показан пример совмещения каналов, вырезанных в двух пластинах ПММА. В качестве эксперимента было также создано и проверено на герметичность микрофлюидное устройство, состоящее из шести слоёв ПММА (Рис. 47). Бондинг многослойной системы проводится при тех же параметрах, что использовались для спайки двух пластин. Прокачка подкрашенной воды через полученный образец не выявила наличия утечек.



3.4. Модификация свойств МФУ

Обработка поверхности ПММА:

Гидрофобность и Гидрофильность – изменение угла смачивания

Одной из основных областей применения микрофлюидных устройств является контролируемое формирование капель малого объема. Капли разделяются между собой жидкостью-носителем, речь идёт о создании прямых (масло в воде) и обратных эмульсий (вода в масле). Подбор правильного сочетания водной и масляной сред позволяет жидкостям не смешиваться.

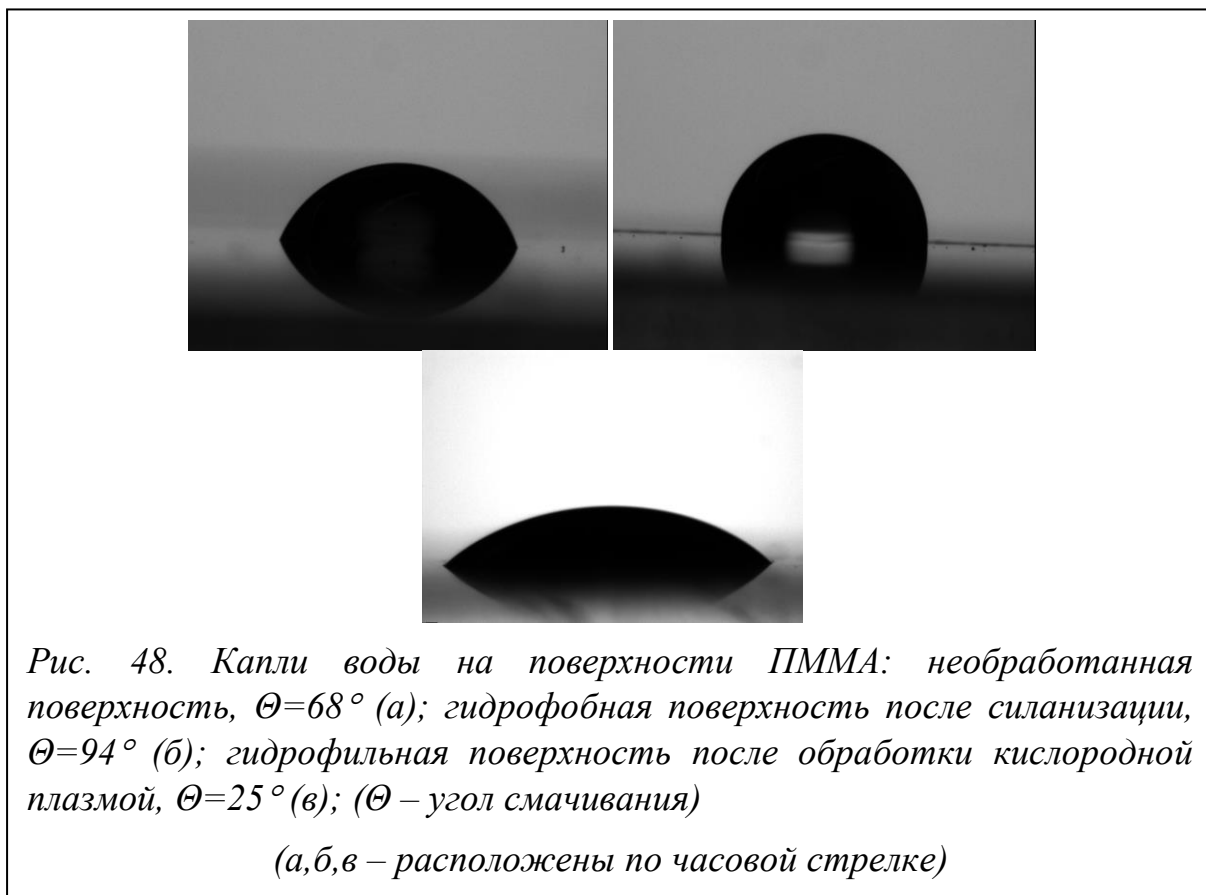
Одним из главных достоинств капельных систем является возможность изолировать каплю от стенок сосуда или канала с помощью жидкости носителя. Такие условия позволяют исключить физическое и химическое взаимодействие вещества в капле с материалом емкости. Для этого жидкость носитель должна смачивать стенки канала лучше, чем жидкость капли. Соответственно, для создания эмульсий «вода в масле» необходимы гидрофобные стенки канала, для формирования капель масла в водном носителе, наоборот, гидрофильные.

Наиболее распространенными способами придания поверхности гидрофобных свойств являются силанизация и обработка фторсодержащей плазмой (SF_6 , CF_4 , C_4F_8 и др). Силанизация – это обработка поверхности стекла, кварца или полимеров силанизирующими агентами, такими как триметилхлорсилан, диметилдихлорсилан, дисилазаны и др. Механизм силанизации заключается в том, что присутствующие на поверхности образца силанольные группы ($-\text{Si}-\text{OH}$) реагируют с силанизирующим агентом с образованием гидрофобной силоксановой пленки. При обработке фторной плазмой атомы фтора пассивируют поверхностные химические связи.

В ходе исследования для придания поверхности ПММА гидрофобных свойств были экспериментально опробованы как силанизация, так и фторная обработка. В качестве теста на смачивание использовалось измерение краевых углов капель деионизованной воды (статический метод лежащей капли) с помощью системы DSA 30 E (KRUSS). Объем наносимой капли – 5 мкл.

Для силанизации использовался диметилдихлорсилан $((\text{CH}_3)_2\text{SiCl}_2)$. Обработка проводилась погружением ПММА в диметилдихлорсилан на 3 минуты. Подобная обработка приводила к увеличению угла смачивания с 68° до 94° (Рис. 48 а и б). Таким образом, эксперимент показал, что силанизация позволяет придать поверхности ПММА гидрофобные свойства. Кратковременное, воздействие фторсодержащей плазмы в течение 30–120 секунд при малой мощности плазменного генератора так же создало на поверхности стабильный гидрофобный слой.

Последующий нагрев обработанных пластин ПММА до температур спаивания показал, что силанизированная поверхность начинает терять свои гидрофобные свойства уже при 100°C . Фторированная поверхность не теряет своих свойств даже при температурах выше 120°C . С другой стороны, фторированная поверхность оказывается слишком инертной для низкотемпературного спаивания под малым давлением, а силанизация каналов может проводиться уже после спаивания ПММА путем прокатки через МФУ.



Для придания ПММА гидрофильных свойств можно использовать травление ПММА в кислородной плазме, которая формирует кислородные «хвосты» на поверхности ПММА создающие гидрофильный слой, с углами смачивания $\Theta = 20^\circ\text{--}40^\circ$ (Рис. 48 в). К сожалению, поверхность, обработанная таким образом, теряет свои свойства при температурах выше 110°C , поэтому этот метод несовместим с технологией термической спайки.

Для решения этой проблемы были предприняты попытки обработки поверхности активным кислородом в форме озона. Эксперименты проводились на системе UV-600 компании Modular Process Technology, в которой озон генерируется из молекулярного кислорода под воздействием ультрафиолетового излучения. Интенсивность УФ излучения составляла 50 мВт/см^2 на длине волны 254 нм, расход кислорода – 50 л/мин, а время воздействия варьировалась от 15 до 50 минут.

Анализ смачивания ПММА позволил установить, что для образования гидрофильной поверхности достаточно 30 минут обработки, а гидрофильные свойства, соответствующие углам смачивания $20\text{--}30^\circ$, сохраняются даже после отжига обработанного ПММА на температурах более 120°C . Озонная обработка позволила не только создать устойчивую к температуре гидрофильную поверхность, но и снизить температуру, необходимую для бондинга ПММА пластин до $90\text{--}100^\circ$ (давление 1500 мбар, время спаивания – 30 минут).

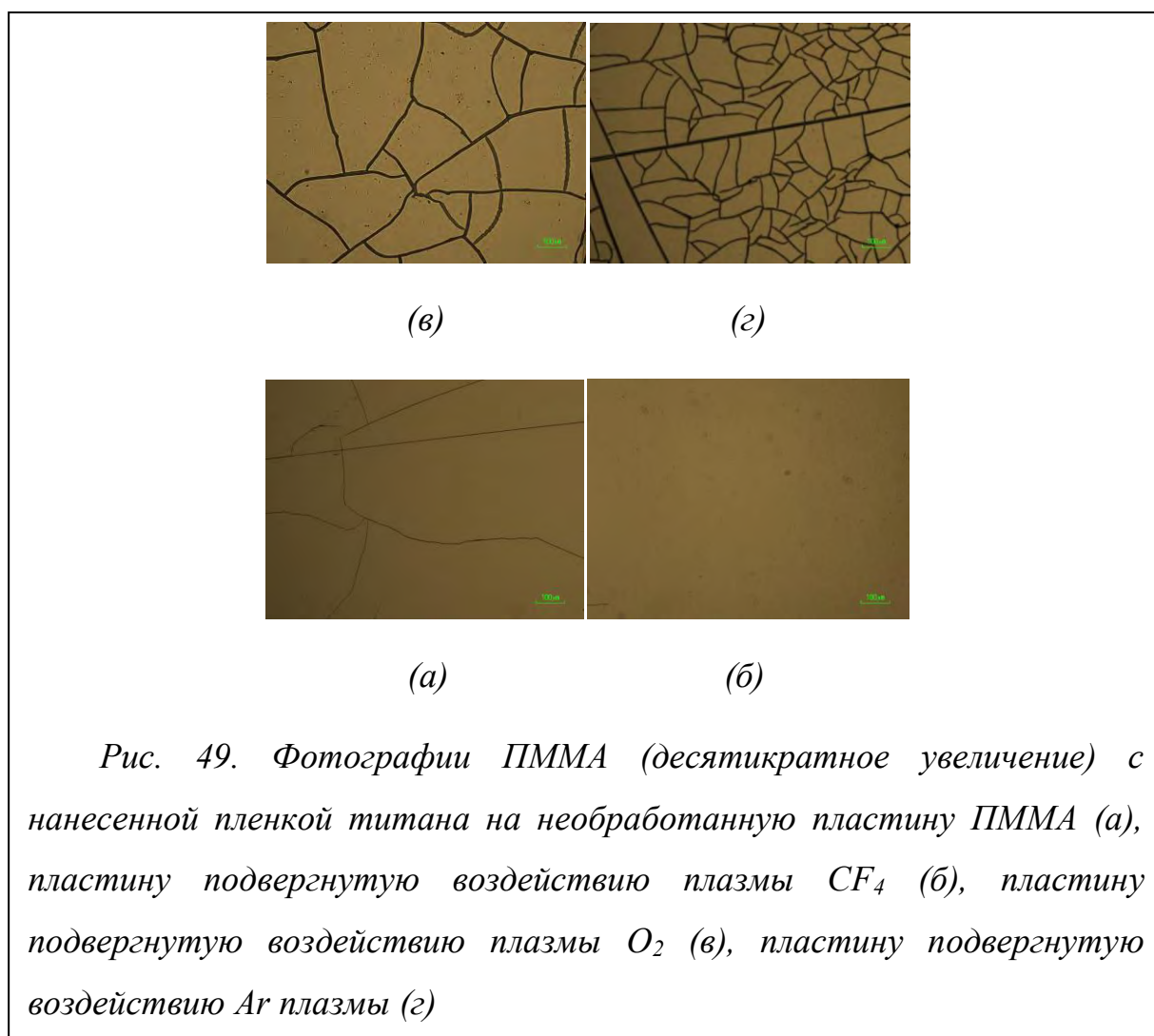
Из приведенных результатов можно заключить, что проведенные эксперименты позволили выявить способы формирования гидрофильной и гидрофобной поверхности, совместимые с разработанной технологией термического спаивания.

Напыление металлических тонких плёнок для создания проводящих слоёв (контактов)

Для ряда применений требуется формирование металлических электродов на внутренних поверхностях микрофлюидных устройств. При этом металлическое покрытие должно обладать хорошей адгезией и сплошностью.

Адгезия металла к полимеру определяется химической активностью поверхности, поэтому плазменная обработка ПММА может существенно влиять на качество проводящего покрытия. В связи с этим, была проведена серия опытов по нанесению металлических слоев на ПММА, подвергнутого воздействию нескольких видов плазменной обработки.

Пленки титана толщиной 300 нм наносились методом магнетронного распыления. Предварительное воздействие плазмы для всех газов проводилось в течение 90 с при расходе газа 0.5 л/ч и мощности плазменного генератора 40 Вт. В качестве газов были использованы CF_4 , O_2 и Ar.



На рисунке 49 представлены фотографии пластин ПММА с нанесенной пленкой титана. На рисунке 49 а показана необработанная пластина ПММА, рисунке 49 б – пластина подвергнутая воздействию плазмы CF_4 , рисунок 49 в – пластина

подвергнутая воздействию плазмы O_2 , рисунок 49 г – пластина подвергнутая воздействию Ar плазмы.

Худшее качество имела пленка, нанесенная на поверхность ПММА, обработанную фторсодержащей плазмой (Рис. 49 б). Пленка сильно растрескалась, причем количество трещин увеличилось по сравнению с пленкой, нанесенной на необработанную поверхность (Рис. 49 а). Это объясняется тем, что CF_4 делает поверхность менее химически активной за счет пассивации подложки атомами фтора.

Заметное улучшение качества проводящего покрытия дала активация поверхности ПММА кислородной плазмой (Рис. 49 в), однако лучшего результата позволила добиться обработка аргоном (Рис. 49 г). Аналогичные закономерности были выявлены и для пленок серебра.

3.5. Примеры применения разработанной технологии

Разработка экспериментальной микрофлюидной электрохимической ячейки для очистки радиофармпрепаратов

Микрофлюидные технологии могут быть использованы для очистки и улавливания радионуклидов для позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) [136]. Самым используемым диагностическим радионуклидом для ПЭТ является ^{18}F . В существующих системах синтеза препаратов, меченных ^{18}F , улавливание фтора производится на ионообменной смоле картриджа, которая адсорбирует не только фтор, но и задерживает воду. Поэтому, в дальнейшем, требуются дополнительные операции по удалению облученной воды из системы, которые усложняют процесс синтезирования, увеличивают затрачиваемое время на работу, усложняют стадию процесса очистки радиофармпрепаратов (РФП) на конечном этапе синтеза. Также минусами данной системы улавливания является недостаточно высокая эффективность адсорбции и потери радионуклида при элюировании (вымывание) с картриджа [137].

Для устранения недостатков системы улавливания ^{18}F - может быть использована электрохимическая микрофлюидная ячейка, которая будет способна посредством приложения к ней электрического потенциала осаждать ^{18}F - на поверхности одного из электродов. Такая система позволит избежать дополнительного процесса сушки системы и обойтись только продувкой инертного газа через микроканал для удаления возможных остатков воды в системе.

Процесс улавливания ^{18}F - на электроде состоит в следующем: в электрохимическую ячейку под действием потока инертного газа подается облученная H_2^{18}O , содержащая ^{18}F -. Вода прокачивается через микрофлюидную систему с определенной скоростью потока и при постоянном электрическом потенциале, приложенном между двумя электродами (катодом и анодом). Так как в систему подается отрицательно заряженный ^{18}F -, то при подаче напряжения ^{18}F - адсорбируется на электрод. Вода удаляется через отверстие в ячейке под давлением инертного газа. Для десорбции ^{18}F - на систему подается обратное напряжение.

Такой вариант электрохимической микрофлюидной ячейки представляет собой сэндвич-структуру из трех пластинок, в которой верхняя и нижняя пластины выступают в качестве электродов, а средняя имеет сквозной канал и систему резервуаров.

Для оценки рабочей длины канала предлагаемой микрофлюидной электрохимической ячейки были сделаны теоретические расчеты. Ниже представлена модель движения ^{18}F - в микрофлюидном канале в ламинарном потоке жидкости в электрическом поле, направленном перпендикулярно каналу (1). Отметим, что числа Рейнольдса для данной системы лежат в области малых чисел, поэтому поток жидкости в микроканале будет ламинарный. В общем случае движение иона в ламинарном потоке жидкости будет описываться следующим векторным уравнением:

$$m \frac{d\vec{V}}{dt} = \vec{F}(t) - 6\pi r_0 \eta (\vec{V} - \vec{U}) - \frac{2}{3} \pi \rho_{\text{ж}} r_0^3 \frac{d\vec{V}}{dt} - 6r^2 \sqrt{\pi \eta \rho_{\text{ж}}} \int_0^t \frac{d\vec{V}}{dt} \frac{dx}{\sqrt{t-x}}, \quad (1)$$

где: m - масса иона, \vec{V} - скорость иона, $\vec{F}(t)$ - внешняя сила, которая действует на ион, r_0 - радиус иона, η - динамическая вязкость среды, \vec{U} - скорость жидкости, $\rho_{\text{ж}}$ - плотность жидкости.

В выбранной модели внешней силой, действующей на ион, выступают сила тяжести и электростатическая сила:

$$\vec{F}(t) = m\vec{g} + q\vec{E}, \quad (2)$$

где: q - величина заряда, \vec{E} - напряженность электрического поля.

Векторное уравнение (1) можно записать в виде системы уравнений в проекции скоростей на оси x и y , учитывая, что третьим и четвертым членами в правой части уравнения можно пренебречь, в силу их малости и безинерционного характера сопротивления среды.

Из уравнения движения иона вдоль оси y можно найти проекцию его скорости на данную ось, которая будет определяться следующим выражением:

$$V_y(t) = \frac{g + \frac{qU}{\epsilon dm}}{\frac{6\pi r_0}{m}\eta} [1 - e^{-\frac{6\pi r_0}{m}\eta t}], \quad (3)$$

где: ϵ - диэлектрическая проницаемость, d - диаметр канала, U - напряжение.

Т.к. $\frac{6\pi r_0}{m}\eta \gg 1$, следовательно $e^{-\frac{6\pi r_0}{m}\eta t} \ll 1$, поэтому скорость иона в проекции на ось y примет следующий вид:

$$V_y(t) = \frac{g + \frac{qU}{\epsilon dm}}{\frac{6\pi r_0}{m}\eta} \quad (4)$$

Из уравнения (4) видно, что движение иона вдоль оси y является равномерным. Кроме того, так как время релаксации иона ($m/6\pi R_0\eta$) оказывается существенно меньше времени его нахождения в канале, то можно считать, что скорость движения иона вдоль оси x будет равна скорости ламинарного потока жидкости в той точке, где находится ион. Тогда движение иона в канале в поле электрического и гравитационного полей будет описываться следующей системой уравнений:

$$\begin{cases} \frac{dx}{dt} = \frac{2Q}{\pi r^4} (r^2 - y^2) \\ \frac{dy}{dt} = \frac{g + \frac{qU}{\epsilon dm}}{\frac{6\pi r_0}{m} \eta} \end{cases} \quad (5)$$

где: Q - расход жидкости.

Исключая из данных уравнений dt, получаем дифференциальное уравнение траектории иона, движущегося в микрофлюидном канале:

$$\frac{dx}{\frac{2Q}{\pi r^4} (r^2 - y^2)} = \frac{\frac{6\pi r_0}{m} \eta}{g + \frac{qU}{\epsilon dm}} dy \quad (6)$$

Интеграл уравнения (6) по всему диаметру канала дает расстояние, которое пройдет ион в горизонтальном направлении прежде, чем достигнет поверхности электрода. Таким образом, максимальное расстояние, которое проходит ион в горизонтальном направлении, и определяющее рабочую длину канала, будет определяться следующим выражением:

$$L_0 = \frac{16 \frac{6\pi r_0}{m} \eta Q}{3\pi d \left(g + \frac{qU}{\epsilon dm} \right)}, \quad (7)$$

На рисунке 50 представлены зависимости рабочей длины канала от прикладываемого напряжения и расхода жидкости. Напряжение варьировалось от 1 до 40 В, поток от 1 до 100 мкл/мин.

Теоретические расчеты в рамках приближенной модели показали, что, при расстоянии между электродами на стенках канала в 1 мм, потоке жидкости 15 мкл/мин и напряжении 20 В, оптимальная длина сквозного канала составляет около 30 мм.

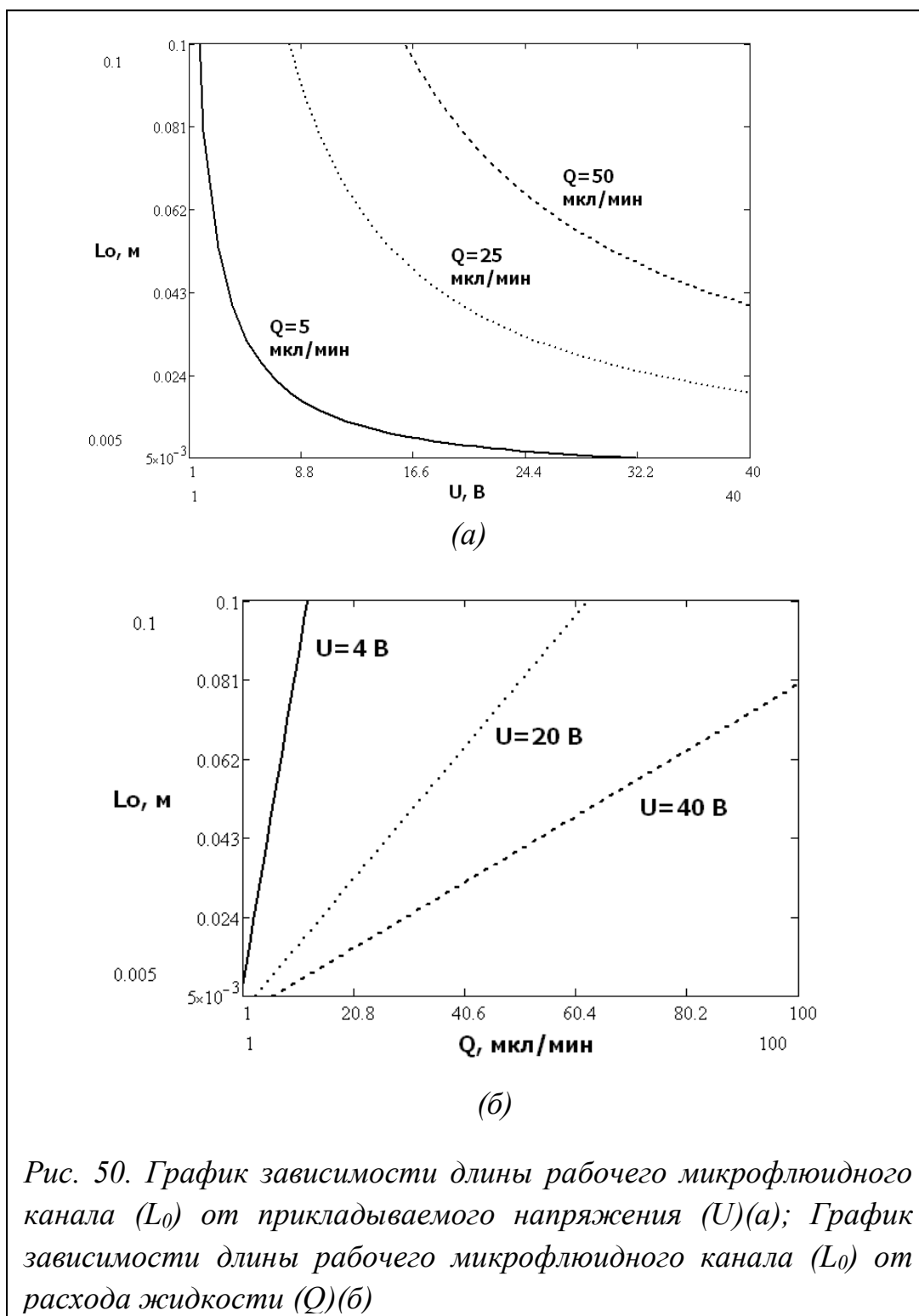
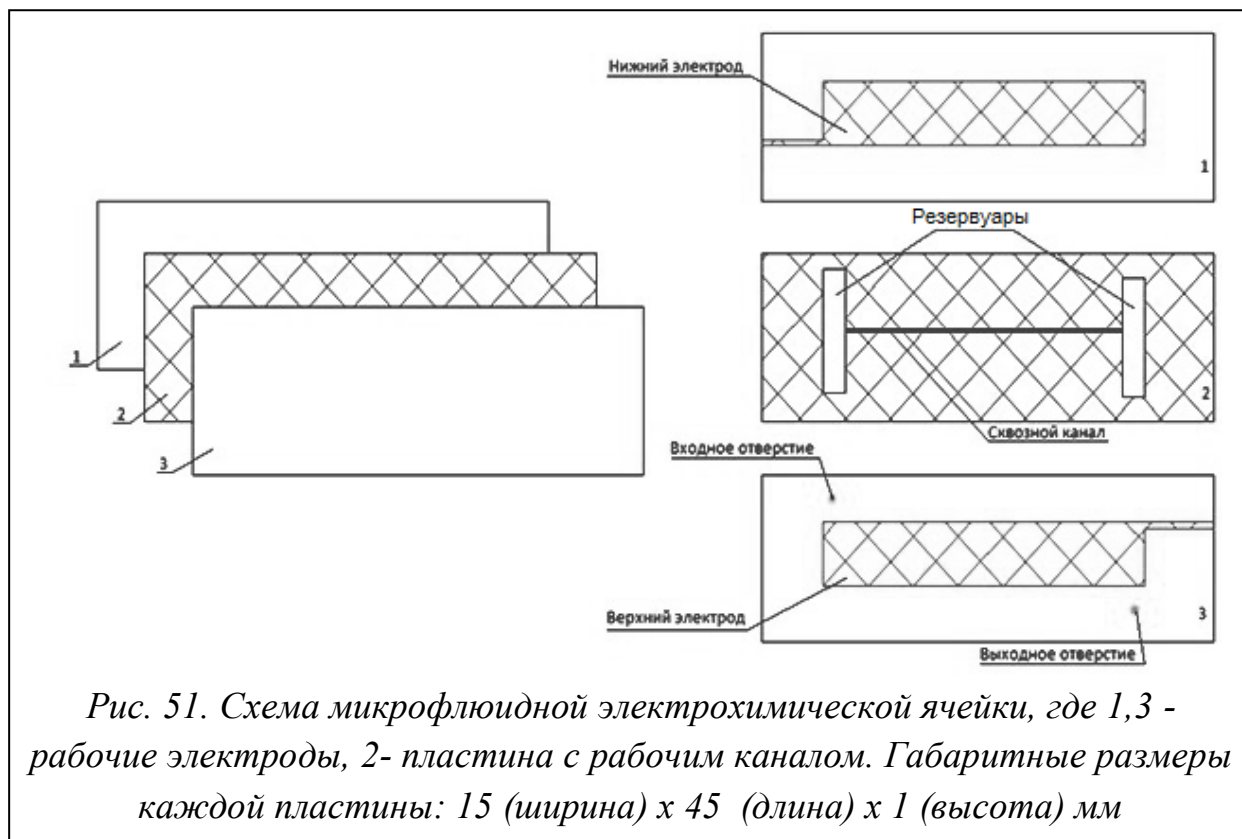


Рис. 50. График зависимости длины рабочего микрофлюидного канала (L_0) от прикладываемого напряжения (U) (а); График зависимости длины рабочего микрофлюидного канала (L_0) от расхода жидкости (Q) (б)

На основании расчетов была изготовлена микрофлюидная ячейка с требуемой длиной канала и нанесенными на его стенки электродами. Микрофлюидная электрохимическая ячейка состоит из трех одинаковых пластин литого ПММА (Рис. 51), с габаритными размерами $15 \times 45 \times 1$ мм, что позволяет сформировать на пластине канал и резервуар необходимых длины, глубины и

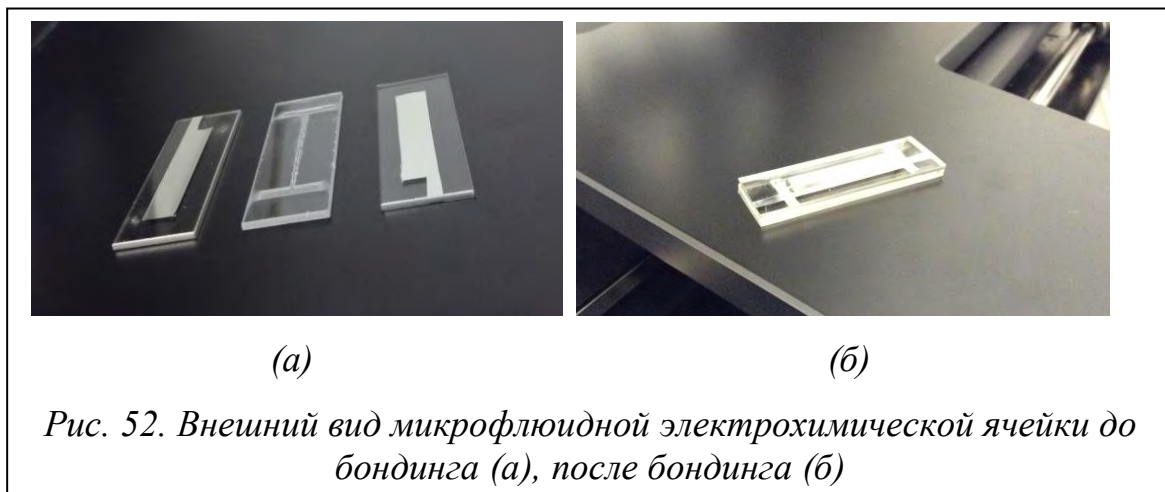
ширины. Средняя пластина имеет два резервуара – каналы загрузки/выгрузки вещества и сквозной рабочий микроканал. Параметры лазера для резервуаров и канала составили – P: 20%, V: 45%, PPI: 500, и P: 80%, V: 20%, PPI: 1000, соответственно. При таких параметрах ширина сквозного канала составила 250 мкм, а глубина резервуаров - 300 мкм. Нижняя и верхняя пластины представляют собой электроды, благодаря нанесению на внутренние поверхности пластин из ПММА проводящего слоя.



В качестве основного материала для электродов было выбрано серебро. Тонкопленочный серебряный электрод (300 нм) получали методом магнетронного распыления, со скоростью роста 5Å/сек без нагрева (при комнатной температуре) при давлении рабочего газа 1 Па. Для предотвращения взаимодействия серебра с реагентами, которые используются в процессе синтеза, слой серебра покрывали углеродом (50 нм).

На одной из уже готовых пластин, которая выступает верхней в конструкции, проделывались отверстия (P: 80%, V: 20%, PPI: 1000) для ввода/вывода растворов из микрофлюидной ячейки.

После формирования на средней пластине двух резервуаров и соединительного канала, а также нанесения серебряной тонкой плёнки и графита, три пластины, предварительно очищенные дистиллированной водой, подверглись термическому бондингу. Оптимальным оказался режим повышения температуры с 80°C до 120°C с выдержкой по 20–30 минут на каждые 10°C (Рис. 52).



Полученный чип был протестирован путем прокачки жидкости. Ввод проб осуществлялся шприцевыми насосами, которые с помощью фторопластовых капилляров и микрофлюидных фиттингов соединялись с входными и выходными отверстиями микрочипа. В работе использовались стеклянные шприцы 100 мкл Hamilton с соединением LuerLock. К шприцу через переходник (Luer адаптор 1/16" x 1/16") присоединялся фторопластовый капилляр, внешний диаметр которого составлял 1/16" и 0.01" внутренний. Рабочий диапазон объемных скоростей микрофлюидных потоков, создаваемых шприцевыми насосами, составлял от 10 до 40 мкл/мин.

Таким образом, на основе разработанных в ходе работы технологических подходов формирования МФУ была спроектирована и изготовлена микрофлюидная электрохимическая ячейка, которая потенциально пригодна для синтеза РФП.

Микрофлюидный фотобиореактор

В качестве еще одного примера создания прототипа МФУ по разработанной технологии был изготовлен микрофлюидный генератор кислорода с помощью

микроорганизмов хлорелла вульгарис. В перспективе глубокого освоения космоса и длительных космических полётов встает сложная задача регенерации кислорода в замкнутых системах космических аппаратов. Одним из подходов ее решения является использование одноклеточных фототрофных микроорганизмов. Для эффективной наработки кислорода нужно одновременно обеспечить как высокую концентрацию микроорганизмов в среде, так и максимально эффективное воздействие света на них. Высокая концентрация организмов в биомассе приводит к тому, что свет преимущественно поглощается в приграничной области сосуда, и результатом становится низкая эффективность метода. Очевидным выходом из ситуации представляется локализация биомассы в тонких замкнутых объемах с активной циркуляцией для перемешивания внешних и глубоких слоев, то есть, создание микрофлюидного устройства.

На рисунке 53 представлен прототип микрофлюидного генератора кислорода. Чип представлял собой конструкцию из 5 слоёв, герметично спаянных между собой. В подложках ПММА вырезались сквозные отверстия, которые после спайки представляли собой довольно глубокие резервуары (порядка 3 мм) для роста хлореллы вульгарис. Параметры лазера, использованные для резки отверстий: мощность – 80%, скорость сканирования – 15%, разрешение – PPI: 1000. «Загрузка» хлореллы проводилась посредством пипетдозатора (Eppendorf) через отверстия в крышке чипа, таким же образом туда доставлялась вода. Чип был изготовлен с помощью разработанных в работе подходов бондинга и совмещения пластин ПММА.

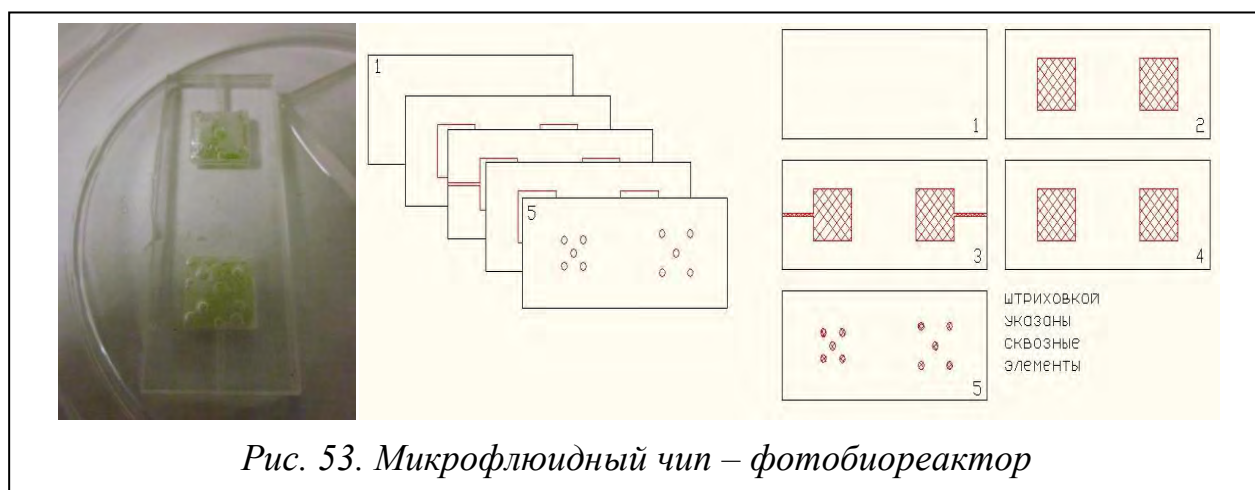


Рис. 53. Микрофлюидный чип – фотобиореактор

Выводы

В главе представлены результаты разработки технологического маршрута формирования микрофлюидных устройств из ПММА. По итогам исследования возможностей разнообразных подходов обработки ПММА получена полная цепочка согласующихся друг с другом технологических этапов, позволяющая создавать МФУ широкого спектра назначений на доступном оборудовании. Разработанная технология включает следующие элементы:

- Формирование микроканалов в ПММА методом лазерной гравировки CO² ИК лазером;
- Термическое спаивание (бондинг) пластин с микроканалами;
- Обработка микроканалов для придания им гидрофобных и гидрофильных свойств;
- Формирование проводящих электродов (металлических контактов);
- Совмещение многослойных МФУ.

Одним из наиболее важных результатов является продемонстрированная возможность бондинга пластин ПММА с микроканалами при температуре 120°C и давлении 1000–1500 мбар. Более того, показано, что температуру спаивания ПММА можно снизить до 90–100°C за счет обработки пластин озоном и УФ. Таким образом, в результате исследования разработан способ бондинга пластин ПММА при давлениях, которые на порядки меньше давлений, использовавшихся во всех предыдущих работах при аналогичных температурах процесса. Этот результат позволяет удешевить и упростить процесс создания МФУ по сравнению с уже существующими методами.

В качестве примеров приложения разработанной технологии изготовлены прототипы МФУ для улавливания радионуклидов, используемых в позитронно-эмиссионной томографии, и микрофлюидный генератор кислорода с использованием микроорганизма хлореллы вульгарис.

4. Кристаллизация белков в микрофлюидном чипе методом микробатч и проведение РСА

Изучение пространственных структур биологических макромолекул имеет крайне важное значение для понимания молекулярных механизмов работы клетки и ее отдельных компонентов, что в дальнейшем позволяет создавать инновационные лекарственные препараты. Более 80% структур, депонированных в базу данных белков (Protein data bank), расшифрованы с помощью рентгеноструктурного анализа (РСА), который позволяет определять структуру макромолекулы с максимальным, по сравнению с другими методами, разрешением. Основным ограничением данного метода является необходимость получения кристалла исследуемого образца высокого качества.

К настоящему моменту отсутствует достаточно проработанная теория кристаллизации биологических макромолекул, которая позволила бы заранее определить диапазон физико-химических параметров, необходимый для роста кристалла. В связи с этим, подбор условий кристаллизации для нового объекта, называющийся кристаллизационным скринингом, носит эмпирический характер и сводится к перебору большого количества кристаллизационных “коктейлей” методом проб и ошибок.

Процедура выращивания белковых кристаллов осуществляется за счет медленного осаждения белка из слабо пересыщенных растворов [106]. Варьируя физические (температура, давление) и химические (рН, осадитель и его концентрация, ионная сила, концентрация белка) параметры, можно уменьшать растворимость белка, вплоть до насыщения или пересыщения раствора [94]. Комбинация этих параметров приводит к созданию сотен различных условий. Поэтому в настоящий момент наблюдается растущий интерес к разработке миниатюрных устройств, позволяющих снизить расход образца за счет постановки кристаллизационного эксперимента в нанолитровом объеме.

В связи с этим все более широкое применение получает микрофлюидика и микрофлюидные системы, имеющие преимущество не только в использовании малого объема вещества, но и в простом изготовлении, а также осуществлении

прецизионного контроля потока жидкостей, точного управления параметрами процесса кристаллизации и других опций [138].

В основе микрофлюидного кристаллизатора лежит идея о создании в протяженном микроканале большого числа капель-микрореакторов, в которых реализуются условия для кристаллизации белковых молекул, разделенных между собой жидкостью-носителем, несмешиваемой с содержимым микрореакторов [101]. При этом различное соотношение буферного раствора, белка и осадителя в каплях-микрореакторах осуществляется за счет точного управления потоками жидкости, поступающими в микроканалы посредством шприцевых насосов.

Стоит отметить, что многие ведущие компании (такие как, Hitachi, Agilent Technologies, Dolomite и др.) финансируют исследования для развития микрофлюидики, так как новые технологии и успехи в данной области позволяют достичь принципиально новых результатов [95,96,139,140]. Увеличивается как коммерческая привлекательность микрофлюидных систем, так и количество научных изданий, публикующих статьи на эту тему (Science, Nature, Chemical Society Reviews, Biosensors & Bioelectronics), в том числе и специализированных (Lab on a Chip, Microfluidics and Nanofluidics, Biomicrofluidics).

Несмотря на активно развивающиеся технологии создания микрофлюидных систем, последние используются в основном только для проведения кристаллизационного скрининга [141,142].

В настоящем разделе описаны разработка, изготовление и испытание разборного микрофлюидного чипа (МФЧ) для получения белковых кристаллов и исследования их структуры *in situ* методом РСА непосредственно в МФЧ без дополнительных операций по извлечению кристаллов и использования криопротекторов, которые могут влиять на качество дифракционных картин.

4.1. Разработка капельного микрофлюидного реактора

Микрофлюидные системы делают возможным формирование капель исследуемой жидкости экстремально малых объемов (десятки и даже единицы микро- и нанолитров) за счет пропускания двух несмешивающихся жидкостей

через систему микроканалов. Малый размер каналов дает два важных преимущества. Первое – возможность кардинально сократить объемы препаратов. Второе— формирование ламинарных контролируемых потоков, которые сложно создать в каналах и сосудах макроскопических размеров. Диаметры микроканалов обычно составляют от десятков до нескольких сотен микрометров, что делает влияние гравитации и инерционных эффектов, которые приводят к возникновению конвекционных потоков и турбулентных завихрений, пренебрежимо малыми.

На сегодняшний день разработаны и исследованы различные геометрии каналов для формирования капель, но наиболее простым в реализации и использовании является, так называемое, Т-образное соединение входных каналов МФУ (Рис. 54).



Как видно на рисунке 54, схема получила свое название за характерную Т-образную форму. Дисперсная фаза (чаще всего, водный раствор реагентов) подается через боковой отвод, перпендикулярный основному каналу. Сам прямой канал используется для подачи жидкости носителя (непрерывная фаза). При формировании капель водных растворов обычно используется масло, которое не смешивается с водой и имеет более высокую вязкость. Именно Т-образная геометрия использовалась при создании капельных МФУ в данной работе.

4.1.1. Стадии и режимы формирования капель в Т-образной геометрии

Механизмы образования капель в Т-образных каналах были широко исследованы за последние 15 лет. В этом процессе выделяют несколько стадий периодически повторяющихся стадий, зафиксированных на рисунке 55 [143].

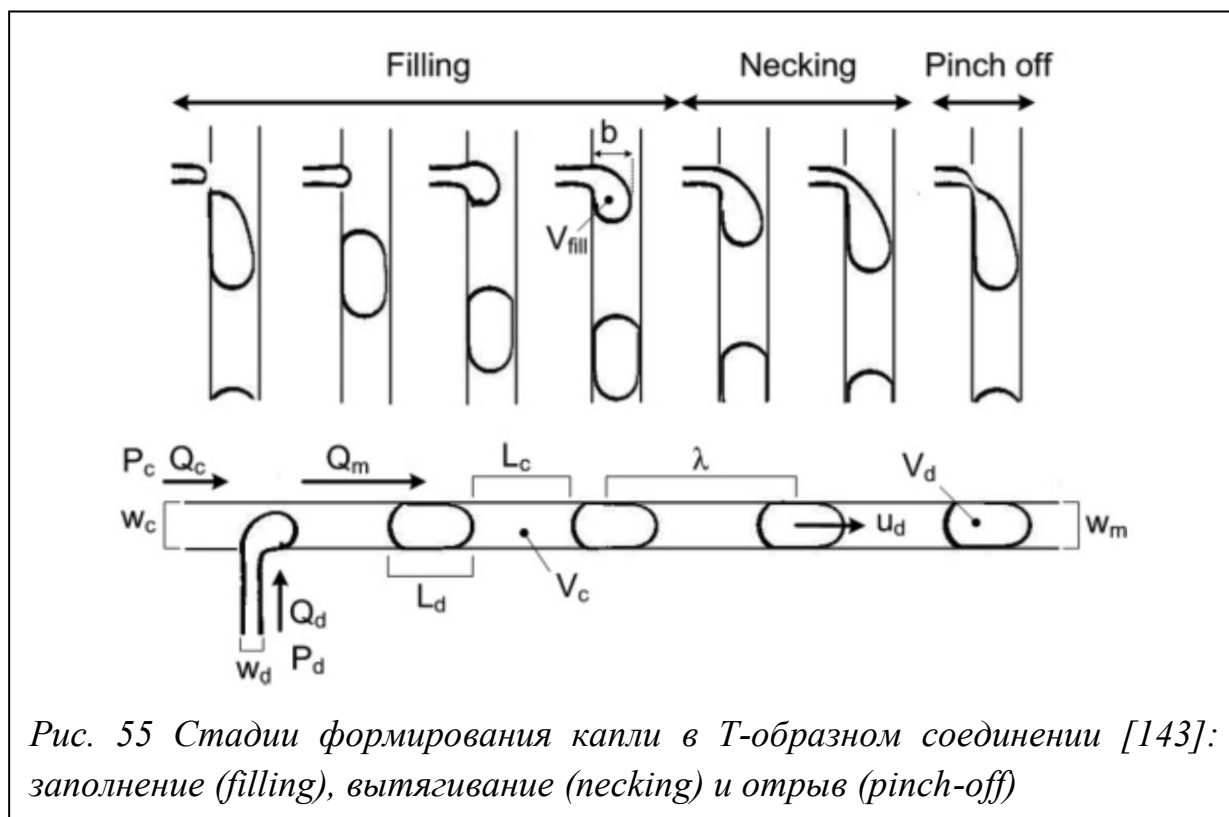


Рис. 55 Стадии формирования капли в Т-образном соединении [143]:
заполнение (filling), вытягивание (necking) и отрыв (pinch-off)

Первая стадия – заполнение (filling). На этом этапе дисперсная фаза из бокового канала проникает в основной поток жидкости носителя. Выступающий пузырек растет до момента, пока не достигнет критической глубины проникновения b , которая определяется силами, действующими на формирующуюся границу между дисперсной фазой и носителем. В это время непрерывная фаза обтекает растущую каплю и заполняет пространство перед ранее оторвавшейся каплей, увеличивая, таким образом, расстояние между каплями.

Следующая стадия – вытягивание (necking). Растущая капля частично перекрывает основной канал, что приводит к росту давления в непрерывной фазе. Эта сила напорающего потока давит на каплю, сжимая ее основание у входа бокового канала. При этом дисперсная фаза продолжает заполнять каплю и увеличивать ее размер.

Последняя третья фаза – отрыв (pinch-off). В конце концов, капля достигает критического размера, при котором силы потока непрерывной фазы отрывают ее от бокового канала. Отсоединившись, капля дисперсной фазы движется дальше вдоль канала, и весь цикл повторяется снова.

Конечный объем капли представляет собой сумму объема к концу стадии заполнения и объема, закачанного перед отрывом капли на стадии вытягивания. Эти объемы зависят от большого числа параметров, включая геометрических размеров каналов, соотношения потоков непрерывной и дисперсной фазы, отношения их вязкостей и т.д.

Экспериментальные и теоретические исследования выявили три принципиально отличных друг от друга режимов взаимодействия двух несмешивающихся жидкостей Т-образных соединениях, которые, в целом, воспроизводятся и при других геометриях МФУ:

- Капельный режим (dripping mode)
- Режим выдавливания (squeezing mode)
- Режим параллельного течения потоков (parallel flow)

При изменении параметров системы перечисленные режимы сменяют друг друга не резко, а через переходные состояния. Моды течения капель в канале наглядно показаны в микрофотографиях на рисунке 56.

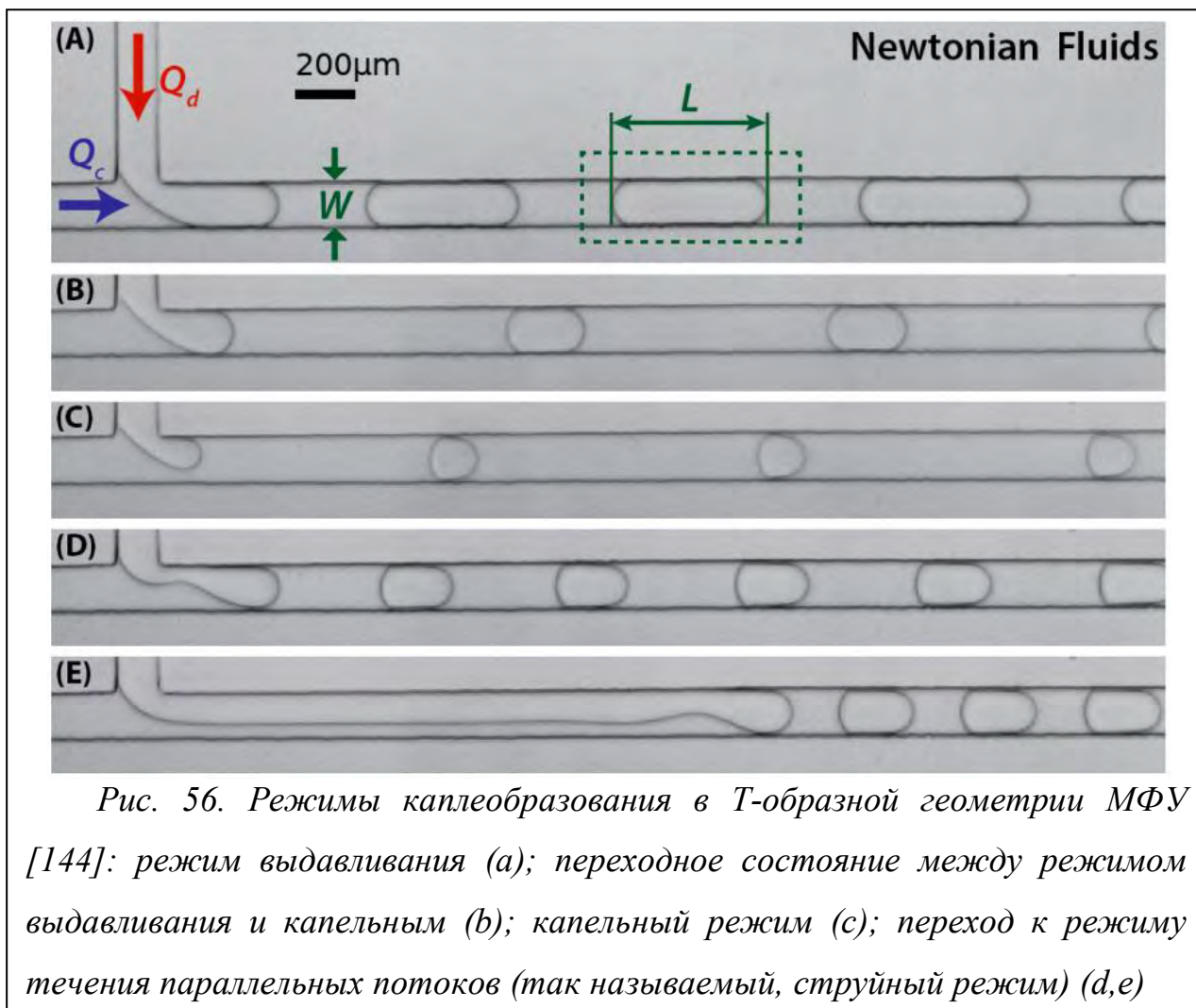


Рис. 56. Режимы каплеобразования в T-образной геометрии МФУ [144]: режим выдавливания (a); переходное состояние между режимом выдавливания и капельным (b); капельный режим (c); переход к режиму течения параллельных потоков (так называемый, струйный режим) (d,e)

Капельный режим выделяется тем, что в нем практически отсутствует стадия вытягивания. Заполняемая капля не успевает перекрыть основной канал, то есть не достигает его противоположной стенки на стадии заполнения. При этом образуются круглые пузырьки/капли дисперсной фазы, то есть, длина и диаметр капли совпадают (Рис. 56 c).

В режиме выдавливания могут образовываться капли различного объема, причем длина капель превосходит их диаметр. Работа в этом режиме позволяет контролировать объем капель в широких диапазонах, получая пузырьки дисперсной фазы длиной от одного до нескольких десятков диаметров канала.

В режиме течения потоков две жидкости параллельно текут вдоль канала не смешиваясь. В переходном моде между параллельным и выдавливающим режимами капли всё же могут формироваться на значительном удалении бокового ввода (Рис. 56 e). Этот режим называют струйным.

4.1.2. Управление режимами образования капель

При проектировании капельного микрофлюидного чипа для экспериментов по кристаллизации белков требовалось определить, какой режим каплеобразования будет в большей степени соответствовать поставленным задачам, а также выделить параметры, которые будут обеспечивать реализацию выбранного режима.

Возможность контролировать размеры капель в широком диапазоне делает режим выдавливания наиболее предпочтительным благодаря гибкости, которую он предоставляет. Рассмотрим, какими факторами он обусловлен.

Для начала, чтобы наглядно представить связь между режимами, обратимся к частной упрощенной картине. При определенных геометрических параметрах МФУ и типах жидкостей, используемых в качестве дисперсной и непрерывной фаз, есть возможность наблюдать все три режима, просто изменяя соотношение между потоками фаз.

Величина Q , равная отношению величины объемного потока дисперсной фазы Q_d (водного раствора), к потоку непрерывной фазы (масла) Q_c , является одним из безразмерных параметров, используемых при количественном описании геометрии капель. Таким образом, малые значения $Q = Q_d/Q_c$ соответствуют малому потоку дисперсной фазы и большому потоку непрерывной (вода подается медленнее, чем масло). Большие значения Q , наоборот, соответствуют низкой скорости подачи масла по сравнению с водой.

При соответствующей геометрии каналов и вязкостях жидкостей, изменения Q от малых значений к большим позволяет последовательно проходить капельный режим, режим выдавливания и затем переводить систему в состояние параллельных потоков. То есть, при увеличении потока воды для фиксированного потока масла, размер капель увеличивается, пока они не превратятся в непрерывный поток. Наоборот, увеличение потока масла при фиксированном потоке воды уменьшает размер капель и, в конечном счете, переводит систему в капельный режим.

Какие механизмы управляют сменой и установлением мод поведения дисперсной фазы? Ключевыми стадиями образования капли являются вытягивание и отрыв. Их наступление определяется конкуренцией между тремя силами: вязкое трение между фазами, силой поверхностного натяжения на границе раздела фаз и гидростатическое давление жидкости носителя на каплю. Для количественного анализа соотношения этих сил можно использовать три безразмерных параметра:

- соотношение потоков фаз $Q = Q_d/Q_c$ связано с отношением давлений во входных каналах и удобно в использовании, поскольку потоки непосредственно задаются системой подачи при проведении экспериментов.

- отношение вязкостей дисперсной и непрерывной фаз $m = \mu_d/\mu_c$

- капиллярное число $Ca = \mu U/\sigma$, где U – скорость течения непрерывной фазы по основному каналу до ввода Т-соединения, а σ – поверхностное натяжение на границе фаз. Капиллярное число позволяет сопоставить между собой величины сил поверхностного натяжения и вязкого трения. Силы вязкого трения пропорциональны вязкости и скорости течения жидкостей, поэтому в знаменателе присутствует также скорость течения непрерывной фазы.

Рассмотрим последовательно взаимодействие сил гидростатического давления, вязкого трения и поверхностного натяжения на границах капельного, выдавливающего и параллельного режимов.

4.1.3. Капельный и выдавливающий режимы

На стадии заполнения капля находится под воздействием силы поверхностного натяжения, стремящейся уменьшить площадь поверхности интерфейса и сохранить его целостность. Также на каплю действует вязкая сила со стороны основного потока жидкости-носителя, стремящаяся сдвинуть и растянуть каплю в направлении течения. Величина вязкого трения пропорциональна произведению вязкости непрерывной фазы величине ее потока. Поверхностное натяжение интерфейса оказывает сопротивление деформирующему воздействию вязкой силы за счет перепада давлений между

фазами. Величина этого перепада пропорциональна кривизне интерфейса и поверхностному натяжению σ . По мере роста капли, она заполняет основной канал, что приводит к возрастанию давления со стороны натекающей жидкости-носителя. Поскольку непрерывная фаза обтекает каплю, давление потока резко возрастает с уменьшением зазора между каплей и стенками основного капилляра.

Таким образом, отрыв капли может произойти из-за вязкой силы, оттягивающей каплю, или за счет растущего гидростатического давления потока жидкости-носителя [145]. При доминирующей роли вязкой силы устанавливается капельный режим. Если вязкая сила недостаточно велика, отрыв капли происходит за счет гидростатической силы, и реализуется режим выдавливания. Авторы исследований полагают, что граница между режимами определяется в первую очередь отношением вязкостей жидкостей. В частности, если $m = \mu d / \mu c < 0.02$ (высокая вязкость масла), переход в режим выдавливания при изменении соотношений потоков в принципе не происходит [146,147]. Условия высокой вязкости непрерывной фазы соответствуют высоким значениям капиллярного числа Ca .

При малых величинах $Ca < 0.1$ доминирующей силой становится гидростатическое давление, что обеспечивает наличие режима выдавливания. Важной особенностью режима выдавливания, установленной экспериментально [145,148], является то, что размер капель определяется в первую очередь соотношением потоков (Рис. 57).

Таким образом, граница между капельным и выдавливающим режимами определяется величиной капиллярного числа и отношением вязкостей жидких фаз. Переход в режим выдавливания происходит, когда сила гидростатического давления потока превосходит силу вязкого трения. Для реализации выдавливающего режима нужно обеспечить значения капиллярного параметра Ca меньше 0.1, а вязкость жидкости носителя не должна сильно превосходить вязкость дисперсной фазы.

Что касается размеров капель, то при режиме выдавливания их размеры должны быть связаны с отношением потоков следующим выражением:

$$L/W = a + b \cdot Q_d/Q_c, \quad (8)$$

где L/W – отношение длины капли к ее диаметру, a, b – безразмерные константы.

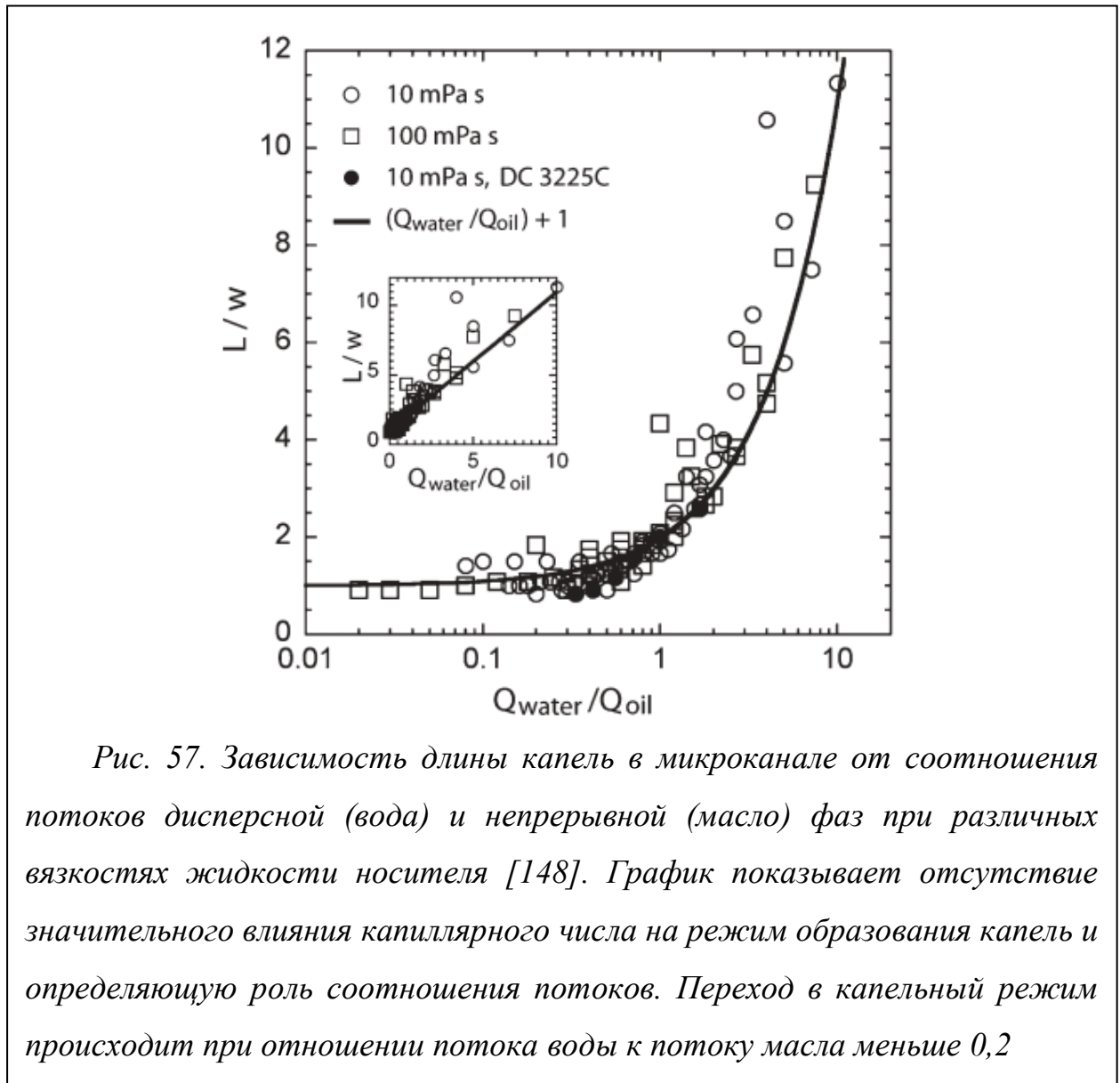


Рис. 57. Зависимость длины капель в микроканале от соотношения потоков дисперсной (вода) и непрерывной (масло) фаз при различных вязкостях жидкости носителя [148]. График показывает отсутствие значительного влияния капиллярного числа на режим образования капель и определяющую роль соотношения потоков. Переход в капельный режим происходит при отношении потока воды к потоку масла меньше 0,2

4.1.4. Режимы выдавливания и параллельного течения жидкостей

Переход в режим параллельного течения потоков происходит при увеличении отношения потока дисперсной фазы к потоку непрерывной. Размер капель при этом растет и, в конечном счете, их отрыв перестает происходить. Исследования условий этого перехода показали [149], что определяющую роль играет значение капиллярного числа Ca и отношение вязкостей фаз. Увеличение относительной вязкости жидкости носителя при постоянном Ca , как и увеличение

Са за счет поднятия потока непрерывной фазы при фиксированной вязкости, приводят к тому, что переход в параллельный режим происходит при меньших отношениях потока воды к потоку масла (Рис. 58).

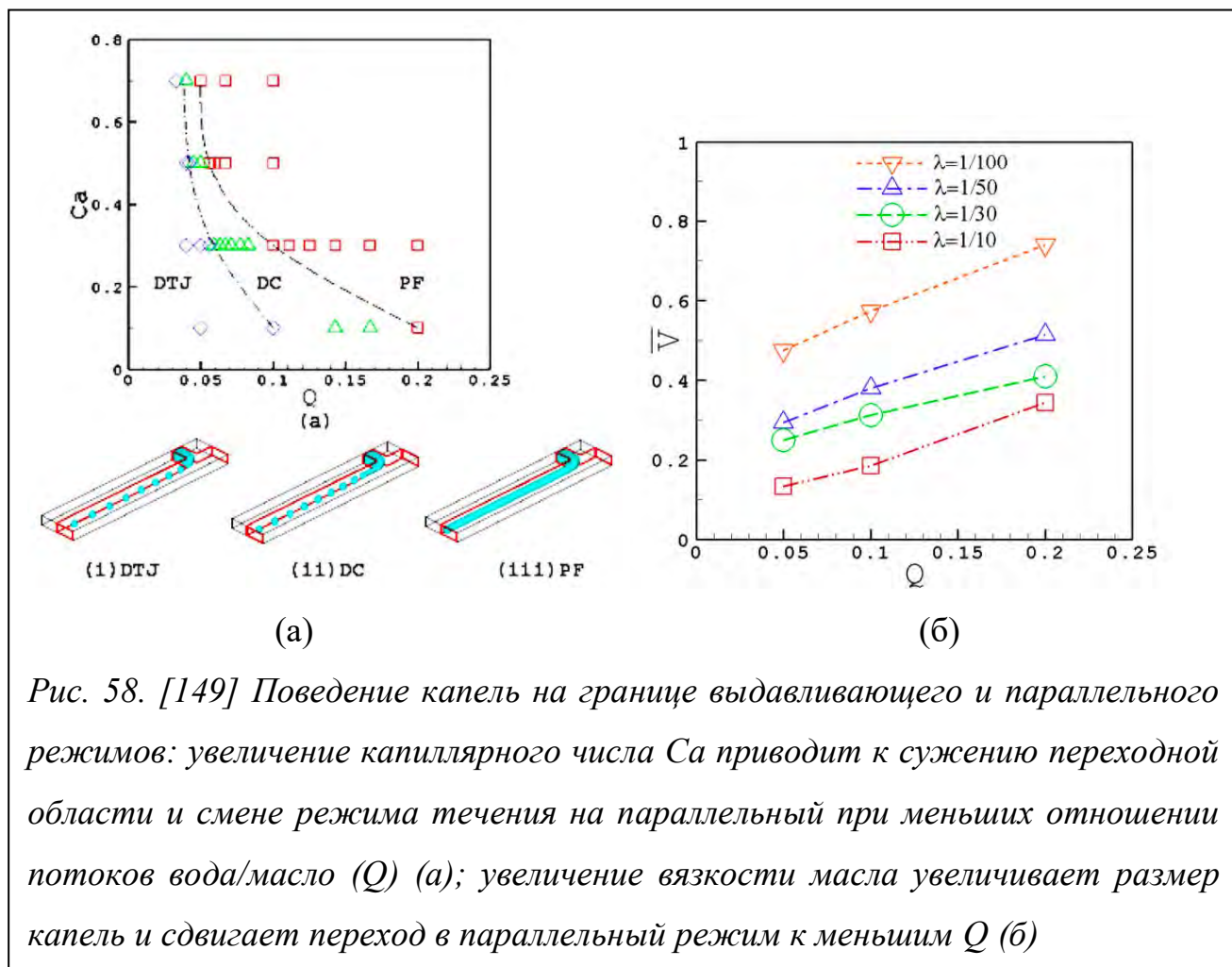


Рис. 58. [149] Поведение капель на границе выдавливающего и параллельного режимов: увеличение капиллярного числа Ca приводит к сужению переходной области и смене режима течения на параллельный при меньших отношении потоков вода/масло (Q) (а); увеличение вязкости масла увеличивает размер капель и сдвигает переход в параллельный режим к меньшим Q (б)

Интересно, что переход в режим параллельных потоков происходит за счет того, что роль вязких сил становится доминирующей, как и при капельном режиме.

4.1.5. Создание требуемых условий каплеобразования

Как отмечалось выше, для кристаллизационных экспериментов предпочтительно создать условия, соответствующие режиму выдавливания, поскольку это делает возможным формирования капель разных размеров за счет изменения отношения потоков водного раствора и жидкости носителя.

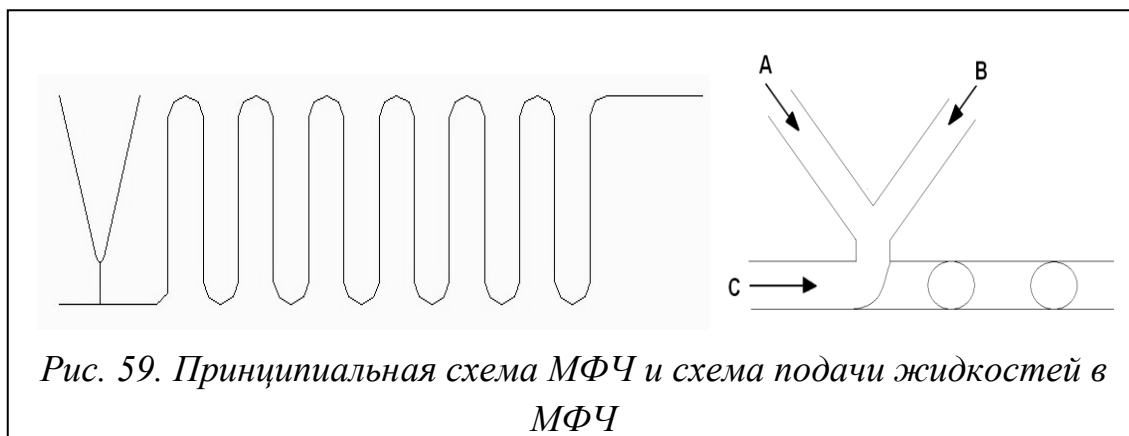
Анализ результатов предыдущих исследований показал, что необходимо выполнение двух условий:

- 1) Соотношение вязкостей воды и масла-носителя не должно быть меньше 1/50. В противном случае, режим выдавливания не будет реализуем в принципе.
- 2) Капиллярное число должно быть достаточно малым ($Ca < 0.1$), чтобы интервал соотношений потоков жидкостей, в котором течение не переходит в параллельный или промежуточный режим, был как можно шире.

В целом, оба условия могут быть выполнены за счет выбора жидкостиносителя с относительно невысокой вязкостью. Диапазон размеров микроканалов, которые были описаны в предыдущей главе, также позволяет получить подходящие значения Ca при разумных потоках жидкостей. При этом, режим выдавливания должен реализоваться при соотношениях потоков воды и масла в интервале от 0.1 до 1. Размеры капель (отношение длины к диаметру) должны подчиняться линейному закону $L/W = a+b*Qd/Qc$.

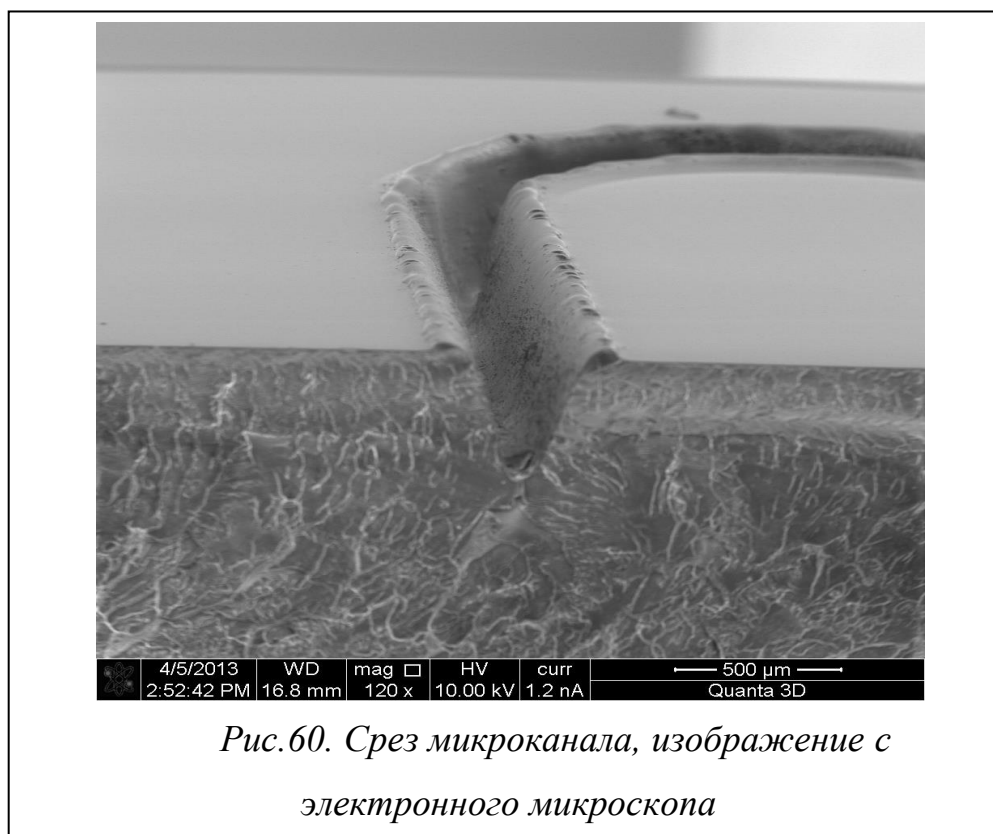
4.2. Формирование микрофлюидных чипов

На рисунке 59 представлен дизайн микрофлюидного чипа для создания большого числа капель-микрореакторов. Чип оснащен тремя вводами. Вдоль канала С подается жидкость-носитель – масло. Через каналы А и В к Т-образному сочленению подаются компоненты белкового раствора. Наличие двух каналов для ввода дисперсной фазы позволяет формировать капли раствора с различными концентрациями реагентов. Подобная конструкция реализует идею о формировании в протяженном микроканале большого числа капель-микрореакторов, в которых воспроизводятся различные условия кристаллизации белковых молекул, разделенных между собой жидкостью-носителем, несмешиваемой с содержимым микрореакторов. Таким образом, через каналы А и В могут подаваться белок в буферном растворе (А) и преципитат/осадитель (В). Различные соотношения раствора белка и осадителя в каплях-микрореакторах создаются за счет точного управления потоками жидкости, поступающими в микроканалы из шприцевых насосов.



Для исследований в рамках работы были также созданы чипы с простым Т-образным входом для введения готового водного раствора.

Чипы с описанным дизайном были изготовлены по технологии, представленной в предыдущей главе. Устройства состояли из двух пластин ПММА. В одной из них были сформированы каналы шириной 225 мкм и глубиной 325 мкм. Срез подобного канала показан на рисунке 60.



Фотография одной из пластин ПММА с подготовленными каналами представлена на рисунке 61.



Во второй пластине (крышке чипа) были проделаны отверстия для ввода жидкостей. Заданные параметры лазера составляли – P: 70%, S: 15%, PPI: 1000.

Перед бондингом поверхность пластин ПММА с каналами была подвергнута механической полировке для удаления напылов по краям каналов. Термическая спайка осуществлялась при давлении 1500 мбар в течение 15 минут.

4.3. Наблюдение процессов формирования капель в изготовленных микрофлюидных чипах

Подача жидкостей в МФЧ производилась с помощью шприцевых насосов KDS Legato 210, потоки жидкостей варьировались от 1 до 50 мкл/мин. В качестве непрерывной фазы использовались парафиновое и силиконовое масла с вязкостью 40 и 5 мм²/с, соответственно. В роли дисперсной фазы выступала деионизованная вода, предварительно подкрашенная синим красителем (Бриллиантовый крезиловый синий) для визуализации каплеобразования.

Первоначально, в качестве жидкости носителя было выбрано парафиновое масло с достаточно высокой вязкостью в 40 мм²/с. Парафиновое масло является инертной средой, не смешивается с водой, органическими растворами, а также не взаимодействует с ПММА.

К сожалению, эксперимент показал, что из-за высокой вязкости парафинового масла и малого размера каналов шприцевые насосы плохо справляются с прокачкой жидкостей через чип. Кроме того, из-за сильного разности в вязкости масло выдавливало воду из основного канала (Рис. 62). Даже сильные изменения скорости потоков не дали положительных результатов – при заметном снижении скорости одной из жидких сред, вторая начинала выдавливать первую из канала. В связи с этим, было решено использовать силиконовое масло марки ПМС-5, вязкость которого в восемь раз ниже.



Проведение опытов с силиконовым маслом не вызвало проблем: капли формировались стабильно, а их размер менялся в зависимости от соотношений потоков воды и масла. На рисунке 63 представлена фотография микрофлюидного чипа, в котором соотношение потоков менялось непосредственно в процессе прокачки жидкостей через каналы.

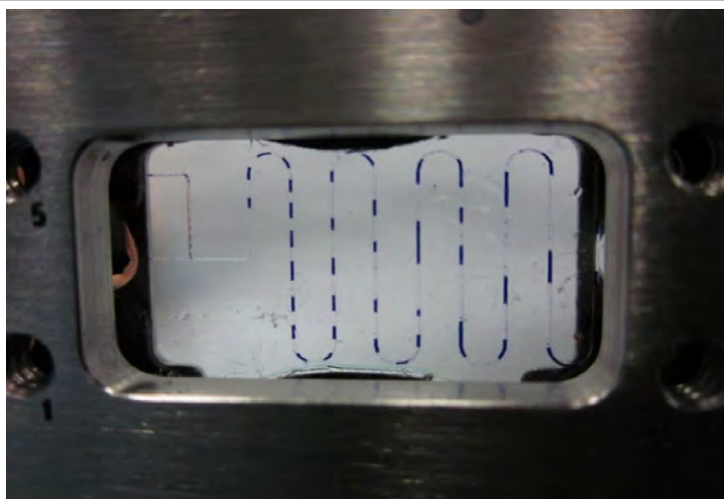


Рис. 63. Подкрашенные капли воды в масле. Наглядно продемонстрирована зависимость размера капли-микрореактора от соотношения скоростей жидкостей

На рисунке 64 представлена фотография чипа, в котором отношение потоков воды и масла составляло 1:2, а размер капель был порядка 800 мкм.

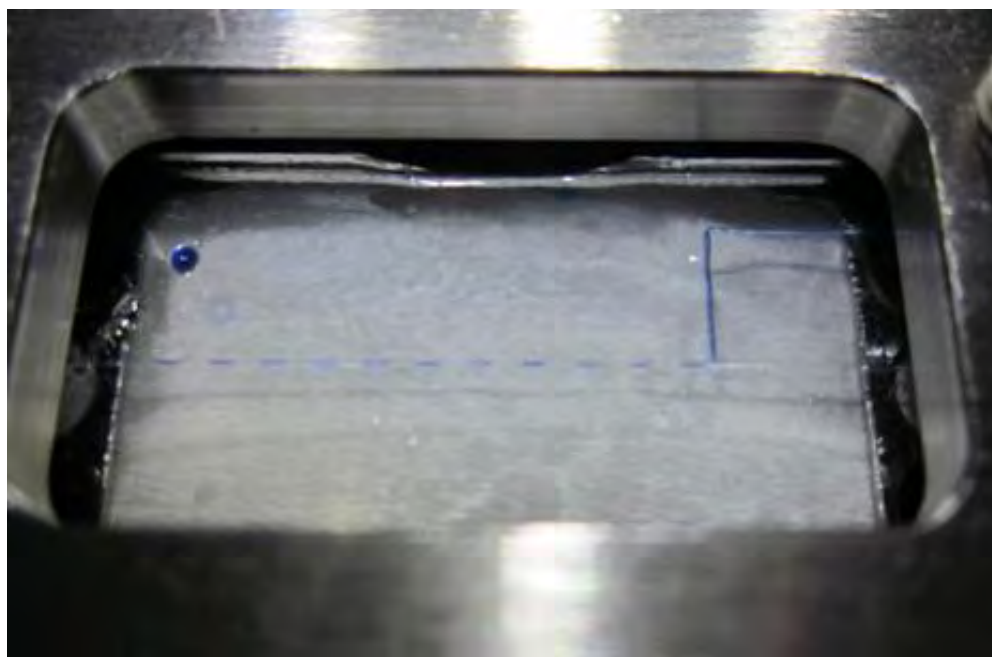


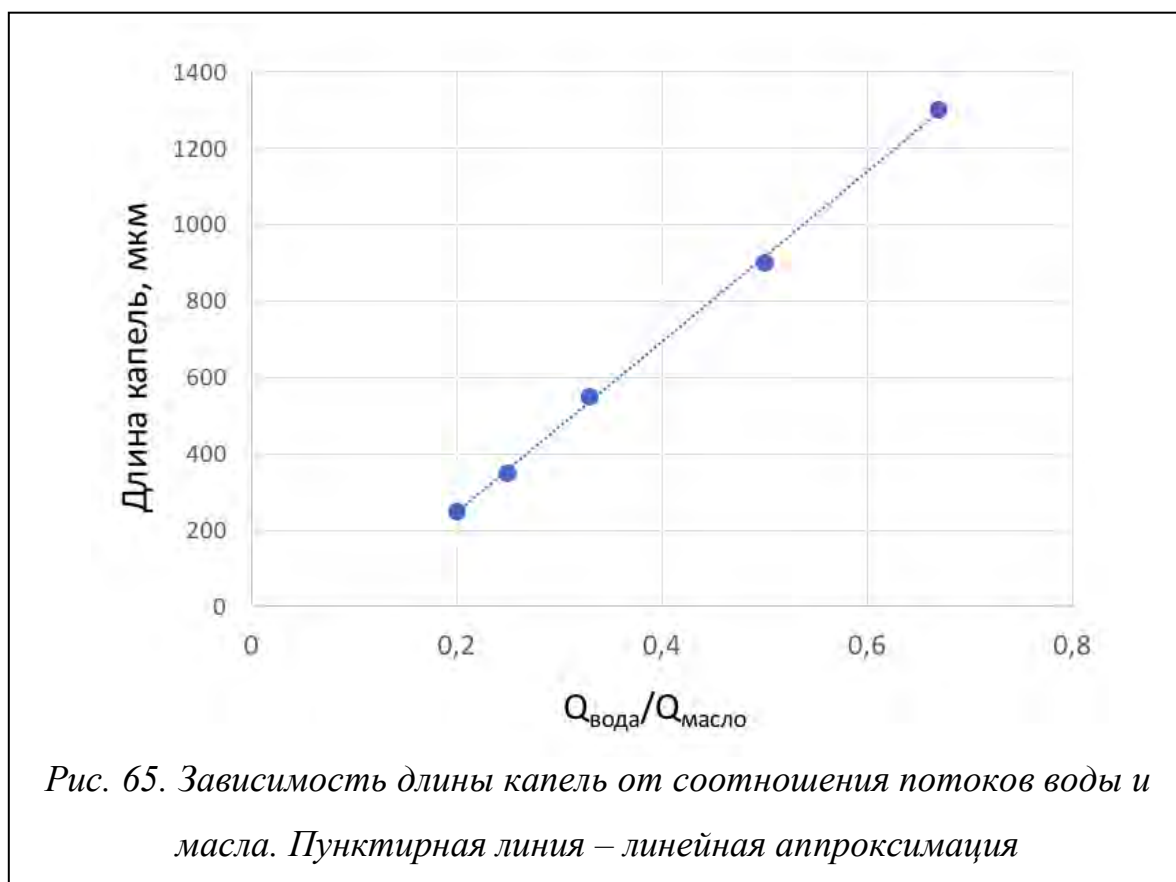
Рис. 64. Формирование капель-микрореакторов объемом 0.15 мкл (150 нл) в Т-образном соединении. (характерные размеры цилиндрической капли 800 x 200 мкм)

Далее были проведены наблюдения за зависимостью размеров капель воды от соотношения потоков воды и масла. Поток воды был зафиксирован на

значении 10 мкл/мин. Поток масла варьировался от 15 до 50 мкл/мин. Конечные результаты замеров капель в проведенной серии экспериментов представлена в таблице 2. На рисунке 65 представлен график зависимости среднего размера капель от отношения потока воды к потоку масла.

Таблица 2. Размеры капель в зависимости от отношения скоростей потоков

Поток воды, мкл/мин	Поток масла, мкл/мин	Отношение потоков (вода/масло)	Средняя длина капли, мкм	Разброс длин капель, мкм	L2 межкапельное расстояние), мкм
10	50	1/5	250	200 – 300	≈ 400 – 600
10	40	1/4	350	300 – 400	≈ 400 – 600
10	30	1/3	550	500 – 600	≈ 600
10	20	1/2	900	800 – 1000	≈ 400 – 600
10	10	2/3	1300	1200 – 1400	≈ 300 – 400



Как видно из графика на рисунке 65, длина капель линейно возрастает с увеличением отношения потока воды к потоку масла. Это показывает, что формирование капель происходит в режиме выдавливания.

По приведенным результатам можно сделать вывод о том, что изготовленный чип, а также выбранный тип жидкости-носителя, позволяют формировать капли в режиме выдавливания, который обеспечивает наиболее удобный контроль размера капель за счет изменения соотношения потоков дисперсной и непрерывной фаз. При этом, полученные результаты согласуются с предварительной оценкой, сделанной на основе существующих теоретических и экспериментальных исследований.

4.4. Кристаллизация белков в МФЧ и проведение рентгеноструктурного анализа на источнике синхротронного излучения

Возможность применения разработанного микрофлюидного устройства для проведения рентгеноструктурного анализа тестировалась на трех объектах:

- лизоциме из куриного яйца (62971 Sigma-Aldrich), 10 мг/мл в буфере 50 мМ ацетат натрия, рН 4.6;
- аминотрансферазе из *Methanococcus vannielii*, 14 мг/мл в буфере 50 мМ Трис, 100мМ хлорид натрия, 10 мкМ пиридоксальфосфат (ПДФ), рН 8.0;
- эстеразе PMGL2 из метагеномной библиотеки вечной мерзлоты, 10 мг/мл в буфере 20 мМ Трис, рН 8.0.

Белки кристаллизовали методом микробатч, основанном на смешивании раствора белка с осадителем с последующим помещением реакционной смеси в масло, предотвращающее испарение воды из смеси. Если при смешивании достигается состояние пересыщения, становится возможным образование кристаллических зародышей, к которым впоследствии присоединяются молекулы белка из раствора, что приводит к росту кристалла.

Для постановки кристаллизационного эксперимента растворы белков в соответствующем буфере смешивались в пропорции 1:1 с растворами осадителей

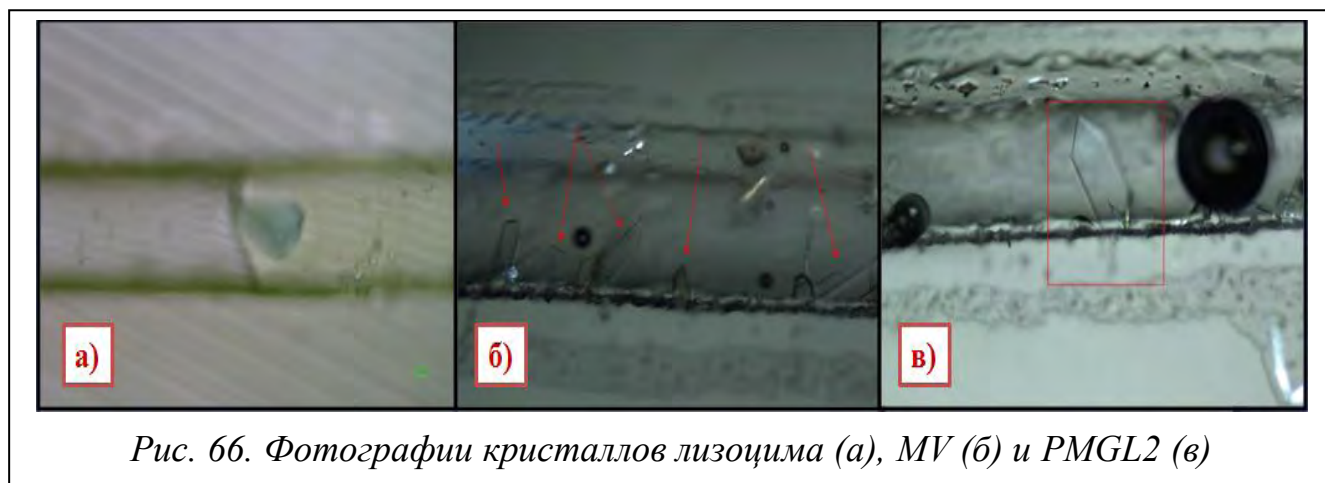
и подавались в микрофлюидный чип параллельно с жидкостью-носителем (силиконовым маслом), в результате чего формировались кристаллизационные капли – микрореакторы.

В качестве осадителей использовали:

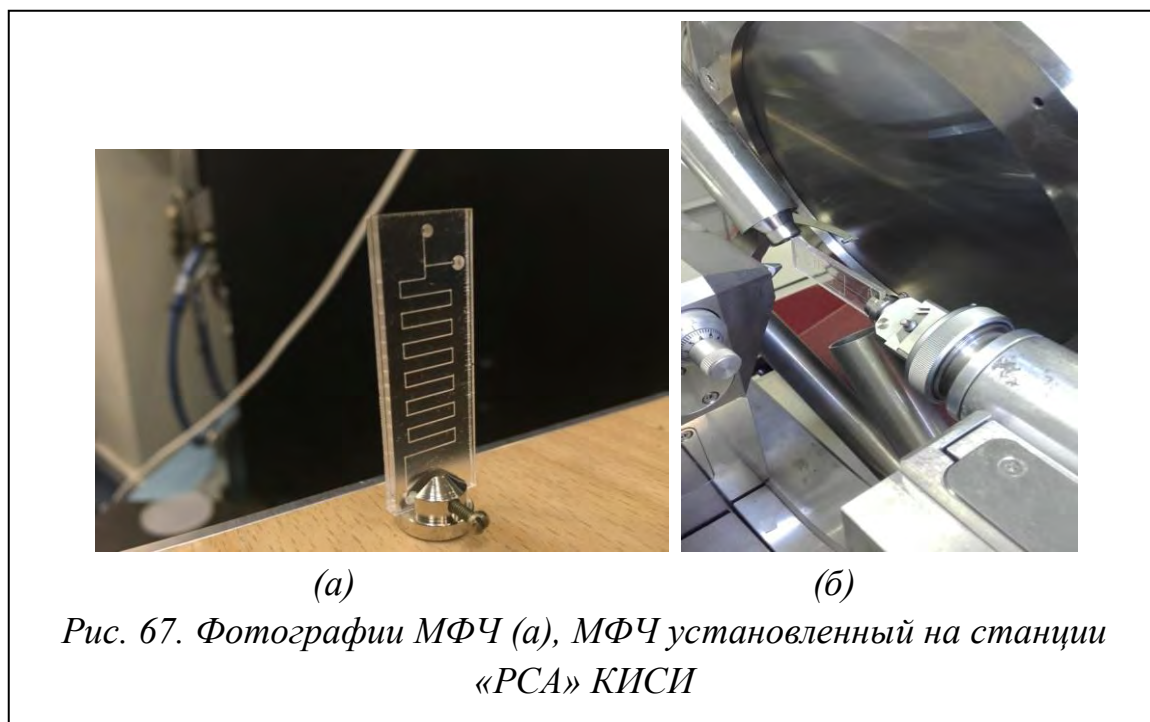
- для лизоцима – 1.4М хлорид натрия в буфере 50 мМ ацетат натрия, pH 4.3;
- для аминотрасферазы из *Methanococcus vannielii* – 200 мМ ацетат калия, 3350 полиэтиленгликоль 19%;
- для эстеразы PMGL2 – 100 мМ HEPES, pH 7.5, 200 мМ хлорид магния, 3350 полиэтиленгликоль 26%.

Чипы с кристаллизационными микрореакторами инкубировались в течение 2 недель – 1 месяца при температуре +15°C, затем был проведен анализ полученных кристаллов (Рис. 66).

В каналах сконструированного МФЧ были получены капли-микрореакторы размера 1000 × 200 мкм (средним объемом 100 нл), содержащие смесь белкового раствора с раствором осадителя. Между собой капли разделялись силиконовым маслом, при этом плотность микрореакторов в чипе составляла 3 капли на 1 см длины канала. Используемый объем исходного раствора составил 1.5–3.5 мкл на один микрофлюидный чип. В течение 7 дней при температуре +15°C в каплях-микрореакторах (для всех белковых растворов) были получены кристаллы с размером граней порядка 70–150 мкм. Прокрашивание кристаллов метиленовым синим подтвердило белковую, а не солевую природу кристаллов. Стоит отметить, что кристаллы были получены в одной трети сформированных капель, как правило, в одной капле находился один кристалл, реже – два. Капли с большим числом кристаллов не подходили для проведения РСА.



Тестирование кристаллов, выращенных в микрофлюидном чипе, для оценки возможности получения наборов дифракционных данных, с целью разрешения структуры исследуемого белка проводилось на синхротронной станции «РСА» Курчатовского источника СИ (Рис. 67). Использовалось монохроматическое излучение с длиной волны 0.8024 \AA . Образец был установлен на гониометр Marresearch dtb. Дифракционная картина регистрировалась двумерным детектором Rayonix SX165 (диаметр 165 мм, разрешение 2048×2048 пикселей). Расстояние образец – детектор составляло 80 мм. Для первичной обработки использовалась программа Automar (MarXperts).



Возможность проведения рентгеноструктурного эксперимента *in situ* с использованием МФЧ оценивалась на полученных кристаллах лизоцима,

MV и PGML2. В качестве параметров для оценки качества выращенных кристаллов по детектируемым дифракционным картинам были выбраны максимальный угол раствора дифракционного конуса и точность получаемых по дифракционным данным параметров элементарной ячейки. Максимальное полученное разрешение для анализируемых кристаллов составляло 2.74 Å для лизоцима, 2.95 Å для MV и 2.89 Å для PMGL2, соответственно, соотношение сигнал/шум в обоих случаях составляло $I/\sigma = 3$. Выращенные кристаллы лизоцима относятся к пространственной группе P4 с параметрами элементарной ячейки $a = b = 77.276$ Å, $c = 37.077$ Å, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ (Рис. 68). Кристаллы MV принадлежат пространственной группе P4 с параметрами элементарной ячейки $a = 68.78$ Å, $b = 97.1$ Å, $c = 112.75$ Å. Кристаллы PMGL2 принадлежат пространственной группе P4 с параметрами элементарной ячейки $a = 57.26$ Å, $b = 84.8$ Å, $c = 113.46$ Å.

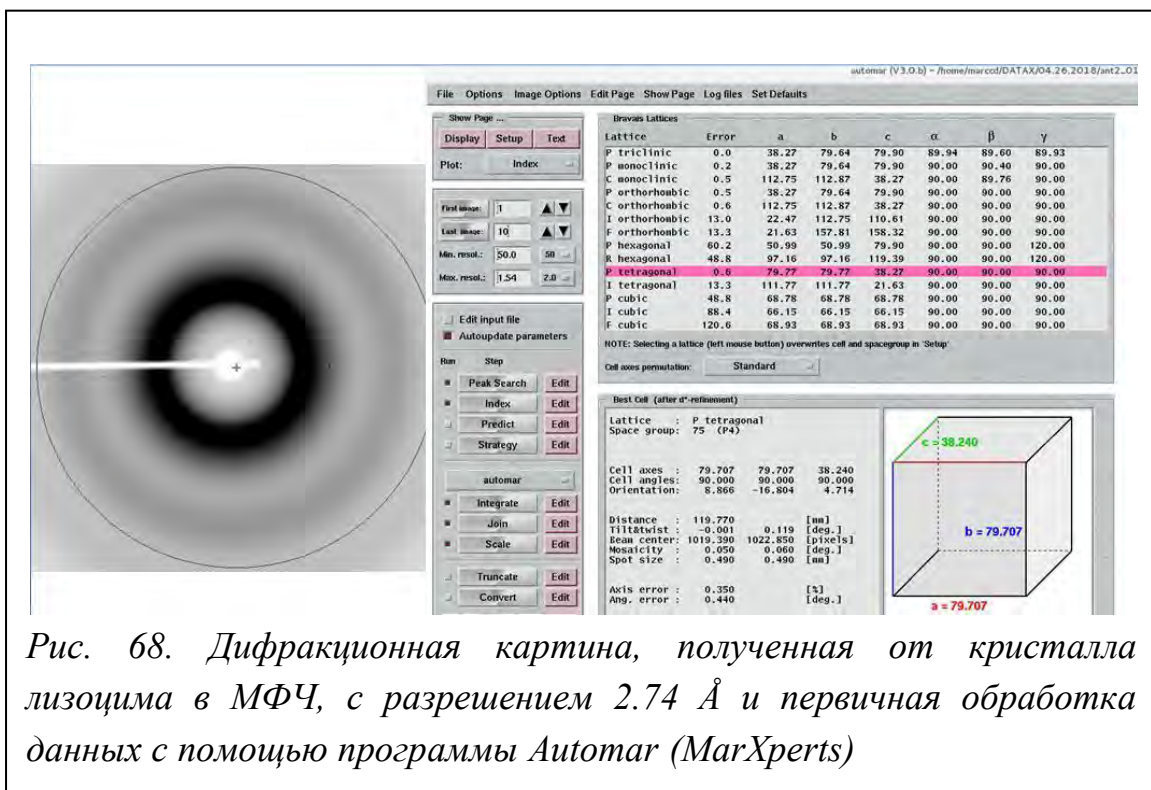


Рис. 68. Дифракционная картина, полученная от кристалла лизоцима в МФЧ, с разрешением 2.74 Å и первичная обработка данных с помощью программы Automar (MarXperts)

Полученные данные показывают принципиальную возможность тестирования качества выращенных кристаллов непосредственно в микрофлюидном чипе, а также сбора полного дифракционного набора с нескольких кристаллов, полученных на протяжении микроканалов МФЧ в каплях-

микрореакторах, с последующим разрешением пространственной структуры исследуемого образца. Стоит также отметить, что сборная конструкция МФЧ позволяет извлекать выращенные кристаллы, как продавливанием масла (жидкость-носитель) через микроканал, так и разборкой чипа с последующим извлечением кристалла кристаллографической петлей. Данная особенность позволяет использовать полученные кристаллы в экспериментах по настаиванию с лигандами либо подбору условий криопротекции.

Выводы

Проведена разработка, изготовление и экспериментальная проверка микрофлюидного чипа для кристаллизации белков методом микробатч.

Анализ современных экспериментальных результатов и теоретических моделей показал, что геометрия каналов, получаемых по разработанной технологии формирования МФУ, пригодна для формирования капель микрореакторов контролируемого размера. Наблюдение механизмов образования капель подтвердило результаты оценки.

Изготовленные МФУ использованы для кристаллизации белков и проведения РСА в чипе. Опыты показали возможность проведения РСА и отбора кристаллов для последующего более детального анализа без извлечения из чипа.

5. Исследование начальной стадии кристаллизации белков методом МУРР

В данной части диссертации описаны разработка, изготовление и испытание микрофлюидной ячейки (МФЯ), обеспечивающей возможность *in situ* исследования малых объемов белковых растворов (10–20 мкл) методом МУРР. Предложена и испытана конструкция разборной ячейки с плоскопараллельными окнами, достаточно простая в изготовлении и позволяющая изменять ее характеристики (использовать окна из разных материалов, изменять толщину кюветы, ее объем и конфигурацию).

Изучение механизмов кристаллизации белковых молекул становится всё более актуальной задачей, поскольку на сегодняшний день для большинства белков ещё не найдены условия кристаллизации. Понимание механизмов образования белковых кристаллов должно способствовать более эффективному поиску таких условий. Важную роль в подобных исследованиях играют методы *in situ* анализа, в частности, метод МУРР с использованием источников синхротронного излучения.

Малоугловое рассеяние рентгеновских лучей является мощным хорошо развитым методом для изучения наноразмерных объектов и их взаимодействий в биологических системах [150,151,152]. Эта методика позволяет получать информацию о характерных размерах объектов и их форме. Например, результаты недавних исследований начальных стадий кристаллизации лизоцима указывают на то, что важную роль в процессе образования крупных кристаллов играет формирование димеров и октамеров, которые в большом количестве обнаруживаются в условиях, благоприятных для кристаллизации, и отсутствуют, если кристаллизация невозможна [114].

Изучение кристаллизации и других химических и биологических процессов обычно проводят, помещая раствор в кювету малого объема или кварцевый капилляр [112]. С учетом необходимости проведения многочисленных экспериментов с изменением широкого ряда параметров, недостатком такого подхода является значительный объем используемых реагентов. Кроме того,

отсутствует возможность изменять состав раствора непосредственно в процессе измерений, что создает препятствие для *in situ* анализа реакций.

Использование микрофлюидных устройств для МУРР открывает широкие возможности для *in situ* исследований [153], поскольку позволяет контролируемо подавать растворы в область пучка, менять жидкостной состав в процессе измерений и при этом использовать малые объемы исследуемого материала. МФУ для МУРР имеют специфические особенности, связанные с характером рентгеновских синхротронных исследований. Не все материалы являются достаточно прозрачными в используемой области рентгеновского спектра и, одновременно, выдерживают воздействие излучения высокой интенсивности, создаваемое в синхротронных источниках. С другой стороны, подходящие материалы часто не могут быть использованы для создания МФУ из-за сложности их обработки. Чтобы удовлетворить взаимоисключающие требования, МФУ для МУРР часто изготавливают из двух материалов, один из которых является корпусом и средой, содержащей микроканалы, а из второго материала формируют прозрачные окна для прохождения рентгеновского излучения. В результате, наблюдение ведется за частью МФУ, которая представляет собой резервуар малого объема, ограниченный рентгенопрозрачными окнами из кварца, боросиликатного стекла, каптона (полиамидная пленка), полистирена и др..

Специфика микрофлюидных ячеек для МУРР приводит к тому, что их изготовление, на сегодняшний день, оказывается сложной процедурой, включающей в себя использование литографии и/или механической обработки сверлами субмиллиметрового диаметра (микрообработка) [154,155].

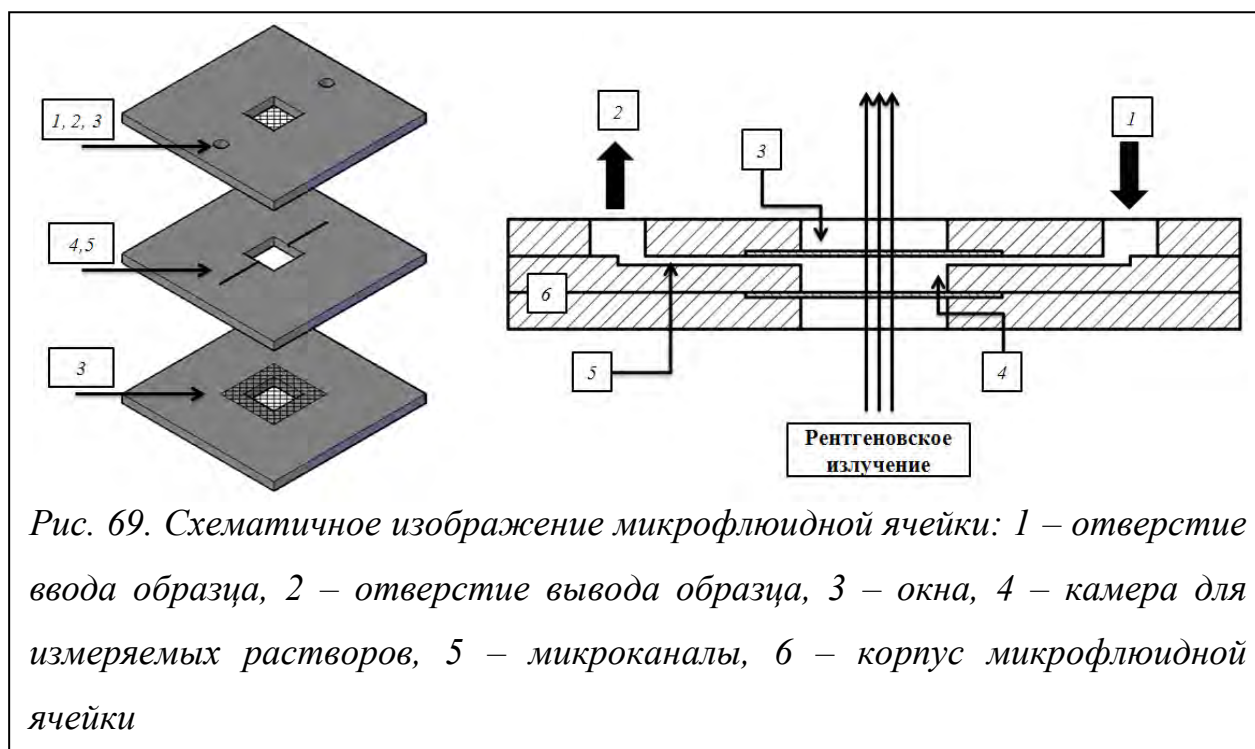
При очевидной востребованности подобных систем, их доступность для исследователей сильно ограничена, особенно при необходимости использовать ячейку уникальной специфической конструкции. В данном разделе показано, что технология изготовления МФУ для *in situ* исследований методом МУРР с использованием синхротронного излучения может быть существенно упрощена.

5.1. Создание микрофлюидной ячейки для исследования белковых растворов методом МУРР

Компоненты разработанной микрофлюидной ячейки представлены на рисунке 69. Корпусом ячейки служат три пластины ПММА с линейными размерами 24x24 мм и толщиной 1 мм. В центральной пластине были прорезаны сквозное отверстие, которое выступает в роли резервуара для исследуемой жидкости, и микроканалы для подвода и вывода жидкости. Верхняя и нижняя пластины оборудованы отверстиями для прохождения пучка и нишами вокруг отверстий для монтажа прозрачных окон. В верхней крышке также проделаны отверстия для подачи и отвода жидкости.

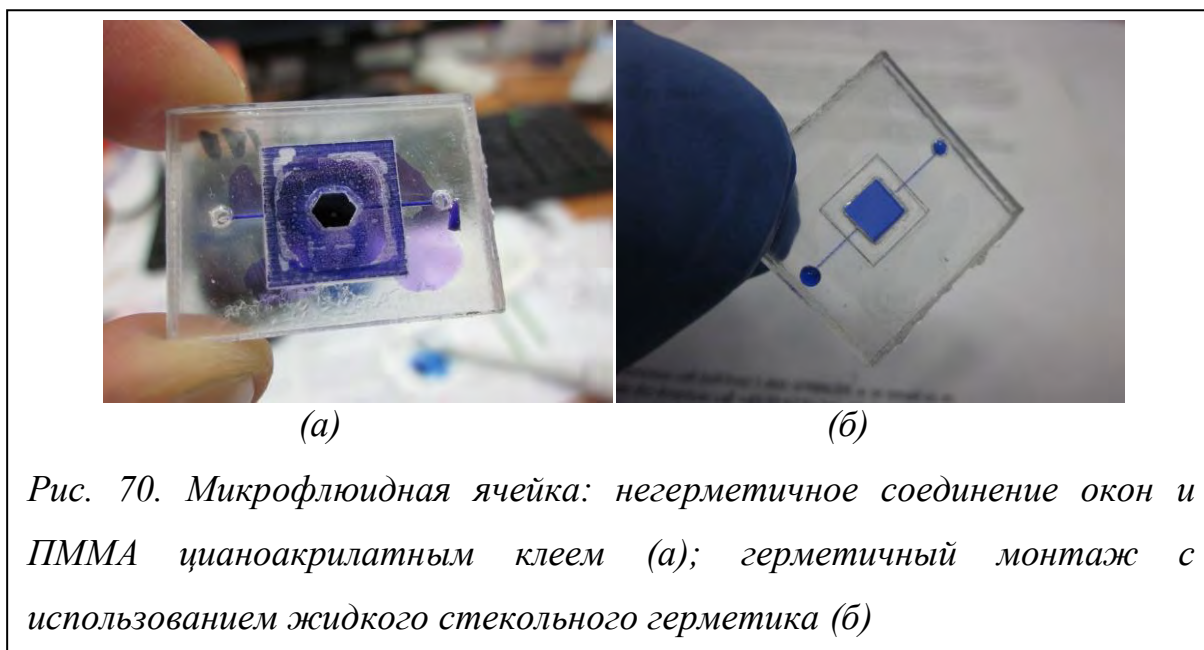
Формирование каналов, отверстий и углублений производилось с помощью лазерного гравера. Разрешение гравера для всех процессов было выставлено на максимальное значение 1000 PPI. Для резки сквозных отверстий использовались параметры мощности и скорости 70% и 15% соответственно. Вводной канал с размерами сечения 300 x 300 мкм был получен при мощности 30% и скорости 60% от номинальных значений. Для уменьшения давления на стекла во время прокачки жидкости выводной канал был сделан более широким и глубоким. Ниши для монтажа окон были сформированы при мощности лазера 15% и скорости движения 90%. Данные параметры обеспечили глубину ниш 150 мкм, которой достаточно для использованных далее окон. В качестве окон использовались пластины слюды толщиной 30–60 мкм и пластины кварцевого стекла толщиной 100, 60 и 30 мкм.

После формирования в пластине ПММА всех элементов микрофлюидной ячейки полученную заготовку полировали на шлифовально-полировальной машине с помощью мелкодисперсного абразива. Далее заготовка ПММА подвергалась ультразвуковой обработке в деионизированной воде для очистки поверхности после полировки.



Окна монтировались в нишах путем склейки. Бондинг ячейки проводился в два этапа. Сначала соединялись средняя часть и основание, а затем, во избежание смещения деталей, припаивалась крышка. Термическое спаивание проводилось путем ступенчатого нагрева до 120°C с последующим выдерживанием образцов при давлении в 1500 мбар в течение 30 мин.

После завершения бондинга система испытывалась на герметичность, для чего через ячейку прокачивалась подкрашенная вода. Подвод жидкостей к микрофлюидной ячейке осуществлялся пипетдозатором Eppendorf и шприцем по фторопластовым трубкам с внутренним диаметром 250 мкм. По итогам сравнения нескольких клеевых составов был выбран жидкий силиконовый герметик для стекол (Permatex) – клей повышенной текучести, который равномерно растекается под окнами, что обеспечивает полную герметичность конструкции (Рис. 70).



5.2. Выбор материалов окон ячеек

На лабораторной установке “АМУР-К” во ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН были проведены предварительные испытания микрофлюидных ячеек. Испытания проводились на незаполненной ячейке с однокоординатным позиционно-чувствительным детектором ОДЗМ при фиксированной длине волны излучения 0.1542 нм (CuK α -линия острофокусной трубки, монохроматор из пиролитического графита) и коллимационной системой Кратки. Сечение рентгеновского пучка составляло 0.2×8 мм, область углов рассеяния соответствовала диапазону значений модуля вектора рассеяния

$$0.1 < s < 10.0 \text{ нм}^{-1} \left(|s| = \frac{4\pi \sin \theta}{\lambda}, 2\theta - \text{угол рассеяния} \right). \quad (9)$$

Образцы помещали в вакуумную камеру. Расстояние образец – детектор составляло 700 мм. Время измерений одного образца – 10 мин. Экспериментальные данные были нормированы на интенсивность падающего пучка, после чего в них вводили поправку на коллимационные искажения.

Испытания, проведенные на установке “АМУР-К”, показали, что окно из слюды толщиной 60 мкм дает фон, превышающий рассеяние на кварцевых пластинках в 3–5 раз (Рис. 71).

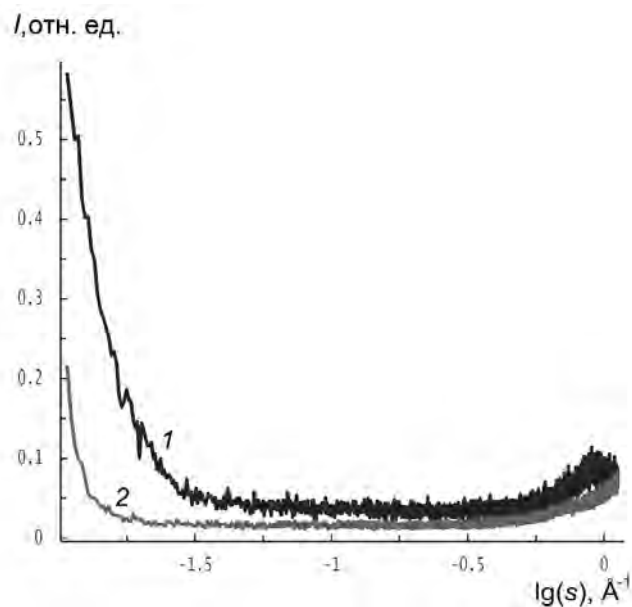


Рис. 71. Интенсивность малоуглового рассеяния на слюдяном (1) и кварцевом окнах (2) толщиной 60 и 100 мкм соответственно, приведенная к нулевому поглощению

Для окна из кварцевого стекла толщиной 100 мкм фон рассеяния в области малых углов был небольшим, сравнимым с рассеянием в капилляре со стенками толщиной 10 мкм и диаметром 1.5 мм, а ослабление рентгеновского сигнала составило 8.2. В случае кварцевых окон толщиной 60 и 30 мкм происходило ослабление сигнала в 3.5 и 1.5 раза соответственно (таблица 3), тогда как для окон из слюды толщиной 60 мкм ослабление составило 4.9. В таблице 3 приведены отношения интенсивности падающего рентгеновского пучка к интенсивности пучка, прошедшего через микрофлюидную ячейку.

Таблица 3. Отношения интенсивностей

Толщина кварцевых окошек, мкм	АМУР-К (8 кэВ)	BM-29 (ESRF) (8 кэВ)	BM-29 (ESRF) (12.5 кэВ)
100	8.2	5.21	1.60
60	3.5	2.72	1.31
30	1.5	—	—

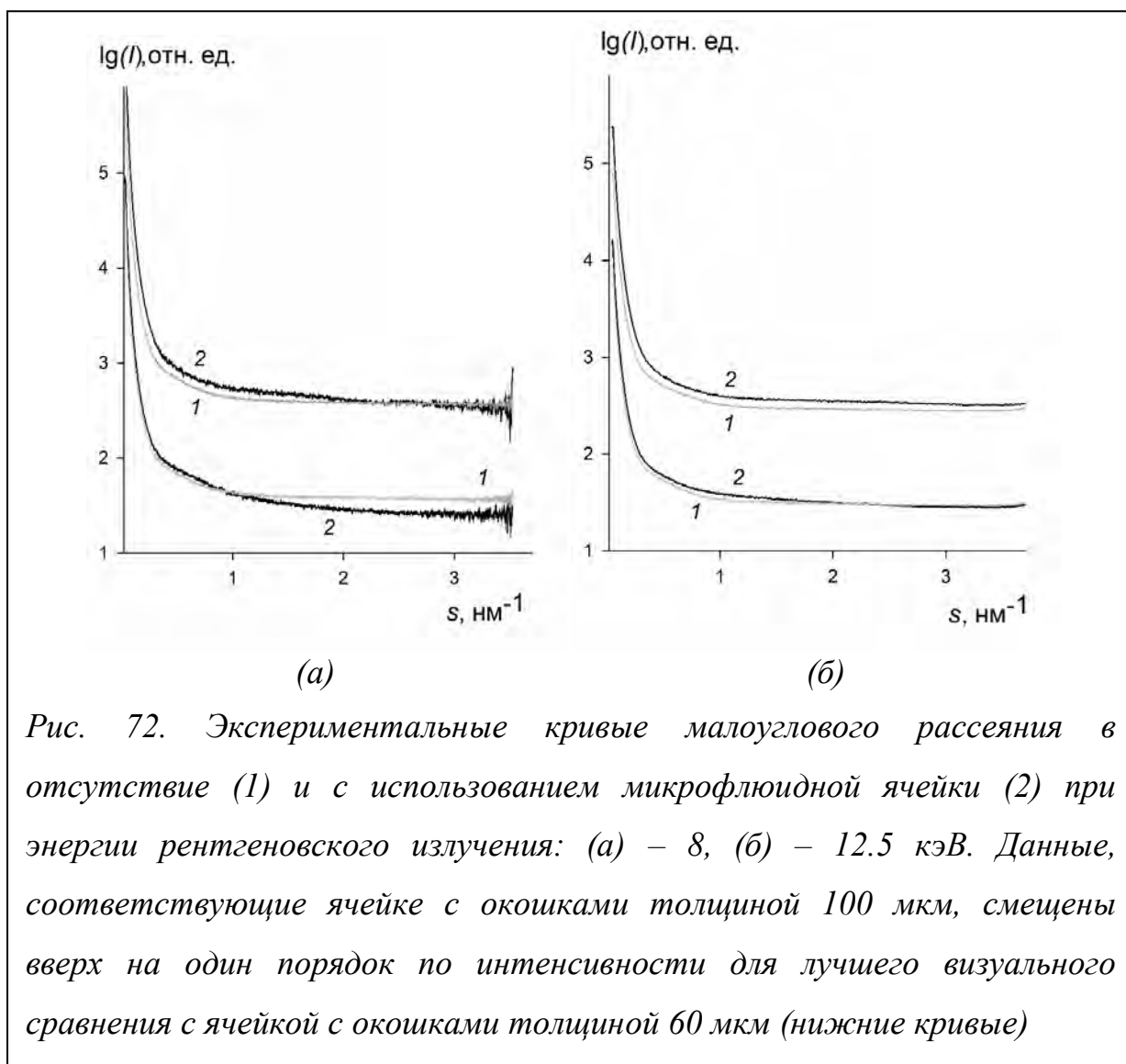
Дальнейшие исследования проводили на ячейках с кварцевыми окнами толщиной 100 и 60 мкм, сочетающими хорошие рентгенооптические

характеристики с удобством эксплуатации, ввиду более высокой прочности, чем у окон толщиной 30 мкм.

5.3. Рассеяние в МФЯ при разных энергиях излучения

Дополнительные измерения рассеяния рентгеновского излучения на микрофлюидной ячейке были проведены на станции малоуглового рассеяния BM-29 (ESRF, Гренобль, Франция) с использованием двумерного пиксельного детектора PILATUS 2M (Dectris, Швейцария) на длинах волн рентгеновского излучения 0.1 и 0.15 нм.

Результаты измерений представлены на рисунке 72 и в таблице 3. На рисунке 72 показаны экспериментальные кривые малоуглового рассеяния, полученные в отсутствие ячейки (кривые 1) и при пустой микрофлюидной ячейке (кривые 2) с окошками толщиной 100 и 60 мкм соответственно. В таблице приведены отношения интенсивности падающего пучка к интенсивности пучка, проходящего через микрофлюидную ячейку. Как видно из рисунка 72 и таблицы 3, фон рассеяния в области малых углов небольшой, а ослабление рентгеновского сигнала не превышает один порядок интенсивности.



5.4. Исследование белковых растворов

Для приготовления образцов белков был взят белок лизоцим из куриного яйца производства Sigma-Aldrich (CAS# 12650–88–3), NaCl (CAS# 7647–14–5) и ацетат натрия (CAS# 6131–90–4) производства Helicon. Лизоцим и хлорид натрия растворялся в 0.2 М натрий-ацетатном буфере (далее буфер) с pH 4.55 Helicon (CAS # 6131–90–4), приготовленном с использованием ультрачистой воды Millipore (18 МОм·см). Все растворы были отфильтрованы с помощью мембранных шприцевых фильтров Millex с порами размером 0.22 мкм. Размешивание раствора лизоцима проводилось в центрифуге в течение 10 мин с частотой 10000 об/мин.

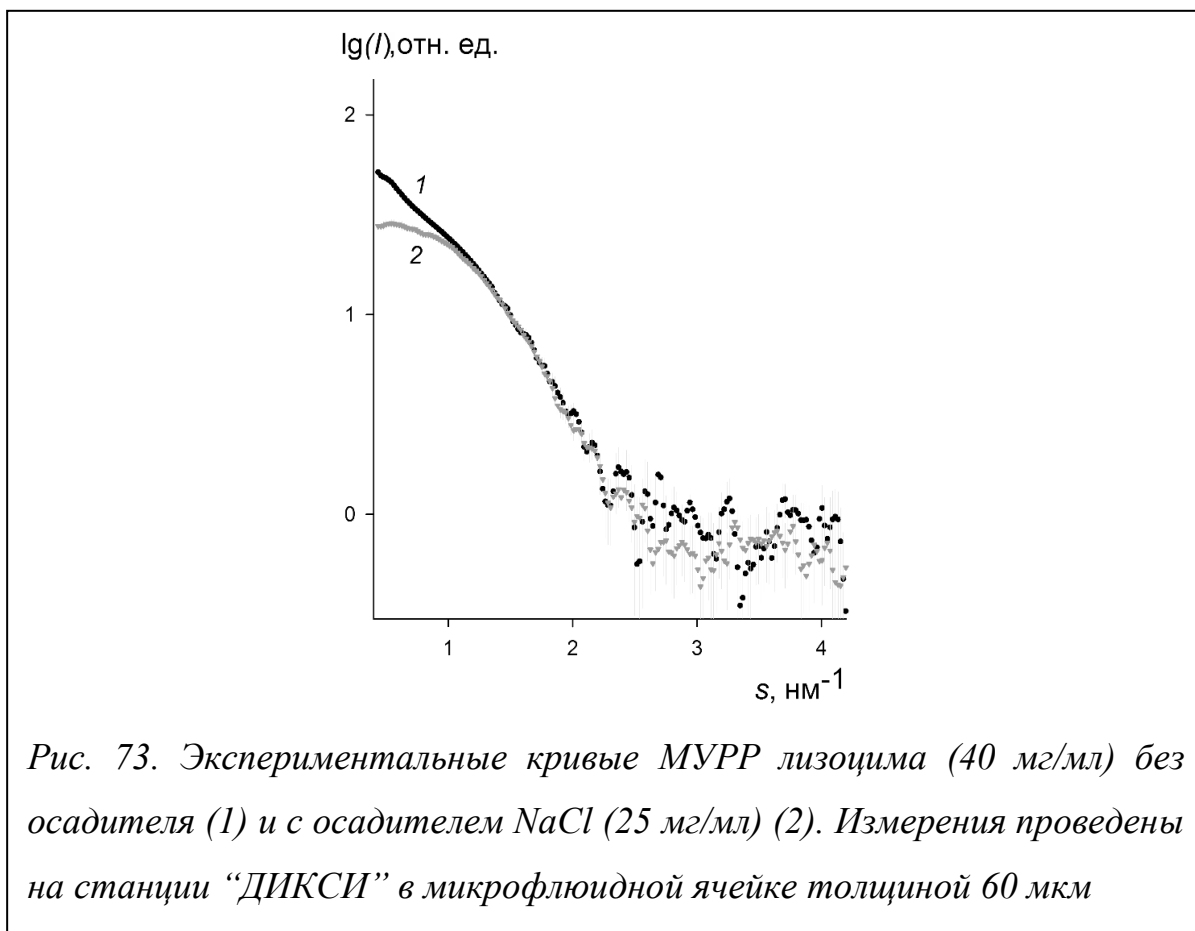
Исходные концентрации лизоцима и NaCl в растворах составляли 80 мг/мл и 50 мг/мл, соответственно. Перед проведением измерений методом МУРР растворы лизоцима и NaCl смешивались друг с другом в равных объемах. Конечные концентрации лизоцима и NaCl в растворах составляли 40 мг/мл и 25 мг/мл, соответственно.

Для экспериментов использовались МФЯ с размерами окон 3 x 3 мм. С учетом объема каналов и вводных отверстий, для заполнения ячейки требовалось не более 10 мкл раствора.

Измерения МУРР на белковых растворах в микрофлюидной ячейке осуществлялись на синхротронной станции «ДИКСИ» Курчатовского источника синхротронного излучения. Использовалось монохроматизированное излучение с длиной волны 0.162 нм (что соответствует энергии излучения 7.65 кэВ). Сигнал регистрировали с помощью двумерного пиксельного детектора PILATUS 1M (Dectris, Швейцария). Сигнал был усреднен по радиальному направлению с помощью программы FIT2D.

Для определения оптимального положения измерительной ячейки и калибровки проводили предварительные исследования с пустой ячейкой. Затем было измерено рассеяние рентгеновского излучения в ячейке, заполненной следующими образцами: дистиллированной водой; раствором лизоцима (с концентрацией 40 мг/мл); раствором лизоцима (40 мг/мл) с добавлением осадителя NaCl (25 мг/мл). Для получения разностной кривой (белок–буфер), содержащей в себе информацию о структуре белка, использовали программу PRIMUS. Для сравнения спектров рассеяния на станциях «ДИКСИ» (Курчатовский институт) и BM-29 (ESRF) были получены кривые МУРР растворов с указанными выше концентрациями белка и осадителя в кварцевом капилляре.

Сопоставление экспериментальных кривых МУРР (Рис. 73), полученных для растворов лизоцима и лизоцима с добавлением осадителя NaCl, показывает, что при добавлении осадителя происходит изменение угла наклона кривой в области малых значений обратного вектора рассеяния, соответствующее изменению характера взаимодействия между молекулами белка – от отталкивания до притяжения. Данный результат совпадает с результатами статьи [156].



На рисунке 74 представлены экспериментальные кривые МУРР для раствора лизоцима с осадителем в кварцевом капилляре, полученные на станциях “ДИКСИ” (кривая 2) и ВМ-29 (кривая 3)), и кривая, полученная на микрофлюидной ячейке (станции “ДИКСИ”, кривая 1). Для всех измерений использованы растворы с одинаковыми концентрациями белка и осадителя.

Отношение сигнал–шум для данных, полученных при измерениях на “ДИКСИ” в новой ячейке (Рис. 74, кривая 1), сопоставимо с измерениями в стандартном капилляре на “ДИКСИ” (Рис. 74, кривая 2) и немного ниже, чем на BM-29 ESRF (Рис. 74, кривая 3), из-за меньшей интенсивности пучка. В то же время совпадение экспериментальных кривых рассеяния указывает на принципиальную возможность использования описываемой микрофлюидной ячейки для проведения малоугловых измерений.

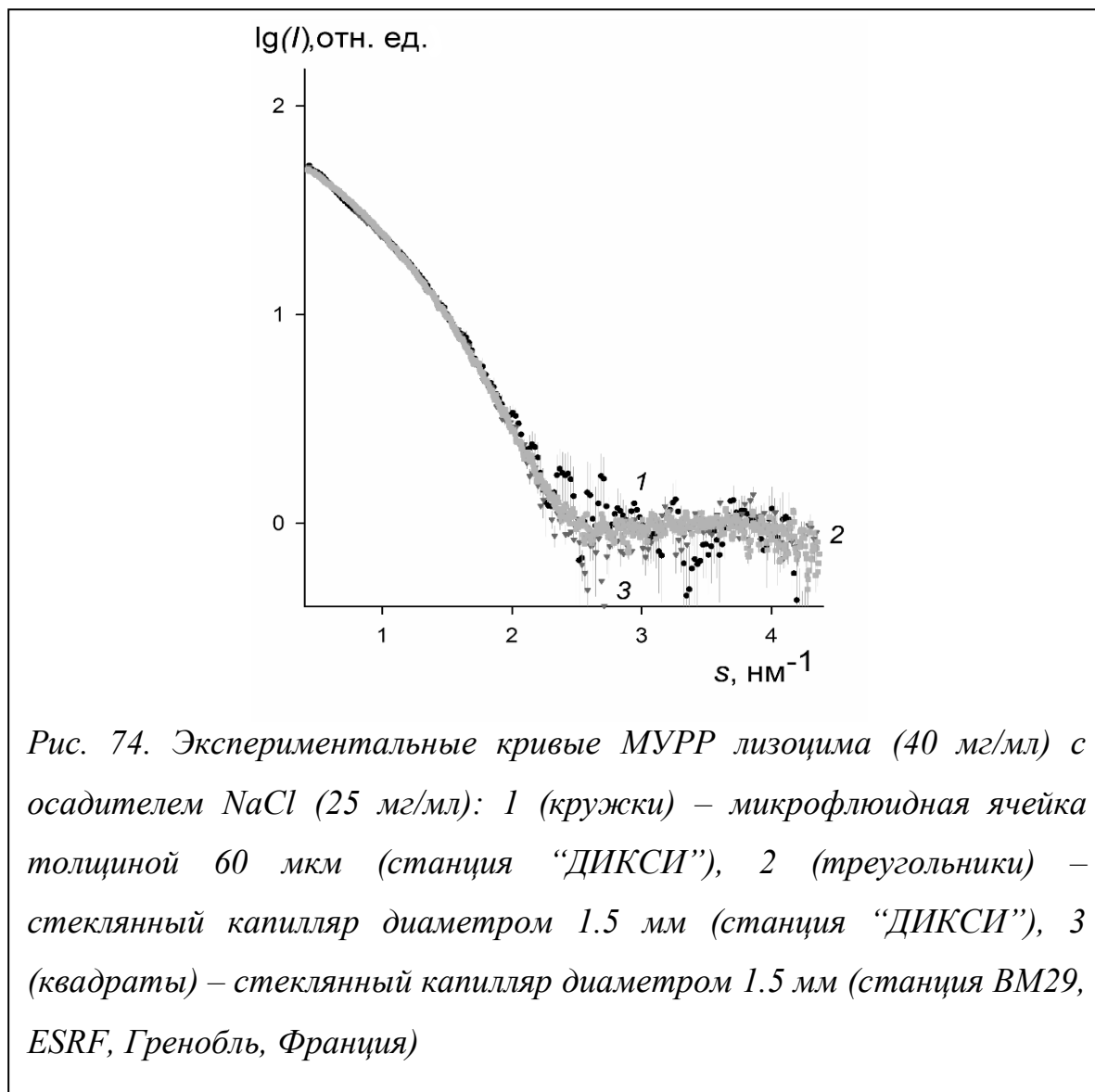


Рис. 74. Экспериментальные кривые МУРР лизоцима (40 мг/мл) с осадителем NaCl (25 мг/мл): 1 (кружки) – микрофлюидная ячейка толщиной 60 мкм (станция “ДИКСИ”), 2 (треугольники) – стеклянный капилляр диаметром 1.5 мм (станция “ДИКСИ”), 3 (квадраты) – стеклянный капилляр диаметром 1.5 мм (станция BM29, ESRF, Гренобль, Франция)

Выводы

Таким образом, на разработанной МФЯ проведены сравнительные эксперименты с использованием данной ячейки и стандартного капилляра на примере белка лизоцима с добавлением осадителя и в его отсутствие. Полученные результаты свидетельствуют о хороших перспективах использования МФЯ при проведении малоугловых измерений, направленных на исследование структуры белков и их взаимодействий в растворе, в частности на поиск условий кристаллизации белков. Конструкция ячейки может быть легко адаптирована под конкретные требования эксперимента и станции, и использована для широкого спектра структурных задач. Геометрия ячейки позволяет существенно (в 5–7 раз) сократить объем используемого образца в сравнении со стандартными кварцевыми капиллярами.

Заключение

1. Разработана технологическая цепочка для оперативного прототипирования и создания разборных МФУ из ПММА методами лазерной абляции и термической спайки. При этом достигнуто существенное упрощение процесса изготовления МФУ в сравнении с другими существующими альтернативами, что создает перспективы удешевления и ускорения процедуры прототипирования МФУ. Разработанная технология включает следующие элементы:

- Формирование микроканалов в ПММА методом лазерной гравировки CO₂ ИК лазером;
- Термическое спаивание (бондинг) пластин с микроканалами;
- Обработка микроканалов для придания им гидрофобных и гидрофильных свойств;
- Формирование проводящих электродов;
- Совмещение многослойных МФУ.

2. Установлено, что надежный бондинг профилированных пластин ПММА с отверстиями и микроканалами может быть достигнут на температуре 120°C при малых давлениях 1000–1500 мбар. Ключевым фактором для проведения спайки при столь малых давлениях и температурах является удаление неровностей посредством механической полировки, образующихся на поверхности ПММА при профилировании методом лазерной абляции. Предварительная обработка поверхности ПММА озоном и ультрафиолетовым излучением позволяет проводить бондинг при температуре ниже 100°C.

3. Показана возможность многократного (до трёх раз) вскрытия МФУ из ПММА для извлечения пробы исследуемого материала и повторной термической спайки.

4. Разработанная технология создания МФУ позволила изготовить:
- МФЧ для кристаллизации белка методом микробатч;
 - МФЯ для проведения *in situ* исследований белковых растворов методом МУРР;

- прототип микрофлюидной электрохимической ячейки для улавливания радиоактивного изотопа ^{18}F -;

- микрофлюидный генератор кислорода с использованием хлореллы вульгарис.

5. Показано, что использование МФЧ из ПММА позволяет осуществлять кристаллизацию белка из растворов методом микробатч и проводить РСА полученных кристаллов непосредственно в МФЧ с использованием синхротронного излучения, в том числе:

- идентифицировать белковые кристаллы, отличать их от квазикристаллов или кристаллов плохой морфологии;

- отбирать кристаллы наилучшего кристаллического совершенства (дифракционного качества) непосредственно в чипе;

- определять структуру кристаллизованного белка с пространственным разрешением лучше 3Å , не извлекая кристалл из чипа.

6. Показано, что МФЯ из ПММА с плоскопараллельными кварцевыми окнами позволяет проводить *in situ* исследования процессов кристаллизации белков из растворов методом МУРР с использованием синхротронного излучения. Ячейки подобной конструкции позволяет снизить объем исследуемого препарата более чем в 7 раз по сравнению со стандартными кварцевыми капиллярами, применяемыми в МУРР для изучения белковых растворов при сопоставимом соотношении сигнал/шум. При использовании в качестве рентгенопрозрачного окна особо чистого кварцевого стекла толщиной 60 мкм собственный уровень фона рассеяния ячейкой в диапазоне измеряемых углов меньше, чем у кварцевых капилляров, что обеспечивает возможность увеличения точности измерений.

Благодарности

Выражаю благодарность своему научному руководителю, начальнику отдела прикладных наноэлектронных структур Курчатовского комплекса НБИКС-природоподобных технологий НИЦ «Курчатовский институт», Максиму Леонидовичу Занавескину за поддержку при выполнении данной работы. Также хочу поблагодарить всех моих коллег, сотрудников отдела прикладных наноэлектронных структур Курчатовского комплекса НБИКС-природоподобных технологий НИЦ «Курчатовский институт», за помощь в проведении экспериментов и серий измерений, представленных в настоящей работе, сотрудников ККСНИ НИЦ «Курчатовский институт» Сенина Р.А. и Дороватовского П.В. за проведение экспериментов на Курчатовском источнике синхротронного излучения. Хочу поблагодарить сотрудников отдела синхротронно-нейтронных исследований КК НБИКС-природоподобных технологий НИЦ «Курчатовский институт» Писаревского Ю.В. и Марченкову М.А. за проведение серии экспериментов по исследованию начальной стадии кристаллизации белков методом МУРР, а также руководителя Курчатовского комплекса НБИКС-природоподобных технологий НИЦ «Курчатовский институт» Дьякову Ю.А. за всестороннюю поддержку.

Особую благодарность выражаю Николаевой А.Ю. за активное участие в исследованиях и плодотворные дискуссии.

Список сокращений и условных обозначений

МФ	Микрофлюидика
МФУ	Микрофлюидное устройство
МФЧ	Микрофлюидный чип
МФС	Микрофлюидная система
МФЯ	Микрофлюидная ячейка
РСА	Рентгеноструктурный анализ
МУРР	Малоугловое рентгеновское рассеяние
СИ	Синхротронное излучение
РФП	Радиофарм препарат
Мониторинг	Систематическое наблюдение за объектом с обеспечением контроля его параметров, а также проведения анализа с целью предсказания изменчивости параметров и принятия решения о необходимости и составе корректирующих и предупреждающих действий (Временное положение "Изделия электронной техники, квантовой электроники и электротехники военного назначения. Пластины с кристаллами заказанных элементов. Общие технические условия", ФГУ 22ЦНИИ МО, 2009 г.)
Технологический блок (для целей проекта)	Последовательность технологических операций, завершающаяся контрольной операцией

Стандартный технологический процесс (для целей проекта)	Типовой технологический процесс с установленными по результатам испытаний (характеризации технологического процесса) и измеряемыми при его исполнении значениями величин, характеризующих отличительные свойства этого процесса, не изменяемый в течение длительного времени, и снабженный комплексом «Правила и средства проектирования». Стандартный технологический процесс предназначен для изготовления группы конструктивно и технологически подобных изделий, имеющих различные функциональные характеристики.
Технология	Совокупность процессов с использованием каких-либо средств воздействия на объекты, направленных на достижение поставленной цели, заключающейся в необходимом изменении объектов, подвергаемых воздействию (по ГОСТ Р 43.0.3-2009).
Технологический процесс	Часть производственного процесса, содержащая целенаправленные действия по изменению и (или) определению состояния предмета труда

Список литературных источников:

1. I. Schneegass, R. Brautigam, J.M.Kohler, “Miniaturized Flow-Through PCR with Different Template Types in a Silicon Chip Thermocycler”, *Lab. Chip.*, vol. 1, pp. 42–49, 2001.
2. Y. Weiping, D. Liqun, W. Jing et al., “Simulation and Experimental Study of PCR Chip Based on Silicon”, *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 108, pp. 695–699, 2005.
3. C.J. Easley, L.A. Legendre, J.P. Landers, J.P. Ferrance, “Rapid DNA Amplification in Glass Microdevices”, *Methods Mol. Biol.*, vol. 339, pp. 217–232, 2006.
4. H. Nagai, Y. Murakami, Y. Morita et al. “Development of A Microchamber Array for Picoliter PCR”, *Anal. Chem*, vol. 73, pp. 1043–1047, 2001.
5. I. Stanciu, “Dispersion of SU-8 Photolithography Process for Fabrication of Microfluidic Devices”, *U.P.B. Sci. Bull., Series C*, vol. 74, iss. 2, pp. 127-142, 2012.
6. K.A. Jackson, W. Schröter, “Handbook of Semiconductor Technology: Electronic structures and properties of semiconductors”, Wiley-VCH, pp. 587–591, 2000.
7. D. Basting et al., “Historical Review of Excimer Laser Development”, *Excimer Laser Technology*, Springer, pp. 8-21, 2005.
8. R.C. Jaeger, "Lithography". Introduction to Microelectronic Fabrication (2nd ed.), *Upper Saddle River: Prentice Hall*. ISBN 0-201-44494-1, 2002.
9. C. M. Sotomayor Torres et al., "Nanoimprint lithography: an alternative nanofabrication approach" *Materials Science and Engineering: C*, vol. 23, iss. 1-2, pp. 23-31, 2003.
10. S.V. Sreenivasan, I. McMackin, F. Xu, D. Wang, N. Stacey, D. Resnick, "Enhanced nanoimprint process for advanced lithography applications". *Semiconductor Fabtech* (25th edition), 2005.

11. D.A. Horsley, A.A. Talin and J.L. Skinner, “Micromechanical and microfluidic devices incorporating resonant metallic gratings fabricated using nanoimprint lithography”, *Journal of Nanophotonics*, vol. 2, iss. 1, pp. 021785 (12), 2008.
12. S. Choi, J.K. Park, “Two-step photolithography to fabricate multilevel microchannels”, *Biomicrofluidics*, vol. 4, iss. 4, pp. 046503, 2010.
13. X. Cheng, J Guo, "A combined-nanoimprint-and-photolithography patterning technique", *Microelectronic Engineering*, vol. 71, iss. 3–4, pp. 277–282, 2004.
14. G. M. Whitesides et al., "New Approaches to Nanofabrication: Molding, Printing, and Other Techniques", *Chem. Rev.*, vol. 105, iss. 4, pp. 1171–1196, 2005.
15. P. Kim, K. W. Kwon, M. C. Park et al., “Soft Lithography for Microfluidics: a Review”, *BIOCHIP JOURNAL*, vol. 2, no. 1, pp. 1-11, 2008.
16. J.A. Rogers, R.G. Nuzzo, “Recent progress in soft lithography”, *Materials today*, vol. 8, iss. 2, pp. 50–56, 2005.
17. J. C. McDonald et al., “Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane)”, *J. Electrophoresis*, vol. 21, pp. 27-40, 2000.
18. N.C. Lindquist et al., “Engineering metallic nanostructures for plasmonic and nanophotonics”, *Rep. Prog. Phys.*, vol. 75, pp. 036501 (61), 2012.
19. J. Zhang, Y. Han, “Active and responsive polymer surfaces”, *Chem. Soc. Rev.*, vol. 39, pp. 676-693, 2010.
20. Y. Xia, G.M. Whitesides, “Soft Lithography”, *Annu. Rev. Mater. Sci.*, vol. 28, pp. 153-194, 1998.
21. C. Luo et al., “Fabrication and application of silicon-reinforced PDMS masters”, *Microelectronics Journal*, vol. 37, iss. 10, pp. 1036–1046, 2006.
22. J. Park, J. Li, A. Han, “Micro-macro hybrid soft-lithography master (MMHSM) fabrication for lab-on-a-chip applications”, *Biomed Microdevices*, vol. 12, iss. 2, pp. 345–351, 2010.

23. N.C. Lindquist et al., “Engineering metallic nanostructures for plasmonics and nanophotonics”, *Rep. Prog. Phys.*, vol. 3, 75, 2012.
24. S. Srivastava et al., “A self assembled monolayer based microfluidic sensor for urea detection”, *Nanoscale*, vol. 3, pp. 2971-2977, 2011.
25. N.K. Chaki, K. Vijayamohanan, “Self-assembled monolayers as a tunable platform for biosensor applications”, *Biosensors & Bioelectronics*, vol.17, pp.1-12, 2002.
26. R. B. Darling (UW) lecture notes on photolithography.
27. J. Wang, “Polymer-Based Microfabrication”, *Lecture Notes from Johns Hopkins University, BioSensing & BioMEMS*, 2009.
28. Y.Q. Fu et al., “Deep reactive ion etching as a tool for nanostructure fabrication”, *Journal of Vacuum Science and Technology*, vol. 27, iss. 3, pp. 1520, 2009.
29. V. Hägglund, “Characterization of masking layers for deep wet etching in borofloat glass”, *Lecture Notes from Uppsala Universitet*, 2013.
30. Z. Cui, “Nanofabrication: principles, capabilities and limits”, *Springer*, pp. 218-225, 2008.
31. “Lift-off Photoresist Processing”, *CNS STANDARD OPERATING PROCEDURE, Harvard University*, 2011.
32. Б.Г. Гольденберг, “Базовые принципы LIGA-Технологии”, ИЯФ СО РАН им. Г.И.Будкера, 2003.
33. S. Volker, “LIGA and its Applications. In: Advanced Micro & Nanosystems”, *Wiley-VCH*, 2009.
34. Y. Chen, A. Pepin, “Nanofabrication: Conventional and nonconventional methods”, *J. Electrophoresis*, vol. 22, pp. 187-207, 2001.
35. E.W. Becker et al., “Fabrication of microstructures with high aspect ratios and great structural heights by synchrotron radiation lithography, galvanofarming, and plastic moulding (LIGA process)”, *Microelectronic Engineering*, vol. 4, iss. 1, pp. 35-56, 1986.

36. A. Both, “Fabrication of LIGA-acceleration sensors by aligned molding”, *Springer, Microsystem Technologies* 2, pp. 104-108, 1996.
37. D.R. Lide, “CRC Handbook of Chemistry and Physics 75th ed.”, *CRC Press*, pp. 10-227, 2004.
38. H. Kaeslin, “Digital Integrated Circuit Design, from VLSI Architectures to CMOS Fabrication”, *Cambridge University Press*, 2008.
39. А.Ю. Бер, Ф.Е. Минскер, “Сборка полупроводниковых приборов и интегральных микросхем”, *Высшая школа*, 1995.
40. М. Петров, “Лазерная обработка материалов в электронике”, *Компоненты и технологии*, 2002.
41. J.M. Bustillo, R.T. Howe, R.S. Muller, “Surface micromachining for microelectromechanical systems”, *Proceedings of the IEEE*, vol. 86, pp. 1552-1574, 1998.
42. R. Ghodssi, P. Lin, “MEMS Materials and Processes Handbook”, *Springer*, 2011.
43. D.L. Pugmire, E.A. Waddell, R. Haasch, M.J Tarlov, and E. Locascio, “Surface characterization of laser-ablated polymers used for microfluidics”, *Anal. Chem*, vol. 74, pp. 871-878, 2002.
44. А.А. Евстапов, Т.А. Лукашенко, С.Г. Горный, К.В. Юдинб “Микрофлюидные чипы из полиметилметакрилата: метод лазерной абляции и термическое связывание”, *Научное приборостроение*, том 15, № 2, с. 72–81, 2005.
45. M.A. Roberts, J.S. Rossier, P. Bercier, and H. Girault, “UV laser machined polymer substrates for the development of microdiagnostic systems”, *Anal. Chem*, vol. 69, pp. 2035-2042, 1997.
46. A.W. Momber, R. Kovacevic, “Principles of Abrasive Water Jet Machining”, *Springer-London*, 1998.
47. J. Lorincz, “Waterjets: Evolving from Macro to Micro”, *Manufacturing Engineering, Society of Manufacturing Engineers*, 2009.

48. I. Sabotin, J. Valentinčič, M. Cvjetičanin, “Repeatability and Limitations of Water Jet Based Micro-tooling Process Chain”, *Proceedings of the 7th International Conference on Multi-Material Micro Manufacture*, 2010.
49. https://ru.wikipedia.org/wiki/Гидроабразивная_резка
50. <https://papini.blog.ryerson.ca/ajmresearch/>
51. T. Gessner, T. Otto, M. Wiemer, J. Frömel, “Wafer bonding in micro mechanics and microelectronics - an overview”, *The World of Electronic Packaging and System Integration*, pp. 307-313, 2005.
52. M.J. Madou, “Fundamentals of Microfabrication”, *CRC Press*, 2003.
53. Q.Y. Tong, U. Gösele “The Electrochemical Society, ed. Semiconductor Wafer Bonding: Science and Technology (1 ed.)”, *Wiley-Interscience*, 1998.
54. G. Gerlach, W. Dötzel, Ronald Pething, “Introduction to Microsystem Technology: The Guide”, *Wiley Microsystem and Nanotechnology*, *Wiley Publishing*, 2008.
55. A. Gerlach, D. Maas, D. Seidel, H. Bartuch, S. Schundau, K. Kaschlik, “Low-temperature anodic bonding of silicon to silicon wafers by means of intermediate glass layers”, *Microsystem Technologies*, vol. 5, iss. 3, pp. 144-149, 1999.
56. M. Nese, A. Hanneborg, “Anodic Bonding of Silicon to Silicon-Wafers Coated with Aluminum, Silicon-Oxide, Polysilicon or Silicon-Nitride”, *Sensors and actuators. A: Physical*, vol. 37, iss. 8, pp. 61-67, 1993.
57. H.S. Kima, R.H. Blick, C.B. Eom, “Bonding silicon-on-insulator to glass wafers for integrated bio-electronic circuits”, *APPLIED PHYSICS LETTERS*, vol. 85, n. 12, pp. 2730-2732, 2004.
58. T.M.H. Lee et al., “Detailed characterization of anodic bonding process between glass and thin-film coated silicon substrates”, *Sensors and actuators. A: Physical*, vol. 86, pp. 103-107, 2000.

59. L. Chen, G. Luo, K. Liu, J. Ma, B. Yao, Y. Yan, Y. Wang, “Bonding of Glass-Based Microfluidic Chips at Low- or Room-Temperature in Routine Laboratory”, *Sensors and Actuators. B: Chemical*, vol. 119, pp. 335–344, 2006.
60. V.G. Kutchoukov, F. Laugere et al., “Fabrication of Nanofluidic Devices Using Glass-to-Glass Anodic Bonding”, *Sensors and Actuators. A: Physical*, vol. 114, pp. 521–527, 2004.
61. D-J. Lee, Y-H. Lee, J.Jang, B-K. Ju, “Glass-to-Glass Electrostatic Bonding with Intermediate Amorphous Silicon Film for Vacuum Packaging of Microelectronics and its Application”, *Sensors and Actuators. A: Physical*, vol. 89, iss. 1-2, pp. 43–48, 2001.
62. J. Wei, S. Nai, C. Wong, L. Lee, “Glass-to- Glass Anodic bonding Process and Electrostatic Force”, *Thin Solid Films*, vol. 462-463, pp. 487-491, 2004.
63. D.R. Reyes, D. Iossifidis et al., “Micro Total Analysis Systems”, *Anal. Chem.*, vol. 74, iss. 12, pp. 2623-2652, 2002.
64. J.Khandurina, A. Guttman, “Bioanalysis in microfluidic devices”, *Chromatography*, vol. 924, iss. 1–2, pp. 233–238, 2001.
65. J. Zhang, Y. Han, “Active and responsive polymer surfaces”, *Chem. Soc. Rev.*, vol. 39, pp. 676-693, 2010.
66. H. Becker, L.E. Locascio, “Polymer Microfluidic Devices”, *Talanta*, vol. 56, pp. 267–287, 2002.
67. H. Becker, C. Gartner, “Polymer Microfabrication Technologies for Microfluidic Systems”, *Analyt. and Bioanalyt. Chem.*, vol. 390, pp. 89-111, 2008.
68. S. Tuomikoski, “Fabrication of SU-8 Microstructures for Analytical Microfluidic Applications”, *Dissertation for the Degree of Doctor of Science in Technology. Helsinki University of Technology, Micro and Nanosciences Laboratory*, 2007.
69. D. Duffy et al., “Rapid Prototyping of Microfluidic Systems in Poly(dimethylsiloxane)”, *Anal. Chem.*, vol. 70, pp. 4974-4984, 1998.

70. Q. Xiang, B. Xu, R. Fu, D. Li, “Real Time PCR on Disposable PDMS Chip with a Miniaturized Thermal Cycler”, *Biomed. Microdevices*, vol. 7, pp. 273–279, 2005.
71. Е.И. Школьников, О.И. Бузин, П.В. Гвасалия, Н.К. Гладкова, В.В. Волков, “Формирование пористой структуры в сплошных мембранах из блок-сополимеров”, *Крит. технол. Мембраны*, № 15, с. 34–38, 2002.
72. J.A. Kim, J.Y. Lee, S. Seong et al., “Fabrication and Characterization of a PDMS–Glass Hybrid Continuous-Flow PCR Chip”, *Biochemical Engineering Journal*, vol. 29, pp. 91–97, 2006.
73. V. Papadopoulos, G. Kokkoris, “Comparison of continuous-flow and static-chamber μ PCR devices through a computational study: the potential of flexible polymeric substrates”, *Microfluidics and Nanofluidics*, vol. 19, iss 4, pp. 867–882, 2015.
74. Y.S. Shin, K. Cho, S.H. Lim et al., “PDMS-Based Micro PCR Chip with Parylene Coating”, *J. Micromech. Microeng.*, vol. 13, pp. 768–774, 2003.
75. L.Yao, B. Liu, T. Chen, S. Liu, T. Zuo, “Micro Flow-Through PCR in a PMMA Chip Fabricated by KrF Excimer Laser”, *Biomed. Microdevices*, vol. 7, pp. 253–357, 2005.
76. R.M. Kaack, “PCR-Slide: A Modular and Cascadable Platform for DNA Sample Processing with Integrated Nanoliter Dosage”, *Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät für Angewandte Wissenschaften der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau*, 2005.
77. J. Chen, M. Wabuyele, H. Chen et al., “Electrokinetically Synchronized Polymerase Chain Reaction Microchip Fabricated in Polycarbonate”, *Anal. Chem.*, vol. 77, pp. 658–666, 2005.
78. Y. Liu, D. Ganser, A. Schneider et al., “Microfabricated Polycarbonate CE Devices for DNA Analysis”, *Anal. Chem.*, vol. 73, pp. 4196–4201, 2001.
79. N.-C. Tsai, C.-Y. Sue, “SU-8 Based Continuous-Flow RT-PCR Bio-Chips under High-Precision Temperature Control”, *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 22, pp. 313–317, 2006.

80. J. El-Ali, I.R. Perch-Nielsen, C.R. Poulsen et al., “Simulation and Experimental Validation of a SU- 8 Based PCR Thermocycler Chip with Integrated Heaters and Temperature Sensor”, *Sensors and Actuators A: Physical*, vol. 110, pp. 3–10, 2004.
81. A.S. Hoffman, “The origins and evolution of «controlled» drug delivery systems”, *J. Contr. Release*, vol. 132, pp. 153-163, 2008.
82. C. Wiles, P. Watts, “Continuous flow reactors: a perspective”, *Green Chem.*, vol. 14, pp. 38-54, 2012.
83. D. Beebe, G. Mensing, G. Walker, “Physics and applications of microfluidics in biology”, *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, vol. 4, pp. 261-286, 2002.
84. A. McPherson, “Crystallization of Biological Macromolecules”, *Cold Spring Harbor Lab. Press*, 1999.
85. M. Koishi, N. Ohya, Y. Mukobayashi et al., “Observation of Clear Images of Dislocations in Protein Crystals by Synchrotron Monochromatic-Beam X-Ray Topography”, *Crystal Growth and Design*, vol. 7, iss. 11, pp. 2182-2186, 2007.
86. Б. Альбертс, Д. Брей, Дж. Льюис и др., “Молекулярная биология клетки. В 3 томах”, *М.: Мир*, 1994.
87. Team of Authors, “Protein 3D-structure analysis – Why and How?”, *Swiss Institute of Bioinformatics Lectures*, 2013.
88. C. Hansen, S.R. Quake, “Microfluidics in structural biology: smaller, faster, better”. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 13, pp. 538-544, 2003.
89. H.M. Berman, “The Protein Data Bank: a historical perspective“, *Acta Crystallographica Section A: Foundations of Crystallography*, vol. 64, iss.1, pp. 88–95, 2008.
90. H.M. Berman et al., “The Protein Data Bank”, *Nucleic Acids Research*, vol. 28, iss.1, pp. 235-242, 2000.

91. P.C. Weber, "Physical principles of protein crystallization", *Adv. Prot. Chem.*, vol. 41, pp. 1-36, 1991.
92. T.M. Bergfors, "Protein crystallization: techniques, strategies and tips", *A Laboratory Manual (La Jolla, California)*, 1999.
93. Т. Бланделл, Л. Джонсон, "Кристаллография белка" (перевод с англ.), М: "Mup", 1979.
94. M. Leunissen, "An essay on several aspects of protein crystallization research", *Literature research, University of Cambridge press*, Department of solid state chemistry, 2001.
95. A. McPherson, "Preparation and analysis of protein crystals", *Krieger Pub Co Publishing*, 1989.
96. L.J. DeLucas, T.L. Bray, L. Nagy et al., "Efficient protein crystallization", *J. Struct. Biol.*, vol. 142, pp. 188-206, 2003.
97. A. Salis, B.W. Ninham, "Models and mechanisms of Hofmeister effects in electrolyte solutions, and colloid and protein systems revisited", *Chem. Soc. Rev.*, vol. 43, pp. 7358-7377, 2014.
98. R. Scorpio, "Fundamentals of Acids, Bases, Buffers & Their Application to Biochemical Systems", *Kendall Hunt Pub Co*, 2000.
99. D. McRee, "Practical Protein Crystallography", *San Diego: Academic Press*, pp. 1-23, 1993.
100. D.M. Blow, N.E. Chayen et al., "Control of nucleation of protein crystals", *Protein Sci.*, vol. 3, iss. 10, pp. 1638-1643, 1994.
101. N.E. Chayen, "Recent advances in methodology for the crystallization of biological macromolecules", *J. Cryst. Growth*, vol. 198/199, pp. 649-655, 1999.
102. L. Li, D. Mustafi, Q. Fu et al., "Nanoliter microfluidic hybrid method for simultaneous screening and optimization validated with crystallization of membrane proteins", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 103, iss. 51, pp. 19243-19248, 2006.

103. B. Rupp, “Biomolecular Crystallography: Principles, Practice, and Application to Structural Biology”, *Garland Science*, 2016.
104. И. П. Куранова др., “Выращивание кристаллов фосфоантетеин аденилилтрансферазы, карбоксипептидазы Т и тимидинфосфорилазы на международной космической станции методом встречной диффузии в капилляре”, *Кристаллография*, том 56, № 5, с. 941–948, 2011.
105. И. П. Куранова, “Кристаллизация белков на земле и в невесомости”, *Поверхность*, № 6, С.4-12, 2004.
106. Е.А. Смирнова и др. “Выращивание кристаллов белков на Российском сегменте Международной космической станции”, *Кристаллография*, т. 54, №5, с. 948-958, 2009.
107. P. Vekilov, M. Vorontsova , “Nucleation precursors in protein crystallization”, *Acta Crystallogr. F Struct. Bio. Commun.*, vol. 70, pp. 271-282, 2014.
108. F. Rosenberger et al., “Temperature dependence of protein solubility - determination and application to crystallization in X-ray capillaries”, *Journal of Crystal Growth*, vol. 129, pp. 1-12, 1993.
109. М.В. Ковальчук, В.О. Попов, “Рентгеновское и синхротронное излучение – путь к познанию структуры биомакромолекул”, *Наука в России*, № 3(195), С. 4-15, 2013.
110. Д.И. Свергун, Л.А. Фейгин, “Рентгеновское и нейтронное малоугловое рассеяние”, *М.: Наука*, 1986.
111. M. Sleutel, A. Van Driessche, “Role of clusters in nonclassical nucleation and growth of protein crystals”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 21, pp. 546-553, 2014.
112. М.А. Marchenkova, V.V. Volkov, A.E. Blagov et al., “In situ study of the state of lysozyme molecules at the very early stage of the crystallization process by small-angle X-ray scattering”, *Crystallography Reports*, vol. 61, iss. 5, pp. 5-10, 2016.

113. Ю.А. Дьякова и др. “Исследование условий образования единиц роста белкового кристалла в растворах лизоцима методом малоуглового рассеяния рентгеновских лучей”, *Кристаллография*, том 62, № 3, с. 364-369, 2017.
114. M.A. Marchenkova et al., “Investigation of the Initial Crystallization Stage in Lysozyme Solutions by Small-Angle X-ray Scattering”, *Crystal Growth and Design*, vol. 16, № 6, pp. 1792-1797, 2016.
115. Y. Zhu, L.-N. Zhu, R. Guo et al., “Nanoliter-Scale Protein Crystallization and Screening with a Microfluidic Droplet Robot”, *Scientific Reports* 4, Art. Number 5046, 2014.
116. L. Feigin, D. Svergun, “Structure Analysis by Small-Angle X-Ray and Neutron Scattering”, *New York: Plenum Press*, 1987.
117. Могилевский Л.Ю. и др., “Малоугловой рентгеновский дифрактометр с однокоординатным детектором”, *Кристаллография*, т. 29, № 3. с. 587-591, 1984.
118. S. Guha, “Fabrication of X-ray compatible microfluidic platforms for protein crystallization”, *Sens Actuators B Chem.*, vol. 174, pp. 1-9, 2012.
119. G. Kisselman, “X-CHIP: an integrated platform for high-throughput protein crystallization and on-the-chip X-ray diffraction data collection”, *Acta Cryst.*, vol. 67, pp. 533–539, 2011.
120. A. Muck, “Fabrication of Poly(methyl methacrylate) Microfluidic Chips by Atmospheric Molding”, *Anal. Chem.*, vol. 76, iss. 8, pp. 2290–2297, 2004.
121. Y. Chen et al., “Fabrication, Modification, and Application of Poly(methyl Methacrylate) Microfluidic Chips”, *Electrophoresis*, vol. 29, iss. 9, pp. 1801-1814, 2008.
122. Y. Sun, “Low-pressure, high-temperature thermal bonding of polymeric microfluidic devices and their applications for electrophoretic separation”, *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 16, № 8, pp. 1681-1688, 2006.

123. V. Sood, “An Experimental Study on Thermal Bonding Effects of PMMA Based Micro-devices Using Hot Embossing”, *Masters work, University of Texas Press*, pp 4-82 (118), 2007.
124. X. Zhu et al., “Study of PMMA thermal bonding”, *Microsyst. Technol.*, vol. 13, pp. 403-407, 2007.
125. J. Li, D. Chen, G. Chen, “Low-temperature thermal bonding of PMMA microfluidic chips”, *Anal. Lett.*, vol. 38, pp. 1127–36, 2005.
126. C.-W. Tsao, D. DeVoe, “Bonding of thermoplastic polymer microfluidics”, *Microfluid. Nanofluid.*, vol. 6, pp. 1–16, 2009.
127. H. Tran, W. Wu, N. Lee, “Ethanol and UV-assisted instantaneous bonding of PMMA assemblies and tuning in bonding reversibility”, *Sensors Actuators B*, vol. 181, pp. 955-962, 2013.
128. I. Ogilvie et al., “Solvent processing of PMMA and COC chips for bonding devices with optical quality surfaces” *14th Int. Conf. on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences*, pp. 1244–1246, 2010.
129. M. Rahbar et al., “Microwave-induced, thermally assisted solvent bonding for low-cost PMMA microfluidic devices”, *J. Micromech. Microeng.*, vol. 20, pp. 15-26, 2010.
130. W.S. Junior et al., “Friction spot welding of PMMA with PMMA/silica and PMMA/silica-g-PMMA nanocomposites functionalized via ATRP”, *Polymer*, vol. 55, pp. 5146–5159, 2014.
131. M. Madou, “Fundamentals of Microfabrication: the Science of Miniaturization 2nd edn”, *London: Taylor and Francis*, 2002.
132. R.T. Kelly, T. Pan, A.T. Woolley, “Phase-changing sacrificial materials for solvent bonding of high-performance polymeric capillary electrophoresis microchips”, *Anal. Chem.*, vol. 77, pp. 3536-3541, 2005.
133. M. Koesdjojo, Y. Tennico, V. Remcho, “Fabrication of a microfluidic system for capillary electrophoresis using a two-stage embossing technique and solvent welding on poly (methyl methacrylate) with water as a sacrificial layer”, *Anal. Chem.*, vol. 80, pp. 2311-2318, 2008.

134. X. Sun et al., “Rapid prototyping of poly (methyl methacrylate) microfluidic systems using solvent imprinting and bonding” *J. Chromatogr. A*, vol. 1162, pp. 162-166, 2007.
135. S. Ng et al., “Thermally activated solvent bonding of polymers”, *Microsyst. Technol.*, vol. 14, pp. 753–759, 2008.
136. C. Rensch, “Microfluidic reactor geometries for radiolysis reduction in radiopharmaceuticals”, *Appl. Radiat. and Isotop.*, vol. 70, pp. 1691-1697, 2012.
137. М.А. Кузнецов, М.А. Богородская, “Синтез ароматических радиофармпрепаратов, меченых ^{18}F , для применения в позитронно-эмиссионной томографии”, *Перспективные материалы*, Вып. 8, с. 376-382, 2010.
138. G.M. Whitesides, “The origins and the future of microfluidics”, *Nature*, vol. 442, pp. 368-373, 2006.
139. G. Rhodes, “Crystallography made crystal clear: a guide for users of macromolecular models. Edn. 3”, *Academic Press*, 2006.
140. A. Villasenor et al., “Fast drops: a high-throughput approach for setting up protein crystal screens”, *BioTechniques*, vol. 32, pp.184-189, 2002.
141. J.M. Schieferstein et al., “X-ray transparent microfluidic chips for high-throughput screening and optimization of in meso membrane protein crystallization”, *Biomicrofluidics*, vol. 11, iss. 2, pp. 024118, 2017.
142. B. Zheng, L. Roach, R. Ismagilov, “Screening of Protein Crystallization Conditions on a Microfluidic Chip Using Nanoliter-Size Droplets”, *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 125, iss. 37, pp. 11170, 2003.
143. T. Glawdel et al., “Droplet formation in microfluidic T-junction generators operating in the transitional regime”, *Phys. Rev. E.*, vol. 85, pp. 016322, 2012.
144. E. Chiarello et al., “Droplet breakup driven by shear thinning solutions in a microfluidic T-junction”, *Phys. Rev. Fluids*, vol. 2, iss. 12, pp. 123602, 2016.

145. G.F. Christopher et al., “Experimental observations of the squeezing-to-dripping transition in T-shaped microfluidic junctions”, *Phys Rev E.*, vol. 78, pp. 036317, 2008.
146. T. Thorsen et al., “Dynamic Pattern Formation in a Vesicle-Generating Microfluidic Device”, *Phys. Rev. Lett.*, vol. 86, pp. 4163, 2001.
147. J. Husny, J. J. Cooper-White, “The effect of elasticity on drop creation in T-shaped microchannels”, *J. Non-Newtonian Fluid Mech.*, vol. 137, pp. 121-136, 2006.
148. P. Garstecki et al., “Formation of droplets and bubbles in a microfluidic T-junction – scaling and mechanism of break-up”, *Lab Chip*, vol. 6, pp. 437-446, 2006.
149. A. Gupta, S.M. Sohel Murshed, R. Kumar, “Droplet formation and stability of flows in a microfluidic T-junction”, *App. Phys. Lett.*, vol. 94, pp. 164107, 2009.
150. T. Ezquerra et al., “Applications of Synchrotron Light to Scattering and Diffraction in Materials and Life Sciences”, *Springer*, 2009.
151. Э.В. Штыкова и др., “Малоугловое рентгеновское исследование строения макромолекул. Структура белка NS2 (NEP) в растворе”, *Кристаллография*, том 62, № 6, с. 889-898, 2017.
152. Э.В. Штыкова и др., “Малоугловое рентгеновское исследование строения полимеров. Карбосилановые дендримеры в растворе гексана”, *Кристаллография*, том 61, № 5, с. 781-792, 2016.
153. B.Silva, “SAXS on a chip: from dynamics of phase transitions to alignment phenomena at interfaces studied with microfluidic devices”, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 19, pp. 23690, 2017.
154. A. Ghazal, M. Gontsarik, J. P. Kutter et al., “Recent advances in X-ray compatible microfluidics for applications in soft materials and life sciences”, *Lab Chip*, vol.16, pp. 4263, 2016.

155. A. S. Poulos et al., ““Microfluidic SAXS Study of Lamellar and Multilamellar Vesicle Phases of Linear Sodium Alkylbenzenesulfonate Surfactant with Intrinsic Isomeric Distribution”, *Langmuir*, vol. 32, 5852–5861, 2016.
156. М.А. Марченкова и др., “In Situ-исследования состояния молекул лизоцима на стадии начала процесса кристаллизации методом малоуглового рентгеновского рассеяния”, *Кристаллография*, том 61, № 1, с. 10-15, 2016.