

ISSN 2223-0807

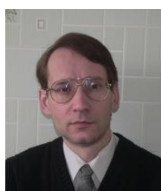
Современное машиностроение: Наука и образование :  
материалы 12-й Международной научной конференции / Под ред. А.Н. Евграфова и  
А.А. Поповича. - СПб.: ПОЛИТЕХ-ПРЕСС, 2023.

УДК 681.2+57.088

doi:10.18720/SPBPU/2/id23-538

А.Л. Буляница<sup>1</sup>, Н.А. Есикова<sup>2</sup>, А.А. Евстапов<sup>2</sup>

## **АВТОМАТИЗИРОВАННОЕ УСТРОЙСТВО ДЛЯ МОДИФИКАЦИИ ПОВЕРХНОСТИ И СИНТЕЗА ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СЛОЕВ В МИКРОФЛЮИДНЫХ ЧИПАХ**



<sup>1</sup>Антон Леонидович Буляница,  
Санкт-Петербургский политехнический университет Петра  
Великого  
Россия, Санкт-Петербург  
Тел.: (812)552-6750, E-mail: bulyanitsa\_al@spbstu.ru



<sup>2</sup>Надежда Александровна Есикова,  
Институт аналитического приборостроения Российской  
академии наук  
Россия, Санкт-Петербург  
Тел.: (812)363-0728, E-mail: elpis-san@yandex.ru.



<sup>2</sup>Анатолий Александрович Евстапов,  
Институт аналитического приборостроения Российской  
академии наук  
Россия, Санкт-Петербург  
Тел.: (812)363-0719, E-mail: an\_evs@mail.ru.

### **Аннотация**

В работе описана автоматизированная процедура реализации одного из ключевых этапов создания микрофлюидных устройств для иммунного и генетического анализа, а именно, целевая модификация поверхностей и синтез функциональных слоев элементов микрофлюидных чипов (каналов, реакционных камер и др.). Использование методов «мокрой» химии позволило эффективно модифицировать поверхности кремний-стеклянного микрочипа. Предложенные подходы были реализованы в виде

макета автоматизированного устройства, разработанного в Институте аналитического приборостроения РАН. Сами подходы применимы при разработке широкого класса приборов на микрофлюидной платформе для иммунного и генетического анализа.

*Ключевые слова:* модификация поверхности, автоматизированное устройство, «мокрая» химия, микрофлюидная система, иммунный и генетический анализ

## **Введение**

Микрофлюидные чипы находят все более широкое применение в различных сферах, включая науки о жизни [1], клиническую диагностику [2], системы анализа point-of-care, геномные исследования и другие [3].

Одной из особенностей микрофлюидики является высокое соотношение площади поверхности к объему по сравнению с традиционными системами. Для решения разнообразных задач возможно использование различных функциональных элементов, таких как магнитные или кремниевые частицы, интегрируемые колонки, пористые мембраны или, формируемые непосредственно в чипе, массивы микро- и наноструктур. Часть задач можно решить за счет функциональной обработки поверхности микроканалов, реакционных камер и других структур для придания требуемых свойств поверхности. Например, для выделения и очистки нуклеиновых кислот можно сформировать на поверхности камеры или на микроструктурах камеры слой из poly(2-dimethylaminomethyl styrene) (pDMAMS) film [4] или модифицировав ее производными борной кислоты [5].

Для микрочипов, используемых в приборах массового параллельного секвенирования ДНК, например, в НАНОФОР-СПС [6], на поверхности проточной реакционной камеры микрочипа создается функциональный слой, который обеспечивает возможность парноконцевого прочтения, см., также [7].

Необходимость получения стабильных и воспроизводимых свойств функциональных слоев в микрофлюидных чипах в случае их серийного изготовления обуславливает потребность автоматизации процесса. Поэтому был создан макет устройства, позволяющего проводить обработку поверхности внутренних элементов микрофлюидных чипов с использованием «мокрой» химии в полуавтоматическом режиме.

Таким образом, работа посвящена описанию автоматизированного устройства и основных стадий протокола модификации поверхности реакционной камеры микрофлюидного устройства для проведения генетического анализа.

## Методы

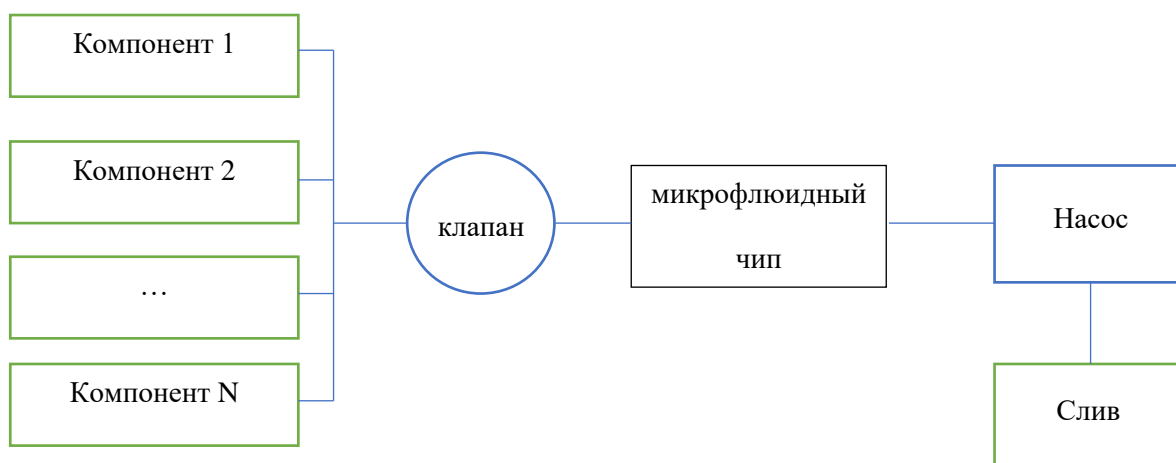
Наиболее изученными и отработанными методами активации и модификации поверхности, относительно легко поддающимися автоматизации, являются методы «мокрой» химии. Термин «мокрая» химия (на английском *wet chemical methods*) имеет достаточное распространение. Подобная трактовка термина представлена, в частности, в [8]. Исходя из известной и разработанной ранее конфигурации микрофлюидного устройства осуществляется его сборка, а последующая обработка и модификация поверхностей реакционных камер, каналов и других элементов, минимизирующая или исключая ингибирование реакции, например, полимеразной цепной реакции, проводится в полуавтоматическом режиме, практически исключая влияние человеческого фактора. Наиболее близкие к использованным нами методам модификации поверхностей элементов микрофлюидного устройства описаны в обзорных статьях [9, 10].

## Результаты

Были учтены требования к процессам модификации поверхностей элементов устройства и характеристики формируемых функциональных микрослоев, для чего последовательно разработаны протоколы обработки поверхности (последовательность операций и соответствующие временные диаграммы), выбраны номенклатура используемых реагентов и применяемых материалов, разработаны структурная и функциональная схемы установки и основные устройства (интерфейсы, держатели, делители потоков), способы их установки (фиксации) в устройстве и способы решения возникающих при этом проблем и осуществлен выбор режимов работы (расход реагентов и пробы, скорость транспортировки компонентов и продуктов целевых реакций) и элементов устройства (насосов и клапана), обеспечивающих надежную работу в указанных режимах.

Установлено, что целесообразнее всего проводить обработку микрофлюидного чипа в проточном режиме. Если нет особых требований к равномерности потока, можно использовать перистальтический насос. Для снижения влияния роли оператора на процесс обработки, выбраны программируемые версии перистальтического насоса Longepump и клапана переключения на 8 позиций. Функциональная схема макета приведена на рис. 1.

Подобная схема позволяет проводить практически любую обработку поверхностей микрофлюидного чипа и/или осуществлять синтез функциональных слоев на ней.



**Рис. 1.** Функциональная схема установки

Для микрофлюидных чипов из полимера существуют готовые решения для подведения к ним коммуникаций [11]. Однако, в лабораторных условиях проще/дешевле/быстрее получать чипы с плоской поверхностью, на которую выведены входные/выходные лунки. Для чипов из кремния и/или стекла есть готовые структуры для соединения с внешними жидкостными коммуникациями.

Одним из решений этой проблемы является создание оправы, в которую устанавливается чип и к которой подсоединяются необходимые устройства. В рассматриваемом случае расстояние между входной и выходной лунками микрофлюидного чипа диаметром 0,5 мм составляет всего 2 мм, а внешний диаметр подходящих к ним трубок – 1,5 мм. Поэтому соединение с микрожидкостными коммуникациями реализовано через толстый (4-5 мм) уплотнитель из эластомера Lasil T4. Ранее проверено, что данный материал обладает очень низкой проницаемостью, химически стоек и не ингибирует ПЦР. Именно по этой причине он использовался при создании микрофлюидного устройства для выделения нуклеиновых кислот [12].

В верхнюю часть уплотнителя вставляются трубки, а нижняя расположена соответственно под лункой. Это обеспечивает герметичное соединение. Держатели для чипов печатались на инжекционном 3d принтере.

Распределитель потоков позволяет выполнить параллельную обработку 4-х чипов. Сложная многостадийная обработка (от промывки/активации поверхности микрофлюидного чипа до синтеза функционального слоя) иногда занимает более суток. Поэтому

целесообразно организовать процесс обработки (модификации) параллельно для нескольких чипов.

Разработан распределитель жидких потоков 1-4, схема которого приведена на рис. 2. Элемент создан из эластомера Lasil T4 методом «мягкой» литографии с последующей герметизацией после обработки кислородной плазмой.



**Рис. 2.** Схема разветвителя 1-4

Как известно, для силанизации необходимо предварительно удалить с поверхности остатки водных растворов. При помощи перистальтического насоса данный процесс происходит долго. Поэтому был выбран способ сушки азотом. При этом возникает необходимость легко и оперативно отсоединять чипы от насоса. Это можно сделать вручную с последующим использованием дополнительного клапана для азота.

Поэтому был создан коннектор на 4 канала, позволяющий оперативно подсоединять/отсоединять держатели чипов от макета для перемещения в среду с необходимой температурой (например, в холодильник или термостат). Отметим также, что и нагрев и охлаждение микрочипа, необходимые при создании некоторых функциональных слоев, также могут быть легко автоматизированы. При этом, можно начинать обработку следующих чипов в других держателях, не дожидаясь завершения этапа охлаждения (нагрева) предыдущей партии чипов. Подобный подход позволяет ускорить производство чипов с функциональными слоями и снизить его стоимость. На рис. 3 представлена изображение макета автоматизированного устройства для обработки и модификации поверхностей микрофлюидного чипа, разработанного в Институте аналитического приборостроения РАН.



**Рис. 3.** Макет автоматизированного устройства для обработки и модификации поверхностей микрофлюидного чипа

В таблице 1 приведены основные геометрические параметры и другие ключевые характеристики, определяющие режим работы устройства и соответствующий выбор номенклатуры элементов, в частности, насосов.

**Таблица 1.** Характеристики микрофлюидного устройства

параметр	значение	параметр	значение
Суммарный объемный расход	2.0 мл/мин	Длина участка «компонент-клапан»	110 мм
Внутренний диаметр канала	0.75 мм	Длина участка «клапан-чип»	140 мм
Динамическая вязкость	1.0 мПа·с	Длина участка «чип-слив»	65 мм

Данные, представленные в таблице 1 позволяют провести оценку величины требуемой разности давлений  $\Delta P$  и выбрать насос, обеспечивающий необходимые расходы компонентов. Т.к. используются ламинарные потоки в канале круглого сечения, то сосчитав суммарное гидравлическое сопротивление микроканалов с учетом их параллельности (разделение на 4 равных потока) на участках «компонент-клапан» и «чип-слив» можно рассчитать требуемую величину по формуле (1), предложенной в [13]:

$$\Delta P = \frac{8 \cdot \eta \cdot L}{\pi \cdot r^4} \quad (1)$$

Здесь  $r$  – радиус каналов,  $\eta$  – динамическая вязкость,  $L$  – суммарная приведенная длина канала (длины участков с параллельным движением потоков делятся на 4),  $Q$  – суммарный объемный расход. Потерями расхода за счет однократных поворотов канала на 90 град (угол  $\alpha$ ) можно пренебречь. Согласно [14] можно оценить соотношение коэффициента потери напора из-за поворота  $\xi_1$  и коэффициент потери напора по длине  $\xi_2$ . Их значения определяются по формулам (2а) и (2б).

$$\xi_1 = 0.946 \cdot \sin(\alpha/2) + 2.047 \cdot \sin^2(\alpha/2) \quad (2a)$$

$$\xi_2 = \frac{32}{Re \cdot r} \quad (2б)$$

Первый из указанных коэффициентов, в соответствии с (2а) примерно равен 1.69. Число Рейнольдса для круглой трубы, использующее в качестве характерного размера диаметр, в наших условиях примерно 0.36. Благодаря малости радиуса канала величина  $\xi_2$  (2б) имеет порядок  $10^5$ . Таким образом, отношение  $\xi_1/\xi_2$  меньше  $10^{-5}$ , что позволяет пренебречь эффектами изгибов каналов даже при неоднократных изгибах.

Расчетная оценка требуемого перепада давления при перемещении водоподобных жидкостей дает величину примерно 200 Па. Таким образом, жестких ограничений по выбору насоса нет.

## Обсуждение

Прежде всего, разработка Институтом аналитического приборостроения РАН прибора «Секвенатор Нанофор – СПС» в печати обсуждалась либо на уровне общей информации [6], либо описывались аспекты, связанные исключительно с созданием программно-математического обеспечения [15]. Описание модификации поверхностей

конструктивных элементов микрофлюидного устройства, реализующего генетический анализ, даже на уровне общей схемы обработки в проточном режиме, представлено впервые. Таким образом, данную статью следует рассматривать как первую тематическую публикацию, содержащую описание этапов технологического маршрута изготовления элементов микрофлюидной системы для проведения генетического анализа, в первую очередь, обработки поверхности микрофлюидного чипа, в том числе и синтеза функциональных слоев на ней.

Для сравнения в [16] целью работы является разработка технологического маршрута изготовления интегрального многоосевого микромеханического акселерометра с использованием плазменных методов технологии поверхностной микрообработки в лаборатории плазменных нанотехнологий научно-образовательного центра «Нанотехнологии» Южного федерального университета. Он может, в каких-то случаях, предшествовать рассмотренной нами технологии модификации поверхностей и формирования функциональных слоев, как этап, на котором требуемые элементы создаются.

## **Заключение**

Стадия модификации поверхности и синтеза функциональных слоев элементов микрофлюидных систем не ограничивается кругом приборов для генетического анализа. Некоторые предложенные решения применимы при создании приборов иного назначения (приборов для иммунного анализа, биочипов, для синтеза и ряда других) с применением микрофлюидных технологий. Автоматизация процессов модификации поверхности и создания функциональных слоев элементов микрофлюидных устройств позволяет сократить время обработки, устранить влияние человеческого фактора, повысить воспроизводимость, точность и правильность анализа химических и биологических объектов (проб).

Разработка Института аналитического приборостроения РАН «Секвенатор Нанофор-СПС», для которой на одном из этапов использовалась описанная выше методика, реализована на практике. Это обстоятельство уже нашло свое отражение в СМИ, например, в [17].

Работа выполнена в рамках Государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № 075-01157-23-00 (тема FFZM-2022-0012).



## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Zhao, Y., Lv X., Li, X., Rcheulishvili, N., Chen, Y., Li, Z., Deng, Y. Microfluidic Actuated and Controlled Systems and Application for Lab-on Chip in Space Life Science. *Space Sci. Technol.*, 2023, 3, Article ID 0008.
- [2] Blanca, H. Lapizco-Encinas, Yan, Victoria Zhang Microfluidic systems in clinical diagnosis. *Electrophoresis*, 2023, 44, pp.217–245.
- [3] Bruijns, B., Knotter, J., Tiggelaar, R. A Systematic Review on Commercially Available Integrated Systems for Forensic DNA Analysis, *Sensors*, 2023, 23(3), 1075.
- [4] Yunho, Choi, Yong, Tae Kim, Seok, Jae Lee, Eunjung, Lee, Kyoung, G. Lee, Sung Gap Im Direct Solvent-Free Modification of the Inner Wall of the Microchip for Rapid DNA Extraction with Enhanced Capturing Efficiency. *Macromol. Res.*, 2020, 28(3), pp.249-256.
- [5] Hoang Chau La, Nae Yoon Lee Fabrication of a polycarbonate microdevice and boronic acid-mediated surface modification for on-chip sample purification and amplification of foodborne pathogens. *Biomed. Microdevices*, 2019, 21(3): 72.
- [6] Курочкин В.Е., Алексеев Я.И., Петров Д.Г., Евстапов А.А. Отечественные приборы для молекулярно-генетического анализа: разработки ИАП РАН и ООО «Синтол». *Известия Российской Военно-медицинской академии*, 2021, 40 (3), pp. 69–74.
- [7] Козлова О.С., Абрамова З.И. Сборка генома ангидробиотического насекомого *Polypedilum vanderplanki* с использованием данных Illumina и Pacbio. *Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. естеств. науки*, 2018, 160 (2), pp. 214–226.
- [8] Komarneni, S., Li, Q., Stefansson, K.M., Roy, R. Microwave-Hydrothermal Processing for Synthesis of Electroceramic Powders. *J. Mater. Res.*, 1993, 8(12), pp.3176-3184.
- [9] Amid Shakeri, Noor Abu Jarad, Ashlyn Leung, Leyla Soleymani, and Tohid F. Didar Biofunctionalization of Glass- and Paper-Based Microfluidic Devices: A Review, *Advanced Material Interfaces*, 2019. 6(19):1900940.
- [10] Amid Shakeri, Noor Abu Jarad, Shadman Khan, Tohid F Didar Bio-functionalization of microfluidic platforms made of thermoplastic materials: A review. *Analytica Chimica Acta*, 2022. 1209, 339283.
- [11] Yuksel Temiz, Robert D. Lovchik, Govind V. Kaigala, Emmanuel Demarche Lab-on-a-chip devices: How to close and plug the lab? *Microelectronic Engineering*, 2015. 132. pp. 156-175.
- [12] Germash, N.N., Esikova, N.A., Afonicheva, P.K., Antifeev, I.E., Petrov, D.G., Evstrapov, A.A. Elastomer planar device for nucleic acids extraction. *IOP Conf. Series: Journal of Physics: Conf. Series*, 2020, 1697. N 012043.

- [13] Bruus, H. Theoretical Microfluidics. 2008. Oxford Univ. Press Ink., New York, pp.74-86.
- [14] Гидравлическое сопротивление ... – Режим доступа: URL: <https://www.nektonnasos.ru/articles/gidravlichesкое-soprotivlenie/> (Дата обращения: 22.05.2023)
- [15] Бородинов А.Г., Манойлов В.В., Заруцкий И.В., Петров А.И., Курочкин В.Е. Методика оценки качества геномной сборки на основе анализа частотности К-меров в секвенаторе параллельного секвенирования. Научное приборостроение, 2022, 32(1), pp.3-10.
- [16] Гусев Е.Ю. Разработка технологии изготовления микромеханического акселерометра на основе поликристаллического кремния методами поверхностной микрообработки. Известия Южного федерального университета. Технические науки, 2016, 10 (183), pp.52-64.
- [17] «Успешно завершены испытания первого отечественного испытания первого отечественного полногеномного секвенатора ДНК «Нанофор СПС»: блог «Электроника, электротехника и приборы» – Сделано у нас. – URL: <https://sdelanounas.ru/blogs/135869/> (Дата обращения: 26.04.2023 г.),

A.L. Bulyanitsa<sup>1</sup>, N.A. Esikova<sup>2</sup>, A.A. Evstrapov<sup>2</sup>

## **AUTOMATED DEVICE FOR SURFACE MODIFICATION AND SYNTHESIS OF FUNCTIONAL LAYERS IN MICROFLUIDIC CHIPS**

<sup>1</sup>Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, Russia;

<sup>2</sup>Institute for Analytical Instrumentation RAS, St. Petersburg, Russia.

### **Abstract**

The paper describes an automated procedure for the implementation of one of the key stages in the creation of microfluidic devices for immune and genetic analysis, namely, the targeted modification of surfaces and synthesis of functional layers of microfluidic chip elements (channels, reaction chambers, etc.). The use of «wet» chemistry methods has made it possible to effectively modify the surfaces of silicon-glass microchip elements. The proposed approaches were implemented in the form of a mock-up of an automated device developed at the Institute for Analytical Instrumentation of the Russian Academy of Sciences. The approaches themselves are applicable in the development of a wide class of devices on a microfluidic platform for immune and genetic analysis.

*Key words:* surface modification, automated device, "wet" chemistry, microfluidic system, immune and genetic analysis

## REFERENCES

- [1] Zhao, Y., Lv X., Li, X., Rcheulishvili, N., Chen, Y., Li, Z., Deng, Y. Microfluidic Actuated and Controlled Systems and Application for Lab-on Chip in Space Life Science. *Space Sci. Technol.*, 2023, 3, Article ID 0008.
- [2] Blanca, H. Lapizco-Encinas, Yan, Victoria Zhang Microfluidic systems in clinical diagnosis. *Electrophoresis*, 2023, 44, pp.217–245.
- [3] Bruijns, B., Knotter, J., Tiggelaar, R. A Systematic Review on Commercially Available Integrated Systems for Forensic DNA Analysis, *Sensors*, 2023, 23(3), 1075.
- [4] Yunho, Choi, Yong, Tae Kim, Seok, Jae Lee, Eunjung, Lee, Kyoung, G. Lee, Sung Gap Im Direct Solvent-Free Modification of the Inner Wall of the Microchip for Rapid DNA Extraction with Enhanced Capturing Efficiency. *Macromol. Res.*, 2020, 28(3), pp.249-256.
- [5] Hoang Chau La, Nae Yoon Lee Fabrication of a polycarbonate microdevice and boronic acid-mediated surface modification for on-chip sample purification and amplification of foodborne pathogens. *Biomed. Microdevices*, 2019, 21(3): 72.
- [6] Kurochkin, V.E., Alexseev, Ya.I., Petrov, D.G., Evstrapov, A.A. Domestic devices for molecular genetic analysis: developments of the IAI RAS and SINTOL LLC. *News of the Russian Military Medical Academy*, 2021, 40 (3), pp. 69–74. (rus.)
- [7] Kozlova O.S., Abramova Z.I. Genome assembly of the anhydrobiotic insect *Polypedilum vanderplanki* using Illumina and Pacbio data. *Scien. zap. Kazan. Univ. Ser. natures. sciences*, 2018, 160 (2), pp. 214–226. (rus.)
- [8] Komarneni, S., Li, Q., Stefansson, K.M., Roy, R. Microwave-Hydrothermal Processing for Synthesis of Electroceramic Powders. *J. Mater. Res.*, 1993, 8(12), pp.3176-3184.
- [9] Amid Shakeri, Noor Abu Jarad, Ashlyn Leung, Leyla Soleymani, and Tohid F. Didar Biofunctionalization of Glass- and Paper-Based Microfluidic Devices: A Review, *Advanced Material Interfaces*, 2019. 6(19):1900940.
- [10] Amid Shakeri, Noor Abu Jarad, Shadman Khan, Tohid F Didar Bio-functionalization of microfluidic platforms made of thermoplastic materials: A review. *Analytica Chimica Acta*, 2022. 1209, 339283.
- [11] Yuksel Temiz, Robert D. Lovchik, Govind V. Kaigala, Emmanuel Demarche Lab-on-a-chip devices: How to close and plug the lab? *Microelectronic Engineering*, 2015. 132. pp. 156-175.

- [12] Germash, N.N., Esikova, N.A., Afonicheva, P.K., Antifeev, I.E., Petrov, D.G., Evstrapov, A.A. Elastomer planar device for nucleic acids extraction. IOP Conf. Series: Journal of Physics: Conf. Series, 2020, 1697. N 012043.
- [13] Bruus, H. Theoretical Microfluidics. 2008. Oxford Univ. Press Ink., New York, pp.74-86.
- [14] Hydraulic resistance ... – Access mode: URL: <https://www.nektonnasos.ru/articles/gidravlichesкое-soprotivlenie/> (Accessed: 05/22/2023) (rus.).
- [15] Borodinov, A.G., Manoilov, V.V., Zarutskiy, I.V., Petrov, A.I., Kurochkin, V.E. methodology for assessing the quality of genomic assembly based on the analysis of the frequency of k-mers in a parallel sequencing sequencer, Nauchnoe Priborostroenie, 2022, 32 (1), pp. 3–10. (rus.)
- [16] Gusev, E.Yu. Development of manufacturing technology of micro-mechanical accelerometer based on polycrystalline silicon by surface microtreatment methods. Proc. of the South Federal University. Technical sciences, 2016, 10 (183), pp.52-64. (rus.)
- [17] «The tests of the first domestic test of the first domestic full–genome DNA sequencer «Nanophore SPS» have been successfully completed: blog «Electronics, Electrical engineering and devices» - Made with us. – URL: <https://sdelanounas.ru/blogs/135869/> (Accessed: 04/26/2023.) (rus.)