УДК 543.4+543.5+543.9

Микрофлюидные чипы для биологических и медицинских исследований

А. А. Евстрапов

АНАТОЛИЙ АЛЕКСАНДРОВИЧ ЕВСТРАПОВ — кандидат технических наук, старший научный сотрудник, заведующий лабораторией информационно-измерительных био- и хемосенсорных микросистем Учреждения Российской Академии наук Института аналитического приборостроения РАН (ИАП РАН), доцент кафедры нанотехнологий и материаловедения Санкт-Петербургского государственного университета информационных технологий, механики и оптики. Область научных интересов: разработка и создание аналитических приборов на основе био- и хемосенсорных микросистем, микро- и нанофлюидных устройств; методы оптической спектроскопии и высокоразрешающей микроскопии для изучения свойств природных и искусственных материалов.

190103 Санкт-Петербург, Рижский просп., 26, Институт аналитического приборостроения РАН, тел. (812)251-86-00, (812)251-76-38, факс (812)251-76-38, E-mail an_evs@mail.ru

Введение

Микрофлюидика (микрогидродинамика) сформировалась как самостоятельное научное направление, изучающее поведение жидкостей (и газов) на микроуровне, в 1990-е годы. Современным развитием микрофлюидики является нанофлюидика [1], изучающая эффекты в наноразмерных системах, транспорт молекул через наноканалы, взаимодействие с наноструктурами и т.д.

Стремительное развитие микрофлюидики привело к разработке приборов, в которых осуществляется воспроизводимое управление течением жидкостного и газожидкостного потоков нано- и пиколитровых объемов жидкости в микроразмерных каналах [2]. Появилась возможность реализации методик анализа и создания приборов с отличными от макроаналогов техническими характеристиками.

Первые микрофлюидные аналитические средства на планарных компактных устройствах — чипах — воспроизводили методики электрофоретического разделения, впоследствии появились микрочипы, реализующие другие методы анализа, в частности, на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР). Пионерскими исследованиями в области создания систем на микрочиповой платформе для проведения ПЦР следует считать работы Л. Криска [3—5]. А первые работы по коммерческому использованию микрочиповых технологий для амплификации нуклеиновых кислот провел А. Нортроп с соавт. Была показана возможность скоростного проведения ПЦР на микрочипе [6, 7].

В 1994 году появились публикации работ Рамзея с сотр., развивающих методы электрофоретического и электрохроматографического разделения проб на микрофлюидном чипе [8—11]. Эта исследовательская группа занимается созданием высокоэффективных систем по микро- и нанотехнологиям, предназначаемых для клинической диагностики, высокопроизводительного биохимического анализа, для решения задач фармакологии и биотехнологии.

Приборы на основе микрофлюидных чипов обладают рядом преимуществ по сравнению с традиционными аналитическими системами. Прежде всего это малый расход реагентов и пробы; высокая чувствительность определения компонентов пробы; компактные размеры, низкое энергопотребление.

Отметим, что аналитические системы на основе микрофлюидных чипов за рубежом получили названия lab-on-a-chip (лаборатория на чипе) и micro Total Analysis Systems (микросистемы «полного» анализа) [12].

В рамках данной статьи рассматриваются микрофлюидные устройства на основе чипов для анализа биологических проб — доступные и надежные системы диагностики, не требующие специальных условий эксплуатации и высокой квалификации персонала [13].

В связи с огромным объемом материала по микрофлюидным системам, их применению в биологии и медицине, настоящая статья не претендует на всеобъемлющий обзор, ее цель — дать общее представление об этой динамично развивающейся области.

Микрофлюидные чипы

Топология и конструкция микрочипа для исследования биологических объектов определяются теми операциями, которые планируется реализовать на чипе. В простейшем случае микрофлюидные чипы представляют собой конструкцию из двух герметично соединенных пластин: на одной пластине формируются микроканалы,

реакторы, клапаны, электроды и другие функциональные элементы, другая пластина — защитная [14, 15]. Важным моментом в обеспечении работы микрофлюидного устройства является организация движения потоков жидкости по микроканалам. В общем случае способы и методы управления движением частиц и потоков в микрофлюидных устройствах можно классифицировать, исходя из природы воздействующего поля, побуждающего движение потоков и частиц: силовые поля (давление, разрежение, гравитация, центробежные силы и др.); электрические постоянные (электроосмос, электрофорез) и переменные поля (диэлектрофорез, электроротация и т.д.); электромагнитные поля (фотофорез, оптофорез, электромагнитофорез, оптический пинцет); магнитные поля (магнитофорез и т.д.); ультразвуковые поля. Несколько иной подход предлагают авторы [16]. Они рекомендуют подразделять устройства на микрофлюидной платформе на пять групп в соответствии с принципами движения жидкости: капиллярные устройства, устройства, в которых движение пробы осуществляется под давлением, центробежные, электрокинетические и акустические системы. Способ управления движением потоков жидкости также определяет топологию и конструкцию микрофлюидного чипа.

Во многих случаях анализируемая проба имеет сложный состав и для проведения анализа, например, крови требуется осуществить многоэтапную пробоподготовку, отделить частицы, клетки или молекулы для последующего анализа. Наиболее простым методом разделения частиц в микрофлюидных устройствах является дискриминация частиц по размерам (фильтрация), но при этом разделяемые частицы должны иметь различия в размерах, а для эффективного разделения требуется система фильтров [17]. В некоторых аналитических системах применяются микрофлюидные чипы, выполненные в виде диска (CD-чип) [18, 19], в которых движение потоков вызывают центробежные силы. В этом случае для разделения частиц необходимо существенное различие в плотности. Для разделения частиц с близкими характеристиками применяют другие методы [20—34], например, диэлектрофорез [26—28], оптофорез и оптическую хроматографию [29, 30], магнитофорез [31, 32], разделение в акустических полях [33, 34] и т.д. Наиболее распространены электрокинетические методы, но для их реализации в микрофлюидных устройствах требуется выбор режимов управления, подбор среды для разделения, учет возможных химических и электрохимических реакций и т.п. [35, 36].

Изготовление микро- и наноразмерных структур микрофлюидного чипа

Процесс создания аналитического микрочипа составляют следующие стадии: разработка топологии и конструкции микрочипа; изготовление микро- и наноразмерных структур на подложке; формирование пленочных покрытий и/или обработка поверхности; контроль параметров микро- и наноструктур; создание интерфейсных устройств; герметизация полученных структур и элементов; контроль и испытание микрочипа как готового изделия; упаковка микрочипа.

Методы изготовления микроразмерных структур на подложке основаны на активном воздействии на поверхность материала (фотолитография, лазерная микрообработка, литье, кислотное травление, ионно-реактивная обработка и др.) [37—51], что приводит к изменению поверхностных свойств подложки.

Подробно с технологиями и методами формирования микроструктур можно ознакомиться в соответствующих обзорах и книгах [52—59].

Уменьшение поперечного сечения микрофлюидных каналов до наномасштаба должно обеспечить более эффективное проведение стадий транспортировки, сортировки и обнаружения отдельных биологических молекул, например ДНК. Однако высокая стоимость изготовления, сложные процессы изготовления, контроля и испытаний наноструктур ограничивают исследования в области разработки наноструктур. Между тем методы разделения и обнаружения с использованием наноканалов весьма перспективны для широкого применения в медицине, фармакологии, биотехнологии и др. [60, 61]. Так, использование наноразмерных каналов и нанопор в микрофлюидных устройствах позволяет значительно повысить аналитические возможности при исследовании биологических проб [62]. Одиночные наноканалы и нанопоры дают возможность изучать отдельные молекулы, а множество параллельных наноструктур позволяет оперировать с огромным количеством молекул одновременно и получать более полную информацию об образце. Нанофлюидные устройства могут использоваться для изучения конформационных, динамических и других свойств молекул ДНК в различных средах, для получения генетической информации по длине молекулы ДНК [63].

Выбор метода формирования наноструктур в аналитическом микрочипе определяется требуемыми характеристиками и материалом подложки чипа. Для изготовления наноструктур или наноканалов в кремниевых, кварцевых и стеклянных подложках используется фотолитография с УФ излучением. Существуют различные комбинации методов, например, фотолитография и реактивное ионное травление, фотолитография и электронная литография и др., где оптическая литография применяется для создания шаблона, по которому формируется топология чипа [64]. Методы оптической литографии активно развиваются, причем предпринимаются попытки создания способов прямого формирования наноструктур без применения шаблона. Экспериментально показано, что воздействие фемтосекундного лазерного импульса на прозрачные диэлектрики приводит к нелинейным повреждениям материала, позволяя удалять сверхмалые количества материала и формировать структуры, имеющие размеры меньшие, чем длина волны излучения лазера. В работе [65, 66] продемонстрирована возможность прямой лазерной обработки материалов и получены наноразмерные каналы и нанопоры в кварце, стекле, полидиметилсилоксане и алмаз-

ной пленке на кремниевой подложке. Метод глубокого реактивного ионного травления позволяет серийно изготавливать микроэлектромеханические системы (МЭМС) [67] с высокими соотношениями глубина/ширина формируемых каналов (до 30:1) в кремниевых пластинах. Этот метод может быть использован при создании наноструктур для аналитических микрочипов. Известны модификации метода, с помощью которых получены более высокие соотношения размеров каналов (40:1) и достигнута их ширина до 130 нм [68]. Использование сфокусированного ионного пучка распространено в микроэлектронной промышленности как техника безмасочного производства микро- и наноструктур [69]. Этот метод также пригоден для прямого формирования наноканалов для небольшой партии микрофлюидных чипов [70].

Материалы для микрофлюидных чипов

Традиционными материалами для микрочиповых устройств являются кремний, кварц и стекло. Оптические характеристики и электропроводность кремния несколько ограничивают его применение в микрофлюидных чипах. Кварц и стекло являются оптически прозрачными в широкой области спектра, что позволяет применять оптические методы детектирования.

В последнее время наметилась устойчивая тенденция использования полимерных материалов, таких как полидиметилсилоксан, поликарбонат, полиметилметакрилат, полиэтилентерефталат, полиимид, полимер SU-8 и т.д. [71]. Полимеры получили широкое распространение благодаря низкой себестоимости и относительно низкой стоимости при массовом производстве [72]. Более простыми являются и способы герметизации полимерных пластин. Но тем не менее кремний и стеклянные материалы остаются востребованными при создании микроаналитических систем, в отношении которых предъявляются повышенные требования к метрологическим характеристикам.

Для изготовления микрочиповых устройств часто используется полидиметилсилоксан марки Sylgard® 184 — эластомерный материал, обладающий хорошей оптической прозрачностью и лучшей биосовместимостью, чем кремний. Из него изготавливаются дешевые микрофлюидные чипы однократного использования [73], он может также применяться для герметизации микрофлюидных чипов [74]. Хорошей биосовместимостью обладает полиметилметакрилат (марки Perspex, Plexiglas, ТОСП и др.) [75]. Он оптически прозрачен, имеет меньшую собственную флуоресценцию, чем другие полимеры, например поликарбонат. Применительно к этому материалу отработаны методы термического связывания, но недостатком этих методов является то, что они вызывают изменение размеров герметизируемых структур [76]. Ведутся поиски способов, позволяющих устранить этот недостаток. Так, предложен метод низкотемпературной герметизации чипа из полиметилметакрилата с использованием растворителя [77]. В полиэтилентерефталате, имеющем низкую температуру стеклования, микроструктуры могут быть сформированы методом горячего тиснения без вакуума. Этот материал может использоваться для изготовления чипов, для функционирования которых не требуются повышенные температуры. В работе [78] для изготовления чипов из полиэтилентерефталата использовали метод плазменной обработки поверхности, который обеспечивает улучшение соединительной способности материала при герметизации. Полимер SU-8 специально разработан для микроэлектроники, а затем адаптирован к применению в МЭМС. Из материала SU-8 изготавливают структуры с высоким пространственным разрешением и соотношением глубина/ширина до 25 для систем lab-on-a-chip непосредственно в «обычных» лабораториях, без дорогостоящего технологического оснащения [79].

Герметизация микрофлюидных чипов

Для получения прочного и герметичного соединения кремниевых пластин используют термические методы (при температурах свыше 1000 °С) и методы анодного связывания (при температурах от 200 до 700 °С и напряжении 250—1500 В).

Технологии обработки кварца и стекол схожи с технологиями обработки кремния. Методы герметизации стеклянных чипов основаны на воздействии высоких температур и давлений, пониженных температур и других физических факторов и на процессах химического связывания. Развитие методов герметизации при низких температурах [80, 81] вызвано необходимостью соединять пластины с электродами, покрытиями и термочувствительными элементами. Герметизация стеклянных пластин с микроканалами обычно осуществляется методами термического связывания (спекания) при высоких температурах (500—1050 °С), анодного связывания (при 70—500 °С и напряжении 50—1200 В) [82, 83], формированием промежуточных слоев [84], склеиванием полимерными композициями, в том числе и фотоотверждаемыми полимерами [85, 86], методами оптического и глубокого оптического контакта и др. В случае применения методов термического связывания и оптического контакта предъявляются высокие требования к качеству соединяемых поверхностей. Для реализации этих методов необходимо использовать специальные средства и оборудование, например термопрессы. Поэтому усилия исследователей направлены на создание более простых и менее трудоемких методов. В работе [87] при изготовлении микрофлюидных чипов из кварца использовали метод низкотемпературного связывания пластин, включающий стадию соединения пластин и последующий отжиг при температуре 200 °С в течение 6 ч. Авторами [88] продемонстрирован метод низкотемпературного связывания стеклянных пластин после предварительной обработки концентрированной серной кислотой в условиях «обычных» лабораторий (для работы не требуются чистые комнаты и высокотемпературные печи).

Альтернативный способ герметизации микроструктур — склеивание, достоинством которого является нечувствительность к присутствию на поверхности ино-

родных частиц и возможность соединять пластины с разнообразными функциональными покрытиями, в том числе с токопроводящими слоями. Широкий ассортимент фотоотверждаемых УФ излучением клеев, пригодных для соединения стекла с металлами и полимерами, и, следовательно, для герметизации микроструктур дает возможность развивать эти методы. Такие методы герметизации имеют свои особенности, в частности, требуется создание на поверхности защитной пластины тонкого слоя клея толщиной намного меньшей, чем глубина каналов. Например, в работе [89] описывается способ соединения микрофлюидных чипов с помощью УФ отверждаемого клея путем введения его и перераспределения между поверхностями соединяемых пластин за счет капиллярных сил. Методы герметизации фотоотверждаемыми полимерами можно использовать в исследовательских лабораториях при изготовлении небольшой партии аналитических микрочипов [90].

Детектирование в микрофлюидных чипах

Особенностью микрофлюидных аналитических методов являются малые количества исследуемых проб, а следовательно, относительно малые информационные сигналы. Разработчики аналитических микрочипов стремятся привлечь методы детектирования, обеспечивающие низкий предел обнаружения, высокую селективность и чувствительность измерений, высокое быстродействие. Распространенными методами детектирования компонентов биологических проб в микрофлюидных чипах являются лазер-индуцированная флуоресценция [91—93], электрохимическое детектирование [94—97], хемилюминесценция [98], масс-спектрометрия [99, 100], рамановская спектроскопия [101], интерферометрия и рефрактометрия [102] и др.

Для подробного ознакомления с методами и способами детектирования в микрофлюидных чипах рекомендуются обзоры [103—107]. В последнее время нашли применение новые методы детектирования, в частности, метод термолинзового детектирования [108—110].

Микрофлюидные чипы для разделения и анализа нуклеиновых кислот и белков

Важным направлением в биологических исследованиях является изучение генетических мутаций и полиморфизмов, которые могут видоизменять функции гена и, по-видимому, являться причиной унаследованных болезней и других заболеваний. Для экспресс-анализа ДНК применяются методы капиллярного электрофореза и электрофореза на микрочипе [111—114], масс-спектрометрия [115—118]; гибридизационный анализ на микрочипе (биочипе) [119]. Метод электрофореза на микрочипе позволяет проводить анализ малых объемов пробы с высокой производительностью и быстродействием на компактных устройствах, которые могут быть встроены в другие системы [120—123].

Первые работы по использованию электрофореза на чипе были выполнены в 1990-х годах [124—126]. В 1994 году Вулли и Матис продемонстрировали быстрое (120 с) разделение фрагментов ДНК (271 и 281 п.о.) на многоканальном микрофлюидном чипе с каналом длиной 35 мм [127]. По сравнению с традиционным капиллярным электрофорезом в методе на микрочипе короткие длины сепарационных каналов в сочетании с высокой напряженностью электрического поля дают возможность провести быстрое разделение компонентов пробы — вплоть до нескольких секунд. Эффенхаузер и др. [128] методом электрофореза на микрочипе проводили разделение смеси олигомеров длиной от 10 до 15 п.о., используя полиакриламид как разделительную матрицу. МакКормик с соавт. [129] на микрофлюидном чипе из полиметилметакрилата разделял фрагменты двухцепочечных ДНК за время менее 3 мин.

При разделении ДНК методом электрофореза помимо влияния напряженности электрического поля для достижения качественного высокоскоростного разделения критическими являются такие факторы, как среда разделения, концентрация, состав и pH буферного раствора [130, 131]. Для обеспечения эффективного разделения фрагментов ДНК, обладающих примерно одинаковой электрофоретической подвижностью в свободном состоянии, композиция полимерной матрицы чипа должна быть оптимизирована с учетом химической природы и физических характеристик полимера и концентрации полимера в буферном растворе [132—136]. Иногда для качественного разделения на микрофлюидном чипе требуется проводить модифицирование поверхности микроканалов [137, 138].

В работе [139] использовалась другая техника разделения ДНК на стеклянно-кремниевых гибридных микроустройствах. Разделение осуществляли в ультракоротких каналах (длина менее 1,5 см) при низком напряжении (30 В) в полиакриламидном геле. ДНК-фрагменты размером от 120 до 400 п.о. разделяли за 85 мин. Та же группа исследователей использовала универсальную микроэлектрофоретическую платформу, включающую множество электродов, нагревателей, температурных датчиков, которая позволяют применять различные гелевые структуры для разделения одно- и двухцепочечных ДНК в канале длиной 1 см [140].

Проект «Геном человека» стимулировал развитие технологий электрофоретического секвенирования. Хотя геном человека считается записанным, но технология секвенирования постоянно развивается, создаются коммерческие приборы и аналитические системы в формате микроустройств. Вулли и Матис [127], используя четырехцветный формат обнаружения, провели секвенирование ДНК за 540 с в микроканале длиной 3 см. Лю и др. [141], оптимизировав состав матрицы для разделения и условия разделения, провели анализ последовательности ДНК с длиной считывания 500 п.о. за 20 мин. В работе [142] секвенирование ДНК выполнено на микрочипе с 16 каналами. За 15 мин проанализировали последовательность ДНК с длиной считывания 450 п.о. Развитием этих работ стало появление многоканальных микрофлюидных чипов. Так, в работе [143] были изготовлены 96-канальные микрочипы с сепара-

ционным каналом длиной 16 см для считывания до 500 п.о. за 25 мин.

В постгеномную эру наиболее интересной для исследователей становится протеомика. Карта протеома человека, подобная геному, даст огромную полезную информацию биологам, изучающим влияние окружающей среды и лекарственных препаратов на организм человека. Для молекулярного исследования состава клеток перспективны высокопроизводительные устройства, изготовленные по микрочиповым технологиям [144]. Важным для клинической диагностики является изучение белков, так как они могут информировать о системных заболеваниях. Белки более сложный объект анализа, чем ДНК. Кроме того, белки невозможно амплифицировать, поэтому необходимо применять другие способы концентрирования. Анализ белков осложняется, поскольку они чувствительны к различным физическим и химическим воздействиям. Задача разделения и анализа белков успешно решается при использовании микрофлюидных чипов.

Первая удачная попытка адаптации микрофлюидной техники к анализу белков с использованием метода зонного капиллярного электрофореза была осуществлена в работах [145—147]. Затем были приспособлены методы гель-электрофореза, изоэлектрического фокусирования [148—152], мицеллярная электрокинетическая хроматография, микрохроматография [153], электрохроматография [154, 155] и другие методы анализа [156—158]. Для анализа белков в некоторых случаях применяются наноматериалы, позволяющие увеличить чувствительность обнаружения [159]. Сочетание микрофлюидных устройств с масс-спектрометрическими методами позволяет получать впечатляющие результаты при анализе белков [160].

Метод электрофореза на чипе используется также для анализа неорганических и органических веществ [161, 162], для иммунного анализа [163, 164] и пр. Важно отметить, что одним из многообещающих направлений развития микрофлюидных технологий является разработка приборов для синтеза биополимеров, в том числе олигонуклеотидов [165]. Такие системы позволяют существенно снизить стоимость генетических исследований и сократить время синтеза.

Микрофлюидные системы совершенствуются, уделяется внимание созданию дешевых доступных аналитических устройств и их составных частей, например, таких как чувствительный элемент микрофлюидного устройства на основе модифицированной бумаги [166, 167].

Микрофлюидные устройства для проведения полимеразной цепной реакции

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) занимает одно из первых мест среди методов анализа ДНК/РНК как в научных исследованиях при клонировании генов и секвенировании ДНК, так и в прикладных исследованиях при генетическом анализе, диагностике опасных инфекций, обнаружении генетически модифицированных продуктов, в медицинской диагностике, криминалистике и т.п. [168—170].

Современные технологии позволяют изготавливать микрочипы с реакционной камерой для проведения ПЦР, характеризующейся высоким соотношением площади поверхности к объему, что обеспечивает быстрый и эффективный теплообмен. Микроустройства для проведения ПЦР можно классифицировать по принципу и механизму нагревания реакционной смеси (прямое нагревание камеры, нагрев смеси в потоке, конвекционное нагревание, нагревание электромагнитным излучением) и по способам транспортировки реакционной смеси (стационарные и проточные системы) [171, 172]. К системам со стационарными реакционными камерами, в которых температура меняется в течение каждого цикла амплификации, относятся однокамерные чипы [173, 174] и мультикамерные чипы [175—181]. Пожалуй, самые важные проблемы функционирования таких систем состоят в получении однородных управляемых температурных полей, в предотвращении перекрестного переноса материала образцов (контаминации) из соседних камер и в модифицировании поверхности реакционной камеры для увеличения эффективности реакции.

Исследователи из Institute of Bioengineering and Nanotechnology (Сингапур) предложили принципиально иной подход к созданию стационарных камер для проб малого объема. Этот подход заключается в использовании специально организованной гидрофобной-олеофобной поверхности, с помощью которой капля смеси ПЦР попадает внутрь другой капли большего объема, выполняющей функцию реакционной камеры [182, 183]. Такие камеры получили название «виртуальных».

В проточных микрофлюидных чипах для ПЦР при прохождении реакционной смеси по микроканалу через соответствующие температурные зоны происходит амплификация. Вариант такого чипа для ПЦР был предложен Накано с сотр. в 1994 году [184]. Впоследствии проточные микрочипы были усовершенствованы [185, 186]. В отличие от ПЦР-микрочипов со стационарными камерами в микрофлюидных чипах тепловая инерция системы сведена к минимуму, так как определяющей является термическая масса ПЦР-смеси. Периодичность изменения температуры зависит от скорости и стабильности потока реакционной смеси и времени достижения термического равновесия. Коммерческие проточные микрофлюидные чипы из полимерных материалов в настоящее время выпускаются компанией «Microfluidic ChipShop GmbH».

Проточный вариант имеет ряд недостатков: образование пузырьков воздуха в микроканалах неблагоприятно влияет на ход реакции; управляемый давлением поток имеет параболический профиль, что приводит к размытию образца; скорость, с которой реакционная смесь перемещается в различных температурных зонах, трудно регулировать и контролировать. Для преодоления этих недостатков разработаны различные приемы [187], а иногда и альтернативные подходы. Например, Накаяма с сотр. [188] предлагает для предотвращения

образования пузырьков воздуха в каналах вводить в них капли вязкого масла перед загрузкой ПЦР-смеси. В работах [189, 190] исследованы механизмы образования пузырьков в микрореакторах, имеющих разную геометрию, с подводящими каналами, изготовленными в полидиметилсилоксане и стекле. Предложены способы подавления этого эффекта.

В проточных ПЦР микрочипах с каналами в виде спирали или серпантина трудно реализовать одновременную амплификацию большого числа проб. В некоторых работах, например в [191], предложен микрочип с линейным каналом, по которому поток циклически протекает в прямом и обратном направлениях, проходя через три температурные зоны, что дает возможность создать конструкцию чипа для параллельной амплификации множества проб.

Благодаря высокому соотношению площади поверхности к объему реакционных камер и каналов ПЦР-микрочипов осуществляется взаимодействие между поверхностью и молекулами реакционной смеси, что влияет на эффективность реакции. Для успешного проведения ПЦР на микрочипе внутреннюю поверхность реакционной камеры или микроканала модифицируют. Методы обработки поверхности могут быть квалифицированы как статические [179, 192—196] и динамические [179, 188, 197, 198].

Среди исследователей нет единого мнения о том, какой может быть минимальным объем камеры для эффективного проведения ПЦР. Ниже кратко представлены микрочипы с реакторами разного объема для ПЦР-смеси. В [199] разработан микрофлюидный чип для выполнения 72-х параллельных ПЦР с обратной транскриптазой, объем вводимой реакционной смеси 450 пл. Описано [179] устройство объемом 33 нл для проведения 3072 параллельных реакций. Матсубара с соавт. [175] предложил интегрированное ПЦР-устройство из кремния с микрокамерами, объем вводимой смеси 40 нл. В работе [183] авторы сообщают о ПЦР-системе с «виртуальными» реакционными камерами для амплификации образца с реакционным объемом 100 нл, покрытого минеральным маслом (1 мкл). Гуттенберг с сотр. [200] провели амплификацию образца 200 нл, находящегося в капле (5 мкл) минерального масла. Группа Ландерса [201] разработала интегрированное ПЦР-устройство с системой электрофоретического разделения, в который образец вводится под давлением посредством клапана из эластомера, амплификация проводится в камерах объемом 280 нл. В работе [202] описывается система, в которой амплификация осуществляется в капле объемом 10 пл, изолированной маслом.

Хотя явно прослеживается тенденция уменьшения рабочего объема камер амплификации, но все еще разрабатываются и используются варианты проведения ПЦР на чипе в больших объемах (более 3 мкл). Например, группа Ли разработала микрочиповые устройства для ПЦР с реакционными объемами от 10 мкл [203, 204]. Для работы с образцами с низким содержанием молекул-мишеней (например, при диагностике) вариант проведения ПЦР в больших объемах имеет явные преимущества перед вариантом с малыми объемами, так как в этом случае потери образца в ходе анализа незначительны. Выполнение же ПЦР в малых объемах не только уменьшает стоимость анализа, но и сокращает его длительность.

Одной из проблем, возникающей при реализации ПЦР в микрочиповом формате, является контаминация образца — попадание из внешней среды в реакционную смесь специфических и неспецифических молекул ДНК, способных давать ложноположительные или ложноотрицательные результаты. Существует радикальное решение для исключения контаминации при повторных проведениях амплификации на одном и том же микрочипе — работа с однократно используемыми чипами, изготовленными, как правило, из полимерных материалов. Применительно к чипам многократного использования разработаны подходы, позволяющие избежать контаминации. Например, после проведения амплификации рекомендуется микрочипы промывать органическими растворителями, концентрированными растворами неорганических кислот или растворами сильных детергентов. Для предотвращения кросс-контаминации на микрочипах для ПЦР со стационарными камерами используют технологии, позволяющие формировать поверхности микрочипа с различными свойствами, например сделать внутреннюю поверхность реакционной камеры гидрофильной, а внешнюю — гидрофобной [175]. Такой подход облегчает загрузку и изолированное удерживание реакционного раствора в индивидуальных камерах. Другим способом предохранения образца является запечатывание камеры после загрузки образца специальной пленкой (например, используется полиолефиновая пленка фирмы «Sarstedt»).

Многообещающими являются методы «цифровой» микрофлюидики (digital microfluidics), в которых осуществляется формирование пузырьков в ПЦР-смеси и их транспортировка через термические зоны [204, 205].

Интегрированные микрочиповые системы

Естественной тенденцией развития микрочиповых систем является совмещение различных модулей и устройств на микрочипе [206]. Такая интеграция имеет свои преимущества и недостатки. Она позволяет изолировать образец от внешней среды, устраняя тем самым ошибки, обусловленные загрязнением, человеческим фактором и т.п.; уменьшить время анализа; обеспечить полный контроль и автоматизацию всех стадий и операций.

В общем случае анализ биологической пробы включает несколько стадий. Это разделение и сортировка клеток, лизис, экстракция и очистка нуклеиновых кислот, их амплификация и детектирование полученного продукта. Для осуществления этих стадий требуются интегрированные системы или, по крайней мере, наличие нескольких функциональных модулей на микрочипе. Методы разделения и манипуляций с живыми клетками достаточно разнообразны и успешно развиваются в настоящее время [20, 26, 34, 59]. Особое внимание

исследователей уделяется выделению и очистке генетического материала, так как от этой стадии зависит успех анализа [207].

При создании интегрированных систем зачастую ограничиваются встраиванием отдельных элементов и устройств пробоподготовки в микрочип. Как правило, количество анализируемой пробы очень мало, и требуется каким-либо способом увеличить концентрацию. Одним из таких способов может служить реакция амплификации ДНК [208]. Во многих микрочипах встроенными элементами являются реакционные камеры с нагревательно-охладительными устройствами для амплификации (см., например, [209]). Полимерная цепная реакция требует относительно чистых мишеней ДНК, в то время как реальный образец может содержать различные примеси. Поэтому в микроканалы чипа встраивают фильтры и элементы для извлечения и концентрирования ДНК [210—212]. Вариант полностью интегрированной микрочиповой системы предложен в работе [213]. В этой системе осуществляется загрузка образца, его смешивание с реагентами, амплификация ДНК, электрофоретическое разделение продуктов реакции и детектирование. Частично автоматизированной системой является конструкция микрофлюидного чипа [214], включающего реактор (камеру для проведения ПЦР), сепарационный канал, систему клапанов, микронасос и нагреватель. Детектирование результатов разделения на таком микрочипе осуществляется внешним компактным устройством.

Современный уровень технологий позволяет изготовить полностью автоматизированные системы в микрочиповом формате. Но полная интеграция — это задача, требующая комплексного решения ряда технических, технологических и методических проблем. Поэтому для создания интегрированной аналитической системы на микрочиповой платформе необходима убедительная мотивация, поскольку такая разработка требует значительных финансовых ресурсов и трудозатрат. К настоящему времени создано лишь несколько вариантов полностью интегрированных микроаналитических систем: для определения патогенов [215, 216], для проведения медицинской экспертизы и идентификации ДНК [217, 218], для космических исследований [219, 220]. Полная интеграция в большинстве случаев нецелесообразна, так как значительно увеличивает стоимость микрочипа. Поэтому в настоящее время распространение получили сравнительно недорогие микрофлюидные чипы со специализированными системами детектирования.

Коммерческие микрофлюидные устройства и приборы для исследования биологических проб

Прошло немало времени с момента публикации первых работ по микрофлюидным чипам и получены впечатляющие результаты, но внедрение микрофлюидных устройств все еще ограничено. Конечно, следует иметь в виду, что область микрофлюидики достаточно новая, а рынок неплохо оснащен альтернативными аналитическими средствами и приборами. В настоящее время некоторые компании проводят маркетинг и вкладывают средства в проекты создания систем lab-on-a-chip, предназначаемых для биомедицинских исследований, медицинской диагностики, космических исследований, военных технологий, экологического мониторинга и т.д.

Компания «Yole Développement» (http://www.yole.fr/), специализирующаяся на создании баз данных и прогнозе развития современных технологий (МЭМС, нанотехнологий, микрофлюидных технологий и т.д.), предлагает базу данных *Worldwide microfluidics database*. По этим данным исследованиями и разработками в области микрофлюидики занимаются 269 организаций в 31 стране, 118 университетских групп, 35 контрактных исследовательских организаций. Среди этих организаций «3M Asia Pacific Pte Ltd»; «Adhesives Research» (США); «Affymetrix, Inc.» (США); «Bio-Rad» (США); «Caliper Life Sciences» (США); «Corning Inc.» (США); «Dai Nippon Printing» (Япония); «Epigem» (Великобритания); «Fluidigm» (США); «GE Global Research» (США—Индия—Китай—Германия); «IBM Research Gmbh» (Швейцария); «ITRI — Industrial Technology Research Institute» (Тайвань); «Luminex» (США); «Micralyne» (Канада); «Microgen» (США); «MicroCHIPS» (США); «Pamgene» (Нидерланды); «Roche» (Швейцария); «Sharp Corporation» (Япония); «Tecan Group» (Швейцария); «Texas Instruments» (США) и др. Область интересов этих организаций чрезвычайно широка — от применения микрофлюидных устройств в микроэлектронной технике и оргтехнике (принтеры, плоттеры и т.п.) до передовых медицинских и космических исследований.

Более скромной является область патентования приборов и устройств для биологических и медицинских применений, изготавливаемых по микрофлюидным технологиям. Здесь главный акцент делается на развитии индивидуальных компонентов для подготовки пробы, увеличении эффективности амплификации нуклеиновых кислот, на создании систем разделения и детектирования на чипе, миниатюризации систем. В таблице, приведенной ниже, (частично использованы данные из [221] и [222]) дан примерный перечень компаний, обладающих основной долей интеллектуальной собственности в области микрофлюидных технологий.

Отметим еще ряд компаний, занимающихся разработкой микрофлюидных устройств для анализа биологических проб.

Бесспорным лидером и пионером по разработкам микрофлюидных технологий является фирма «Agilent Technologies», которая производит микрофлюидные чипы для анализа ДНК, РНК, белков и клеток. Консорциумам «Agilent Technologies Inc.» и «Caliper Technologies Inc» в 1999 году удалось создать коммерческую систему для автоматизированного анализа нуклеиновых кислот «Agilent 2100 Bioanalyzer» по микрочиповой технологии (Caliper LabChip$^{(R)}$ Technology). Компания «Bio-Rad» (http://www.bio-rad.com) совместно с «Caliper Technologies Inc.» создала компактную биоаналитиче-

Таблица

Компании, производящие коммерческие приборы для анализа биологических проб по микрофлюидным технологиям

Компания (Фирма)	Страна	Год основания	Коммерческий продукт	Адрес в Интернете
Aclara Biosciences	США	1995	eTags™ Assay System	www.aclara.com
AVIVA Biosciences Corporation	США	1999	SealChip	www.avivabio.com
Caliper Life Sciences	США	1995	LabChp®, LabChip® 90	www.caliperls.com
Cepheid	США	1996	GeneXpert, SmartCycler®	www.cepheid.com
Fluidigm Corporation	США	1999	BioMark ™ Dynamic Array, BioMark ™ Digital Array	www.fluidigm.com
Gyros	США	2000	Gyrolab Bioaffy CD	www.gyros.com
Handylab	США	1999	Integrated cartridges	www.handylab.com
Microfluidic Systems Inc.	США	2001	microfluidic cartridges and casettes	www.microfluidicsystems.com
Micronics	США	1996	PanNAT™, microFlow® System, Active™ Lab Cards, Access™ cards и др.	www.micronics.net
Nanogen	США	1991	NanoChip	www.nanogen.com
CFD Research Corporation	США	1991	microfluidic cartridge, microchip, software Pharos™	www.cfdrc.com
Microfluidic ChipShop	Германия	2002	Microfluidic chips, Microscopy-slide platform, Flow Chip-PCR — *Chip-Genie®*, Support Kits	www.microfluidic-chipshop.com
Fluigent	Франция	2006	FASTAB Technology, EMMA™ Technology, Microfluidic Control System, Polymer, Software	www.fluigent.com/
MicroLIQUID	Испания	2006	Microfluidic chips, Microfluidic chip holders, Prototyping microfluidic systems and connectors	www.microliquid.com
Micronit Microfluidics	Нидерланды	1999	Fluidic Connect, Microfluidic chips, Microfluidic tool kit for on-chip capillary electrophoresis	www.micronit.com
Microchip Biotechnologies, (в настоящее время) IntegenX Inc.	США	2003	Microbead Capture. Microscale on a chip valves (MOV™). Appolo System	www.microchipbiotech.com (http://integenx.com)

скую систему (Experion™ Automated Electrophoresis System) на основе электрофоретического метода разделения и микрофлюидного чипа, позволяющую осуществить анализ 10—12 проб за 40 мин. В январе 2002 года фирма «Caliper Technologies Inc.» представила на выставке LabAutomation 2002 (Palm Springs, Калифорния) систему для анализа фрагментов ДНК — «Caliper AMS-90 SE», рассчитанную на потребности лабораторий, занимающихся массовым анализом проб с фрагментами ДНК (оценки качества библиотек двойника).

Система AMS-90SE позволяет проводить автоматизированный анализ ДНК образцов на микрочипе методом электрофоретического разделения с детектором, основанном на лазер-индуцируемой флуоресценции; система снабжена внутренними калибровочными стандартами.

Фирма «Shimadzu Corp.» (www.shimadzu.com) выпустила в 2002 году систему MCE 2010 на основе микрофлюидного чипа из кварца для секвенирования ДНК. Система комплектуется двумя детекторами: со спектрофотометрическим УФ-детектором и детектором на основе лазер-индуцированной флуоресценции. С 2007 года эта фирма производит полностью автоматизированную систему MCE-202 «MultiNA» для электрофоретического анализа на микрофлюидном чипе.

Компания «Cepheid» — одна из первых начала коммерциализацию интегрированных систем для генетического анализа, используя технологию скоростного циклирования I-Core® с микрооптикой и электроникой. В настоящее время она производит два типа анализаторов: SmartCycler® и GeneXpert®, которые успешно применяются в исследовательских лабораториях, больницах и

других организациях для быстрого скрининга инфекционных болезней, диагностики рака, обнаружения патогенных организмов. Компания «Microchip Biotechnologies» (сейчас — «IntegenX Inc») специализируется на производстве микрофлюидных систем, включающих устройства пробоподготовки, автоматического секвенирования ДНК. Компания «Fluidigm» (http://www.fluidigm.com) внедряет технологию «integrated fluidic circuits — IFCs» для производства микроприборов на микрочиповой платформе с системой каналов и клапанов для контроля жидкости (NanoFlex^{TM} valve). Эти приборы предназначены для проведения полимеразной цепной реакции, для кристаллизации белка, для анализа экспрессии генов и др.

Фирма «Micronics» освоила массовый выпуск микрофлюидных устройств для лабораторных исследований, в том числе для медицинской диагностики. Фирма «Micronit Microfluidics» занимается изготовлением и поставками микрофлюидных чипов для исследователей во всем мире. Отметим компанию «ThinXXS Microtechnology» (http://www.thinxxs.com/), специализирующуюся на разработке и производстве микрофлюидных устройств из пластмасс (полиметилметакрилата, поликарбоната, полипропилена и др.) для фармацевтической, медицинской и химической промышленности. Компания предлагает услуги по разработке и созданию микрофлюидных чипов методом прецизионного литья под давлением в соответствии с топологией (или дизайном) по запросу заказчика. Фирма «Microfluidic ChipShop GmbH» предлагает широкий ассортимент микрофлюидных чипов и различных вспомогательных устройств, например, микрочипы для проведения полимеразной цепной реакции в потоке и вспомогательные устройства, в том числе и термоциклеры.

Заключение

Микрофлюидные технологии получили существенное развитие — от достаточно простых устройств и приборов для электрофоретического разделения веществ до систем для одномолекулярного анализа, устройств для манипуляций с отдельными биологическими объектами (клетками, бактериями и вирусами) и интегрированных микроаналитических систем. В современных разработках микрофлюидных устройств на основе чипов прослеживаются следующие тенденции: миниатюризация; интеграция функциональных модулей на единой подложке; увеличение числа измерительных каналов или реакционных камер; применение наноразмерных систем; тотальная автоматизация и контроль всех стадий процесса на чипе.

В рамках краткого обзора невозможно полно рассмотреть конструкции, методы и области применения микрофлюидных систем для биологических и медицинских исследований. Незатронутыми оказались микрочиповые системы для исследований клеток, бактерий и вирусов.

Развитие микрофлюидных химических систем продолжается. Появилось новое направление, сочетающее микрофлюидную технологию и методы микроскопии высокого разрешения (атомно-силовая микроскопия, оптическая микроскопия ближнего поля, конфокальная сканирующая микроскопия). Микрофлюидные технологии дают возможность фиксировать объект измерений — клетку на выбранном участке микрочипа [223—225], обеспечить течение жидкостей вокруг клетки, а методы микроскопии высокого разрешения позволяют получить информацию о поведении и реакции клетки на изменение окружающей среды, о процессах взаимодействия с другими клетками и т.д. [226, 227].

ЛИТЕРАТУРА

1. Nanofluidics. Nanoscience and Nanotechnology. Eds. J.B. Edel, A.J. de Mello. Cambridge: Thomas Graham House, 2009, 198 p.
2. *Squires T., Quake S.* Revs Mod. Phys., 2005, № 77, p. 977—1007.
3. *Shoffner M.A., Cheng J., Hvichia G.E., Kricka L.J., Wilding P.* Nucl. Acids Res., 1996, v. 24, № 2, p. 375—379.
4. *Cheng J., Shoffner M.A., Hvichia G.E., Kricka L.J., Wilding P.* Ibid., 1996, v. 24, № 2, p. 380—385.
5. *Cheng J., Waters L.C., Fortina P., Hvichia G. e.a.* Anal. Biochem., 1998, v. 257, № 2, p. 101—116.
6. *Northrup M.A., Ching M.T., White R.M., Watson R.T.* 7 Int. Conf. on Solid State Sensors and Actuators «Transducers '93», 1993,Yokohama, Japan, p. 924—927.
7. *Woolley A.T., Hadley D., Landre P., deMello A.J. e.a.* Anal. Chem., 1996, v. 68, № 23, p. 4081—4086.
8. *Jacobson S.C., Hergenröder R., Koutny L.B., Ramsey J.M.* Ibid., 1994, v. 66, № 14, p. 2369—2373.
9. *Jacobson S.C., Hergenröder R., Koutny L.B., Ramsey J.M.* Ibid., 1994, v. 66, № 7, p. 1114—1118.
10. *Jacobson S.C., Hergenröder R., Koutny L.B., Warmack R.J., Ramsey J.M.* Ibid., 1994, v. 66, № 7, p. 1107—1113.
11. *Jacobson S.C., Koutny L.B., Hergenröder R., Moore A.W., Ramsey J.M.* Ibid., 1994, v. 66, № 20, p. 3472—3476.
12. *Reyes D., Iossifidis D., Auroux P., Manz A.* Ibid., 2002, v. 74, p. 2623—2636.
13. *Yager P., Edwards T., Fu E., Helton K., Nelson K., Tam M.R., Weigl B.H.* Nature, 2006, v. 442, p. 412—418.
14. *Зимина Т.М.* Нано- и микросистемная техника, 2007, № 8,с. 27.
15. *Зимина Т.М.* Биотехносфера, 2009, № 1, с. 11—17.
16. *Mark D., Haeberle S., Roth G., von Stetten F., Zengerle R.* Chem. Soc. Rev., 2010, v. 39, p. 1153—1182.
17. *de Jong J., Lammertink R. G. H., Wessling M.* Lab Chip, 2006, v. 6, № 9, p. 1125—1139.
18. *Lai S., Wang S., Luo J., Lee L. J., Yang S., Madou M.* J. Anal. Chem., 2003, № 76, p. 1832—2837.
19. *Lee L.J., Madou M.J., Koelling K.W., Daunert S. e.a.* Biomed. Microdevices, 2001, v. 3, № 4, p. 339—351.
20. *Tsutsui H., Ho C.-M.* Mech. Res. Comm., 2009, v. 36, p. 92—103.
21. *Vanapalli S.A., Duits M.H.G., Mugele F.* Biomicrofluidics, 2009, v. 3, № 012006, 15 p.
22. *Castillo J., Dimaki M., Svendsen W.E.* Integr. Biol., 2009, № 1, p. 30—42.
23. *Yi C., Li C.-W., Ji S., Yang M.* Anal. chim. acta, 2006, v. 560, № 1-2, p. 1—23.
24. *Oakey J., Applegate R.W., Arellano E., Carlo D.D. e.a.* Anal. Chem., 2010, v. 82, № 9, p. 3862—3867.
25. *Евстрапов А.А.* Научное приборостроение, 2005, т. 15, № 1, с. 8—21.
26. *Voldman J.* Annu. Rev. Biomed. Eng., 2006, № 8, p. 425—454.

27. *Braschler T., Demierre N., Nascimento E., Silva T., Oliva A. G., Renaud P.* Lab Chip, 2008, v. 8, № 2, p. 280—286.
28. *Vahey M.D., Voldman J.* Anal. Chem., 2008, v. 80, № 9, p. 3135—3143.
29. *Zhao B. S., Koob Y.-M., Chung D. S.* Anal. chim. acta, 2006, v. 556, № 1, p. 97—103.
30. *Godin J., Chen C-H., Cho S. H., Qiao W., Tsai F., Lo Y-H.* J. Biophotonics, 2008, v. 1, № 5, p. 355—376.
31. *Pamme N., Wilhelm C.* Lab Chip, 2006, v. 6, № 8, p. 974—980.
32. *Tarn M.D., Hirota N., Iles A., Pamme N.* Sci. Technol. Adv. Mater., 2009, v. 10, № 014611, 6 p.
33. *Shi J., Mao X., Ahmed D., Colletti A., Huang T.J.* Lab Chip, 2008, v. 8, p. 221—223.
34. *Manneberg O., Vanherberghen B., Önfelt B., Wiklund M.* Ibid., 2009, v. 9, p. 833—837.
35. *Persat A., Suss M.E., Santiago J.G.* Ibid., 2009, v. 9, p. 2437.
36. *Persat A., Suss M.E., Santiago J.G.* Ibid., 2009, v. 9, p. 2454.
37. *Bu M., Melvin T., Ensell G., Wilkinson J., Evans A.* Sens. and Actuators A, 2004, v. 115, № 2, p. 476—482.
38. *Li X., Abe T., Esashi M.* Ibid., 2001, v. 87, №3, p.139—145.
39. *Thienot E., Domingo F., Cambril E., Gosse C.* Microelectronic Eng., 2006, v. 83, № 4, p. 1155—1158.
40. *Akashi T., Yoshimura Y.* J. Micromech. Microeng., 2006, v. 16, p. 1051—1056.
41. *Altissimo M.* Biomicrofluidics, 2010, v. 4, № 026503, 6 p.
42. *Heng Qi , Xiansong Wang, Tao Chen e.a.* Microsystem Technol., 2009, v. 15, № 7, p. 1027—1030.
43. *Евстрапов А.А., Лукашенко Т.А., Горный С.Г., Юдин К.В.* Научное приборостроение, 2005, т. 15, № 2, с. 72—81.
44. *Евстрапов А.А., Поздняков А.О., Горный С.Г., Юдин К.В.* Письма в ЖТФ, 2005, т. 31, №13, с. 10—17.
45. *Duffy D.C., McDonald J.C., Schueller O.J.A., Whitesides G.M.* Rapid Anal. Chem., 1998, v. 70, № 23, p. 4974—4984.
46. *Dang F., Tabata S., Kurokawa M., Ewis A. A. e.a.* Anal. Chem., 2005, v. 77, № 7, p. 2140—2146.
47. *Abdelgawad M., Watson M.W.L., Young E.W.K., Mudrik J.M. e.a.* Lab Chip, 2008, v. 8, p. 1379—1385.
48. *Kim P., Kwon K.W., Park M.C., Lee S.H., Kim S.M., Suh K.Y.* Biochip Journ., 2008, v. 2, № 1, p. 1—11.
49. *Pemg B.-Y., Wu C.-W., Shen Y.-K., Lin Y.* Polym. for Advanced Technol., 2009, v. 21, № 7, p. 457—466.
50. *Qin D., Xia Y., Whitesides G.M.* Adv. Mater., 1996, v. 8, p. 917—919.
51. *Zhu X., Liu G., Xiong Y., Guo Y., Tian Y.* J. Phys.: Conf. Ser., 2006, v. 34, p. 875—879.
52. *Mijatovic D., Eijkel J. C. T., van den Berg A.* Lab Chip, 2005, v. 5, p. 492—500.
53. *Madou M.J.* Fundamentals of Microfabrication. 2nd Ed. Boca Raton: CRC Press, 2002, 723 p.
54. Lab-on-a-Chip Technology. V. 1: Fabrication and Microfluidics. Eds. K.E. Herold, A. Rasooly. Norwich: Caister Academic Press, 2009, 410 p.
55. *Santos H.J.D.L.* Principles and Applications of NanoMEMS Physics. Dordrecht: Springer, 2005, 254 p.
56. *Fiorini G.S., Chiu D.T.* Biotechniques, 2005, v. 38, № 3. p. 429—446.
57. *Becker H, Gärtner C.* Anal. Bioanal. Chem., 2008, v. 390, № 1, p. 89—111.
58. *Fiorini G.S., Chiu D.T.* BioTechniques, 2005, v. 38, p. 429—446.
59. *Abgrall P., Gue A-M.* J. Micromech. Microeng., 2007, v. 17, p. R15–R49.
60. *Piruska A., Gong M., Sweedler J.V., Bohn P.W.* Chem. Soc. Rev., 2010, v. 39, p. 1060—1072.
61. *Tegenfeldt J.O., Prinz C., Cao H., Huang R.L. e.a.* Anal. Bioanal. Chem., 2004, v. 378, p. 1678—1692.
62. *Kaji N., Okamoto Y., Tokeshi M., Baba Y.* Chem. Soc. Rev., 2010, v. 39, p. 948—956.
63. *Levy S.L., Craighead H.G.* Chem. Soc. Rev., 2010, v. 39, p. 1133—1152.
64. *Hoang H.T., Segers-Nolten I.M., Berenschot J.W. e.a.* J. Micromech. Microeng., 2009, v. 19, № 065017, 10 p.
65. *Herbstman J.F., Hunt A.J.* Proc. SPIE, 2010, v. 7585, № 75850X, 8 p.
66. *White Y.V., Parrish M., Li X., Davis L.M., Hofmeister W.* Ibid., 2008, v. 7039, № 70390J, 10 p.
67. *Fu Y.Q., Colli A., Fasoli A., Luo J.K., Flewitt A.J. e.a.* J. Vac. Sci. and Technol., 2009, v. 27, № 3, p. 1520—1526.
68. *Abdolvand R., Ayazi F.* Sens. and Actuators A, 2008, v. 144, p. 109—116.
69. *Ali M.Y., Hung W., Yongqi F.* Int. J. Precision Eng. and Manufact., 2010, v. 11, №1, p. 157—170.
70. *Евстрапов А.А., Мухин И.С, Кухтевич И.В., Букатин А.С.* Науч.-техн. вестн. СПб ГУ ИТМО, 2010, т. 68, № 4, с. 59—63.
71. *Song S., Lee K.Y.* Macromolecular Res., 2006, v. 14, № 2, p. 121—128.
72. *Becker H, Gärtner C.* Anal. Bioanal. Chem., 2008, v. 390, № 1, p. 89—111.
73. *Friend J., Yeo L.* Biomicrofluidics, 2010, v. 4, № 026502, 5 p.
74. *Wu H., Huang B., Zare R.N.* Lab Chip, 2005, v. 5, p. 1393.
75. *Chen Y., Zhang L., Chen G.* Electrophoresis, 2008, v. 29, № 9, p. 1801—1814.
76. *Евстрапов А.А., Лукашенко Т.А., Горный С.Г., Юдин К.В.* Научное приборостроение, 2005, т. 15, № 2, с. 72—81.
77. *Lin Che-Hsin, Chao Chien-Hsiang, Lan Che-Wei.* Sens. and Actuators B: Chemical, 2007, v. 121, № 2, p. 698 –705.
78. *Li J.M., Liu C., Qiao H.C., Zhu L.Y., Chen G., Dai X.D.* J. Micromech. Microeng., 2008, v. 18, № 015008, 10 p.
79. *Abgrall P., Conedera V., Camon H., Gue A.M., Nguyen N.T.* Electrophoresis, 2007, v. 28, № 24, p. 4539—4551.
80. *Chen L., Luo G., Liu K., Ma J. e.a.* Sens. and Actuators, B: Chemical, 2006, v. 119, № 1, p. 335—344.
81. *Zhuang G., Jin Q., Liu J., Cong H. e.a.* Biomed. Microdevices, 2006, v. 8, № 3, p. 255—261.
82. *Kutchoukov V.G., Laugere F., Van Der Vlist W. e.a.* Sens. and Actuators, A: Physical, 2004, v. 114, № 2-3, p. 521—527.
83. *Wei J., Nai S.M.L., Wong C.K., Lee L.C.* Thin Solid Films, 2004, v. 462-463, p. 487—491.
84. *Lee D.-J., Lee Y.-H., Jang J., Ju B.-K.* Sens. and Actuators, A: Physical, 2001, v. 89, № 1-2, p. 43—48.
85. *Niklaus F., Stemme G., Lu J.-Q., Gutmann R.J.* Appl. Phys., 2006, v. 99, № 031101, 27 p.
86. *Schlautmann S, Besselink G.A.J., Prabhu G R, Schasfoort R.B.M.* J. Micromech. Microeng., 2003, v. 13, S81—S84.
87. *Zhuang G., Jin Q., Liu J., Cong H., Liu K. e.a.* Biomed. Microdevices, 2006, v. 8, № 3, p. 255—261.
88. *Chen L., Luo G., Liu K., Ma J., Yao B. e.a.* Sens. and Actuators, B: Chemical, 2006, v. 119, № 1, p. 335—344.
89. *Lu C., Lee L.J, Juang Y.J.* Electrophoresis, 2008, v. 29, № 7, p. 1407—1414.
90. *Евстрапов А.А., Лукашенко Т.А., Тупик А.Н.* Научное приборостроение, 2010, т. 20, № 1, с. 29—38.
91. *Chabinyc M.L., Chiu D.T., McDonald J.C., Stroock A.D. e.a.* Anal. Chem., 2001, v. 73, № 18, p. 4491—498.
92. *Lee H.G., Kumar K.S., Soh J.-R., Cha Y.-S., Kang S.H.* Anal. chim. acta, 2008, v. 619, № 1, p. 94—100.
93. *Kulmala S., Suomi J.* Ibid., 2003, v. 500, № 1-2, p. 21—69.

94. *Woolley A.T., Lao K., Glazer A.N., Mathies R.A.* Anal. Chem., 1998, v. 70, № 4, p. 684—688.
95. *Galloway M., Stryjewski W., Henry A., Ford S.M. e.a.* Ibid., 2002, v. 74, № 10, p. 2407—2417.
96. *Pumera M., Merkoci A., Alegret S.* Electrophoresis, 2006, v. 27, № 24, p. 5068—5072.
97. *Vázquez M., Frankenfeld C., Coltro W.K.T., Carrilho E. e.a.* Analyst, 2010, v. 135, № 1, p. 96—103.
98. *Cheek B.J., Steel A.B., Torres M.P., Yu Y.Y., Yang H.* Anal. Chem., 2001, v. 73, № 24, p. 5777—5783.
99. *Lazar I.M., Grym J., Foret F.* Mass Spectrom. Rev., 2006, v. 25, № 4, p. 573—94.
100. *Limbach P.A., Meng Z.* Analyst, 2002, v. 127, № 6, p. 693—700.
101. *Walker P.A., Morris M.D., Burns M.A., Johnson B.N.* Anal. Chem., 1998, v. 70, № 18, p. 3766—3769.
102. *Swinney K., Markov D., Bornhop D.J.* Ibid., 2000, v. 72, № 13, p. 2690—2695.
103. *Viskari P.J., Landers J.P.* Electrophoresis, 2006, v. 27, № 9, p. 1797—1810.
104. *Johnson M.E., Landers J.P.* Ibid., 2004, v. 25, № 21-22, p. 3513—27.
105. *Uchiyama K., Nakajima H., Hobo T.* Anal. Bioanal. Chem., 2004, v. 379, № 3, p. 375—382.
106. *Tanret I., Mangelings D., Heyden Y.V.* Curr. Pharmaceutical Analysis, 2009, v. 5, № 2, p. 101—111.
107. *Schulze P., Belder D.* Anal. Bioanal. Chem., 2009, v. 393, № 2, p. 1618—2642.
108. *Проскурнин М.А., Пирогов А.В., Сляднев М.Н. и др.* Ж. аналит. химии, 2004, т. 59, № 9, с. 923—928.
109. *Smirnova A., Proskurnin M.A., Bendrysheva S.N. e.a.* Electrophoresis, 2008, v. 29, № 13, p. 2741—2753.
110. *Ihara M., Yoshikawa A., Wu Y., Takahashi H. e.a.* Lab Chip, 2010, v. 10, № 1, p. 92—100.
111. *Verpoorte E.* Electrophoresis, 2002, v. 23, № 5, p. 677—712.
112. *Landers, J.P.* Anal. Chem., 2003, v. 75, № 12, p. 2919—2927.
113. *Carey L., Mitnik L.* Electrophoresis, 2002, v. 23, № 10, p. 1386—1397.
114. *Wua D., Qin J., Lin B.* J. Chromatogr. A, 2008, v. 1184, № 1-2, p. 542—559.
115. *Guo B.C.* Anal. Chem., 1999, v. 71, № 12, p. 333—337.
116. *Fritzsche S., Hoffmann P., Belder D.* Lab Chip, 2010, v. 10, p. 1227—123.
117. *Pinto D.M., Ning Y., Figeys D.* Electrophoresis, 2000, v. 21, № 1, p. 181—90.
118. *Koster S, Verpoorte E.* Lab Chip, 2007, v. 7, № 11, p. 1394—412.
119. *Kolchinsky A., Mirzabekov A.* Hum. Mutat., 2002, v. 19, № 4, p. 343—360.
120. *Figeys D., Pinto D.* Anal. Chem., 2000, v. 72, № 9, p. 330A.
121. *Reyes D.R., Iossifidis D., Auroux P.A., Manz A.* Anal. Chem., 2002, v. 74, № 12, p. 2623—2637.
122. *Reyes D.R., Iossifidis D., Auroux P.A, Manz A.* Ibid., 2002, v.74, № 12, p. 2637—2652.
123. *Paegel B.M., Blazej R.G., Mathies R.A.* Curr. Opin. Biotechnol., 2003, v. 14, № 1, p. 42—50.
124. *Manz A., Graber N., Widmer H.M.* Sens. and Actuators B: Chemical, 1990, v. 1, p. 244—248.
125. *Harrison D.J., Flury K., Seiler K., Fan Z., Effenhauser C.S., Manz A.* Science, 1993, v. 261, № 5123, p. 895—897.
126. *Harrison D.J., Manz A., Fan Z., Luedi H., Widmer H.M.* Anal. Chem., 1992, v. 64, № 17, p. 1926—1932.
127. *Woolley A.T., Mathes R.A.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994, v. 91, p. 11348—11352.
128. *Effenhauser C.S., Paulus A., Manz A., Widmer H.M.* Anal. Chem., 1994, v. 66, № 18, p. 2949—2953.
129. *McCormick R.M., Nelson R.J., Alonso-Amigo M.G. e.a.* Anal. Chem., 1997, v. 69, № 14, p. 2626—2630.
130. *Osafune T., Nagata H., Baba Y.* Anal. Sci., 2004, v. 20, № 6, p. 971.
131. *Wua D., Qin J., Lin B.* J. Chromatogr. A, 2008, v. 1184, № 1—2, p. 542—559.
132. *Barbier V., Viovy J.L.* Curr. Opin. Biotechnol., 2003, v. 14, № 1, p. 51—57.
133. *Cretich M., Chiari M., Rech I., Cova S.* Electrophoresis, 2003, v. 24, № 21, p. 3793—3799.
134. *Xu F., Jabasini M., Liu S., Baba Y.* Analyst, 2003, v. 128, № 6, p. 589—592.
135. *Евстрапов А.А., Рудницкая Г.Е., Петухова Н.А.* Научное приборостроение, 2005, т. 15, № 2, с. 27—40.
136. *Евстрапов А.А., Буляница А.Л., Курочкин В.Е. и др.* Ж. аналит. химии, 2004, т. 59, № 6, с. 587—594.
137. *Tian H., Brody L.C., Mao D., Landers J.P.* Anal. Chem., 2000, v. 72, № 21, p. 5483—5492.
138. *Munro N.J., Huhmer A.F.R., Landers J.P.* Ibid., 2001, v. 75, № 8, p. 1784—1794.
139. *Ugaz V.M., Brahmasandra S.N., Burke D.T., Burns M.A.* Electrophoresis, 2002, v. 23, № 10, p. 1450—1459.
140. *Ugaz V.M., Lin R., Srivastava N., Burke D.T., Burns M.A.* Ibid., 2003, v. 24, № 1-2, p. 151—157.
141. *Liu S.R., Shi Y.N., Ja W.W., Mathies R.A.* Anal. Chem., 1999, v. 71, № 3, p. 566—573.
142. *Liu S., Ren H., Gao Q., Roach D.J., Loder R.T. e.a.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, v. 97, № 10, p. 5369—5374.
143. *Paegel B.M., Emrich C.A., Wedemayer G.J., Scherer J.R., Mathies R.A.* Ibid., 2002, v. 99, № 2, p. 574—579.
144. *Sedgwick H., Caron F., Monaghan P.B., Kolch W., Cooper J.M.* J. R. Soc. Interface, 2008, v. 5, № 2, S123—S130.
145. *Effenhauser C.S., Bruin G.J.M., Paulus A.* Electrophoresis, 1997, v. 18, № 12-13, p. 2203—2213.
146. *Colyer C.L., Mangru S.D., Harrison D.J.* J. Chromatogr. A, 1997, v. 781, № 1-2, p. 271—276.
147. *Liu J., Lee M.L.* Electrophoresis, 2006, v. 27, № 18, p. 3533.
148. *Han J., Singh A.K.* J. Chromatogr. A, 2004, v. 1049, № 1-2, p. 205—209.
149. *Herr A.E., Molho J.I., Drouvalakis K.A., Mikkelsen J.C. e.a.* Anal. Chem., 2003, v. 75, № 5, p. 1180—1187.
150. *Tan W., Fan Z.H., Qiu C.X., Ricco A.J., Gibbons I.* Electrophoresis, 2003, v. 23, № 20, p. 3638—3645.
151. *Xu Y., Zhang C.X., Janasek D., Manz A.* Lab Chip, 2003, v. 3, p. 224—227.
152. *Sommer G.J., Singh A.K., Hatch A.V.* Anal. Chem., 2008, v. 80, № 9, p. 3327—3333.
153. *Reichmuth D.S., Shepodd T.J., Kirby B.J.* Ibid., 2005, v. 77, № 9, p. 2997—3000.
154. *Hou C., Herr A.E.* Electrophoresis, 2008, v. 29, № 16, p. 3306.
155. *Throckmorton D.J., Shepodd T.J., Singh A.K.* Anal. Chem., 2002, v. 74, № 4, p. 784—789.
156. *Hatch A.V., Herr A.E., Throckmorton D.J., Brennan J.S. e.a.* Ibid., 2006, v. 78, № 14 , p. 4976—4984.
157. *Wang Y.C., Choi M.H., Han J.* Ibid., 2004, v.76, № 15, p. 4426—4431.
158. *Emrich C.A., Medintz I.L., Chu W.K., Mathies R.A.* Ibid., 2007, v. 79, № 19, p. 7360—7366.
159. *Zhang H., Zhao Q., Li X.-F., Le X.C.* Analyst, 2007, v. 132, p. 724—737.
160. *Bedair M., Oleschuk R.D.* Ibid., 2006, v. 131, p. 1316—1321.
161. *Chovan T., Guttman A.* Trends Biotechnol., 2002, v. 20, p. 116.

162. *Kameoka J., Craighead H.G., Zhang H., Henion J.* Anal. Chem., 2001, v. 73, № 9, p. 1935—1941.
163. *Wang J.* Electrophoresis, 2002, v. 23, № 5, p. 713—718.
164. *Ristenpart W.D., Wan J., Stone H.A.* Anal. Chem., 2008, v. 80, № 9, p. 3270—3276.
165. *Lee C.-C., Snyder T.M., Quake S.R.* Nucl. Acids Res., 2010, v. 38, № 8, p. 2514—2521.
166. *Nie Z., Nijhuis C. A., Gong J., Chen X. e.a.* Lab Chip, 2010, v. 10, p. 477—483.
167. *Martinez A.W., Phillips S.T., Wiley B.J., Gupta M., Whitesides G.M.* Lab Chip, 2008, v. 8, p. 2146—2150.
168. *Kaltenboeck B., Wang C.* Adv. Clin. Chem., 2002, v. 40, p. 219—259.
169. Real-Time PCR in Microbiology: From Diagnosis to Characterization. Ed. I.M. Mackay. Caister Academic Press, 2007, 454 p.
170. *Kaltenboeck B., Wang C.* Adv. Clin. Chem., 2005, v. 40, p. 220.
171. *Zhang C., Xing D.* Nucl. Acids Res., 2007, v. 35, № 13, p. 4223—4237.
172. *Soon-Eng Ong, Sam Zhang, Hejun Du, Yongqing Fu.* Frontiers in Bioscience, 2008, v. 13, p. 2757—2773.
173. *Erill I., Campoy S., Rus J., Fonseca L., Ivorra A. e.a.* J. Micromech. Microeng., 2004, v. 14, p. 1558—1568.
174. *Gulliksen A., Solli L., Karlsen F., Rogne H., Hovig E. e.a.* Anal. Chem., 2004, v. 76, № 1, p. 9—14.
175. *Matsubara Y., Kerman K., Kobayashi M., Yamanura S. e.a.* Biosens. Bioelectron., 2005, v. 20, № 8, p. 1482—1490.
176. *Nagai H., Murakami Y., Morita Y., Yokoyama K., Tamiya E.* Anal. Chem., 2001, v. 73, № 5, p. 1043—1047.
177. *Zou Q., Miao Y., Chen Y., Sridhar U., Chong C.S. e.a.* Sens. and Actuators A: Phys., 2002, v. 102, № 1-2, p. 114—121.
178. *Dahl A., Sultan M., Jung A., Schwartz R., Lange M. e.a.* Biomed. Microdevices, 2007, v. 9, № 3, p. 307—314.
179. *Morrison T., Hurley J., Garcia J., Yoder K., Katz A. e.a.* Nucl. Acids Res., 2006, v. 34, № 18, p. e1—e9.
180. *Сляднев М.Н., Казаков В.А., Лаврова М.В., Ганеев А.А. и др.* Научное приборостроение, 2005, т. 15, № 2, с. 41—50.
181. *Наволоцкий Д.В., Крисько А.В., Арнаутов В.А. и др.* Там же, 2010, т. 20, № 1, с. 10—20.
182. *Neuzil P., Pipper J., Hsieh T.M.* Mol. Biosyst., 2006, v. 2, p. 292.
183. *Neuzil,P., Zhang C.Y., Pipper J., Oh S., Zhuo L.* Nucl. Acids Res., 2006, v. 34, № 11, e77, 9 p.
184. *Nakano H., Matsuda K., Yohda M., Nagamune T. e.a.* Biosci. Biotechnol. Biochem., 1994, v. 58, № 2, p. 349—352.
185. *Kopp M.U., de Mello A.J., Manz A.* Science, 1998, v. 280, № 5356, p. 1046—1048.
186. *Schneegass I., Brautigam R., Kohler J.M.* Lab Chip, 2001, v. 1, № 1, p. 42—49.
187. *Hashimoto M., Chen P.C., Mitchell M.W., Nikitopoulos D.E. e.a.* Lab Chip, 2004, v. 4, № 6, p. 638—645.
188. *Nakayama T., Kurosawa Y., Furui S., Kerman K. e.a.* Anal. Bioanal. Chem., 2006, v. 386, № 5, p. 1327—1333.
189. *Liu H-B., Gong H.-Q., Ramalingam N., Jiang Y. e.a.* J. Micromech. Microeng., 2007, v. 17, № 10, p. 2055—2064.
190. *Gong H., Ramalingam N., Chen L., Che J., Wang Q. e.a.* Biomed. Microdevices, 2006, v. 8, № 2, p. 167—176.
191. *Wang W., Li Z.X., Luo R., Lu S.H., Xu A.D., Yang Y.J.* J. Micromech. Microeng., 2005, v. 15, p. 1369–1377.
192. *Zou Z.Q., Chen X., Jin Q.H., Yang M.S., Zhao J.L.* Ibid., 2005, v. 15, p. 1476—1481.
193. *Oh K.W., Park C., Namkoong K., Kim J., Ock K.S. e.a.* Lab Chip, 2005, v. 5, № 8, p. 845—850.
194. *Cho Y.K., Kim J., Lee Y., Kim Y.A., Namkoong K. e.a.* Biosens. Bioelectron, 2006, v. 21, № 11, p. 2161—2169.
195. *Prakash R., Kaler K.V.I.S.* Microfluid. Nanofluid, 2007, v. 3, № 2, p. 177—187.
196. *Legendre L.A., Bienvenue J.M., Roper M.G., Ferrance J.P., Landers J.P.* Anal. Chem., 2006, v. 78, № 5, p. 1444—1451.
197. *Liu C.N., Toriello N.M., Mathies R.A.* Ibid., 2006, v. 78, № 15, p. 5474—5479.
198. *Lee J.G., Cheong K.H., Huh N., Kim S., Choi J.W., Ko C.* Lab Chip, 2006, v. 6, № 7, p. 886—895.
199. *Marcus J.S., Anderson W.F., Quake S.R.* Anal. Chem., 2006, v. 78, № 3, p. 956—958.
200. *Guttenberg Z., Muller H., Habermuller H., Geisbauer A. e.a.* Lab Chip, 2005, v. 5, № 3, p. 308—317.
201. *Easley C.J., Karlinsey J.M., Landers J.P.* Ibid., 2006, v. 6, № 5, p. 601—610.
202. *Beer N.R., Hindson B.J., Wheeler E.K., Hall S.B. e.a.* Anal. Chem., 2007, v. 79, № 22, p. 8471—8475.
203. *Huang F.C., Liao C.S., Lee G.B.* Electrophoresis, 2006, v. 27, № 16, p. 3297—3305.
204. *Chang Y.H., Lee G.B., Huang F.C., Chen Y.Y., Lin J.L.* Biomed. Microdevices, 2006, v. 8, № 3, p. 215—225.
205. *Beer N. R., Wheeler E. K., Lee-Houghton L., Watkins N. e.a.* Anal. Chem., 2008, v. 80, № 6, p. 1854—1858.
206. *Erickson D., Li D.* Anal. chim. acta, 2004, v. 507, p. 11—26.
207. *Brown R. B., Audet J.* J. R. Soc. Interface, 2008, v. 5, № 2, p. S131—S138.
208. *Zhang, Y.H., Ozdemir P.* Anal. chim. acta, 2009, v. 638, № 2, p. 115.
209. *Wu J., Cao W., Wen W., Chang D.C., Sheng P.* Biomicrofluidics, 2009, v. 3, № 012005, 7 p.
210. *Wolfe K.A., Breadmore M.C., Ferrance J.P., Power M.E. e.a.* Electrophoresis, 2002, v. 23, № 5, p. 727—733.
211. *Breadmore M.C., Wolfe K.A., Arcibal I.G., Leung W.K. e.a.* Anal. Chem., 2003, v. 75, № 8, p. 1880—1886.
212. *Paegel B.M., Yeung S.H., Mathies R.A.* Anal. Chem., 2002, v. 74, № 19, p. 5092—5098.
213. *Burns M., Johnson B., Brahmasandra S., Handique K. e.a.* Science, 1998, v. 282, № 5388, p. 484—487.
214. *Kaigala G.V., Hoang V.N., Stickel A., Lauzon J., Manage D. e.a.* Analyst, 2008, v. 133, № 3, p. 331—338.
215. *Lui C., Cady N. C., Batt C.A.* Sensors, 2009, v. 9, №5, p. 3713.
216. *Liu P., Mathies R.A.* Trends in Biotechnology, 2009, v. 27, № 10, p. 572—581.
217. *Yang W., Woolley A.T.* J. Assoc. for Lab. Automation, 2010, v. 15, № 3, p. 198—209.
218. *Horsman K.M., Bienvenue J.M., Blasier K.R., Landers J.P.* J. Forensic Sci., 2007, v. 52, № 4, p. 784—799.
219. *Stockton A.M., Chiesl T.N., Scherer J.R., Mathies R.A.* Anal. Chem., 2009, v. 81, № 2, p. 790—796.
220. *Benhabib M., Chiesl T.N., Stockton A.M., Scherer J.R., Mathies R.A.* Ibid., 2010, v. 82, № 6, p. 2574—2579.
221. *Malic L., Herrmann M., Hoa X. D., Tabrizian M.* Recent Patents on Eng., 2007, v. 1, № 1, p. 71—88.
222. Microfluidics for Biological Applications. Eds. W.-C. Tian, E. Finehout. New York: Springer Science&Business Media, 2008, 416 p.
223. *Nilsson J., Evander M., Hammarstrom B., Laurell T.* Anal. chim. acta, 2009, v. 649, № 2, p. 141—157.
224. *Radisic M., Iyer R.K., Murthy S.K.* Int. J. Nanomedicine, 2006, v. 1, № 1, p. 3—14.
225. *Vanapalli S.A., Duits M.H.G., Mugele F.* Biomicrofluidics, 2009, v. 3, № 1, № 012006, 15 p.
226. *Ebner A., Madl J., Kienberger F., Chtcheglova L.A. e.a.* Curr. Nanoscience, 2007, v. 3, № 1, p. 49—56.
227. *Ryu W.H., Huang Z., Park J.S., Moseley J., Grossman A.R. e.a.* Lab Chip, 2008, v. 8, № 9, p. 1460—1467.