

Особенности формирования микроструктур с высоким аспектным соотношением при изготовлении полимерных микрофлюидных чипов для исследования единичных живых клеток *in vitro*

© А.С. Букатин,^{1,2,3} И.С. Мухин,^{1,4} Е.И. Малышев,¹ И.В. Кухтевич,^{2,3,4} А.А. Евстапов,^{1,3,4} М.В. Дубина¹

¹ Санкт-Петербургский национальный исследовательский Академический университет РАН,
194021 Санкт-Петербург, Россия

² Сибирский федеральный университет,
660041 Красноярск, Россия

³ Институт аналитического приборостроения РАН,
190103 Санкт-Петербург, Россия

⁴ Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики (Университет ИТМО),
197101 Санкт-Петербург, Россия
e-mail: antbuk.fiztek@gmail.com

(Поступило в Редакцию 29 декабря 2015 г.)

Технологии и методы прототипирования микрофлюидных устройств находят широкое применение при решении многих биологических задач и проверки работоспособности новых микроаналитических систем. Работа посвящена изучению особенностей формирования микроструктур в фоторезисте SU-8 и созданию реплик в полидиметилсилоксане методом „мягкой“ литографии. Показано, что величина аспектного соотношения получаемых микроструктур определяется их формой, размерами, силой адгезии резиста к кремниевой подложке и эффективностью циркуляции проявителя вокруг микроструктур. На примере репликации сложных микроструктур достигнуто значение аспектного соотношения ~ 25 . Обсуждаемая в работе технология использована при изготовлении микрофлюидных чипов с „механическими“ ловушками для фиксации и исследования единичных живых клеток *in vitro*.

1. Введение

Концепция микроаналитических систем (μ -TAS — micro Total Analysis System (микросистема полного анализа), предложенная профессором А. Манцем в 1990 г. [1], позволяет создавать портативные высокопроизводительные устройства, обладающие высокой селективностью и чувствительностью при проведении анализа. При этом стоимость анализа значительно уменьшается благодаря снижению объема требуемых реагентов и автоматизации всех его стадий. Основой таких систем является микрофлюидное устройство (чип), изготовленное с применением современных микро- и нанотехнологий.

В настоящее время одним из важных направлений проведения биологических исследований является поиск фундаментальных причин возникновения таких заболеваний, как онкологические и нейродегенеративные, а также функциональный скрининг перспективных лекарственных препаратов для создания эффективных методов их лечения. Использование устройств, построенных на микрофлюидной платформе, позволяет строго контролировать условия проведения эксперимента (температура, состав клеточной среды, уровень pH, концентрация активного вещества и т.д.) и использовать различные методы детектирования исследуемого объекта в режиме реального времени, например оптические и электрофизиологические [2]. За счет возможности манипуляций с отдельными клетками в микрофлюидных

устройствах становится доступным проведение исследований индивидуальных клеток, что особенно важно в случае возникновения гетерогенности в клеточной популяции за счет биологического шума [3,4]. Их применение также актуально для исследования пролиферации и дифференцировки стволовых клеток [5,6].

Для изготовления микрофлюидных чипов предложено большое количество биосовместимых материалов и различных технологий [7]. В частности, создание системы взаимосвязанных микро и наноструктур для удерживания биологических объектов в стеклянных микрофлюидных чипах возможно с помощью технологии травления сфокусированным ионным пучком [8,9]. Эта технология позволяет сформировать микроканалы шириной от 200 nm и аспектным соотношением 10–15. Однако сложность технологии, длительность процесса формирования наноструктур, высокая стоимость оборудования существенно ограничивают ее применение даже для решения исследовательских задач. Разработка доступных технологий для лабораторного изготовления экспериментальных образцов микрофлюидных чипов с микроструктурными элементами с высоким аспектным соотношением представляется актуальной задачей.

Эластомеры, такие как полидиметилсилоксан (ПДМС), являются популярными материалами для прототипирования и проверки концепции новых устройств. Технология изготовления микрофлюидных чипов из ПДМС — „мягкая“ литография (soft lithography) — заключается в отливке реплики по мастер-форме с

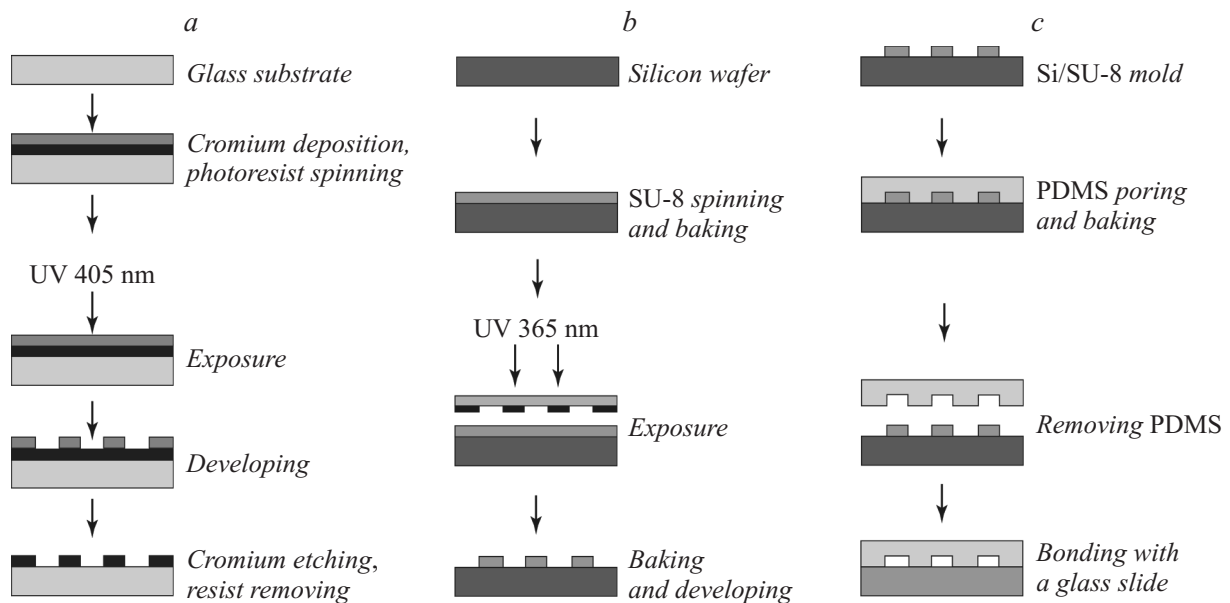


Рис. 1. Последовательность основных операций и этапы изготовления ПДМС микрофлюидных чипов методом „мягкой“ литографии: *a* — изготовление фотошаблона, *b* — изготовление мастер-формы, *c* — изготовление ПДМС микрофлюидных чипов.

последующим ее соединением со стеклянной защитной пластиной [10]. Мастер-форма обычно представляет собой кремниевую пластинку, на поверхности которой сформированы микроструктуры методом глубокого реактивного ионного травления или оптической фотолитографии в УФ чувствительных резистах. Наиболее распространенным резистом, применяющимся для изготовления мастер-форм, является негативный фоторезист SU-8 (MicroChem Inc., США) на основе эпоксидной смолы, в котором возможно формирование многослойных 3D-микроструктур высотой 1–300 μm и аспектным соотношением > 10 (отношение толщины резиста к минимальному латеральному размеру структуры) [11,12]. Для редких *L*-образных структур аспектное соотношение может достигать 26 [13].

Исследования отдельных клеток млекопитающих, характерный размер которых составляет 15–25 μm , требуют применения микротехнологий, обеспечивающих воспроизводимое формирование структур с размерами от нескольких микрометров и с высоким аспектным соотношением (более 5). Несмотря на широкую распространенность резиста SU-8 для создания мастер-форм для метода „мягкой“ литографии, в литературе недостаточно полно отражена информация об условиях, необходимых для получения микроструктур различной формы с высоким аспектным соотношением при помощи контактной фотолитографии на коммерчески доступном оборудовании. Поэтому целями настоящей работы являлись: 1) изучение зависимости аспектного соотношения получаемых в SU-8 микроструктур от их геометрических размеров, формы и условий формирования, 2) изготовление ПДМС микрофлюидных чипов для исследования единичных живых клеток *in vitro*.

2. Материалы и методы изготовления микроструктур в резисте SU-8 и ПДМС

Процесс изготовления микрофлюидных чипов из ПДМС с применением резиста SU-8 („мягкая литография“) состоит из 3 этапов: изготовление фотошаблона (рис. 1, *a*), изготовление мастер-формы из фоторезиста, нанесенного на кремниевую пластину (рис. 1, *b*), и изготовление микрофлюидных чипов (рис. 1, *c*).

Изготовление фотошаблона осуществлялось на установке лазерной литографии DWL 66FS (Heidelberg Instruments Mikrotechnik GmbH, Германия) с характерным разрешением $\sim 1 \mu\text{m}$. Заготовки для фотошаблонов представляли собой стеклянные пластинки толщиной 1 mm с нанесенным слоем хрома толщиной $\sim 100 \text{ nm}$ и слоем фоторезиста AZ 1505 (Microchemicals GmbH, Германия) толщиной $\sim 800 \text{ nm}$.

Для формирования микроструктур на поверхности кремниевой подложки использовались резисты SU-8 2025 и SU-8 2075 (MicroChem Corp., США), которые позволяют получить пленки толщиной 10–250 μm на центрифуге Delta 6 RC (SUSS MicroTec, Германия). После нанесения резиста осуществлялись его удаление с края образца механическим способом и отжиг при температуре 95°C в течение 7–60 min в зависимости от толщины слоя. Для повышения силы адгезии SU-8 к кремниевой подложке последняя предварительно обрабатывалась в 50%-ном растворе плавиковой кислоты (HF) в течение 40 s.

Экспонирование нанесенной на кремниевую подложку пленки резиста SU-8 осуществлялось методом контактной фотолитографии в режиме „мягкого контакта“

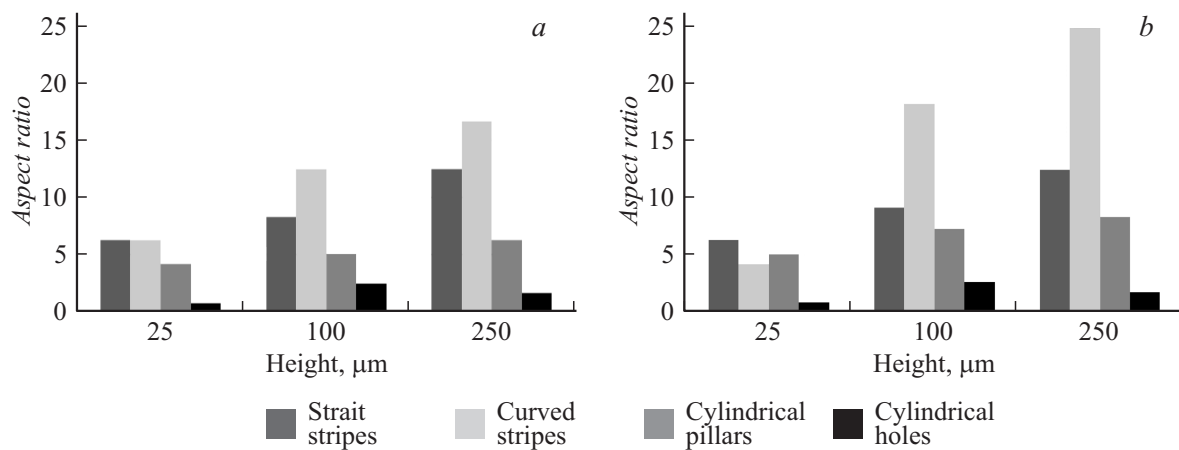


Рис. 2. Зависимость аспектного соотношения для разных типов микроструктур от толщины слоя SU–8: *a* — без дополнительной обработки поверхности кремния, *b* — с обработкой поверхности кремния в плавиковой кислоте.

на установке MJB4 (SUSS MicroTec, Германия) при воздействии *i*-линии излучения ртутной лампы (365 nm). Для получения вертикальных стенок микроструктур, обеспечивающих высокие аспектные соотношения, применялся оптический фильтр 360-PL (Omega Optical, США), поглощающий УФ-излучение с длинами волн меньше 350 nm. Время экспонирования определялось экспериментально и соответствовало минимальной дозе излучения, необходимой для формирования микроструктур. При оптимальных условиях экспонирования и проявления размеры получаемых микроструктур максимально близко соответствуют размерам элементов на фотшаблоне, а угол наклона стенок близок к 90° [14].

После экспонирования осуществлялся отжиг подложки при температуре 95°C в течение 7–20 min в зависимости от толщины слоя. Проявление резиста проводилось в проявителе SU–8 Developer (MicroChem, США) в течение 1–20 min с последующей промывкой подложки в изопропиловом спирте. Придание механической прочности пленке фоторезиста SU–8, увеличение ее адгезии к подложке и удаление микротрещин на ее поверхности осуществлялись путем термического отжига при температуре 170°C в течение 5 min.

Для отливки ПДМС-реплик микрофлюидных чипов по изготовленным мастер-формам использовался набор Sylgard 184 (Dow Corning, США), состоящий из основы и отвердителя, смешиваемых в пропорции 10 : 1. После дегазации и заливки смеси в форму производилось ее отверждение при температуре 65°C в течение 4 h. По окончании процесса отверждения ПДМС-реплики микрофлюидных чипов отделялись от формы и в них проделывались отверстия с помощью пробойника. После этого осуществлялась обработка поверхности реплики и защитной стеклянной пластины в кислородной плазме на установке V15-G (PINK GmbH Thermosysteme) и последующее их соединение.

Исследования геометрических характеристик тестовых микроструктур и микрофлюидных чипов проводились на оптической инспекционной станции INM 100

(Leica Microsystems, Германия) и сканирующем электронном микроскопе (СЭМ) Supra 25 (Carl Zeiss, Германия). Высота микроструктур определялась с помощью профилометра XP-1 (Ambios Technology Inc., США). Для визуализации созданных непроводящих полимерных микроструктур в СЭМ поверхность образцов покрывалась слоем хрома толщиной ~ 20 nm. Отмечалось, что на поверхности ПДМС после напыления пленки хрома могут образовываться микротрещины, что связано с тем фактом, что ПДМС является эластичным, легко деформируемым материалом.

3. Результаты и обсуждения

Для исследования возможности изготовления микроструктур с высоким аспектным соотношением в фоторезисте SU–8 на кремнии были изготовлены специальные наборы тестовых структур разных размеров и формы. В их состав входили прямые и изогнутые полоски длиной 200 μm и шириной 2–50 μm, столбики и углубления цилиндрической формы диаметром 2–200 μm. При этом толщина слоя SU–8, а следовательно и высота микроструктур, варьировалась от 25 до 250 μm. Каждая микроструктура на образце была представлена в виде массива, содержащего более 10 одинаковых элементов для получения статистически достоверных данных. Часть кремниевых пластин до нанесения резиста была обработана в 50%-ном растворе плавиковой кислоты (HF) для удаления слоя SiO₂ с поверхности кремния, что приводит к увеличению силы адгезии резиста к подложке. Результаты сравнительных экспериментальных исследований представлены на рис. 2. Примеры изображений микроструктур приведены на рис. 3.

Анализ результатов экспериментальных исследований показал, что аспектное соотношение микроструктур в резисте SU–8 существенно зависит от их формы и определяется двумя факторами: силой адгезии микроструктур к подложке и условиями циркуляции проявителя

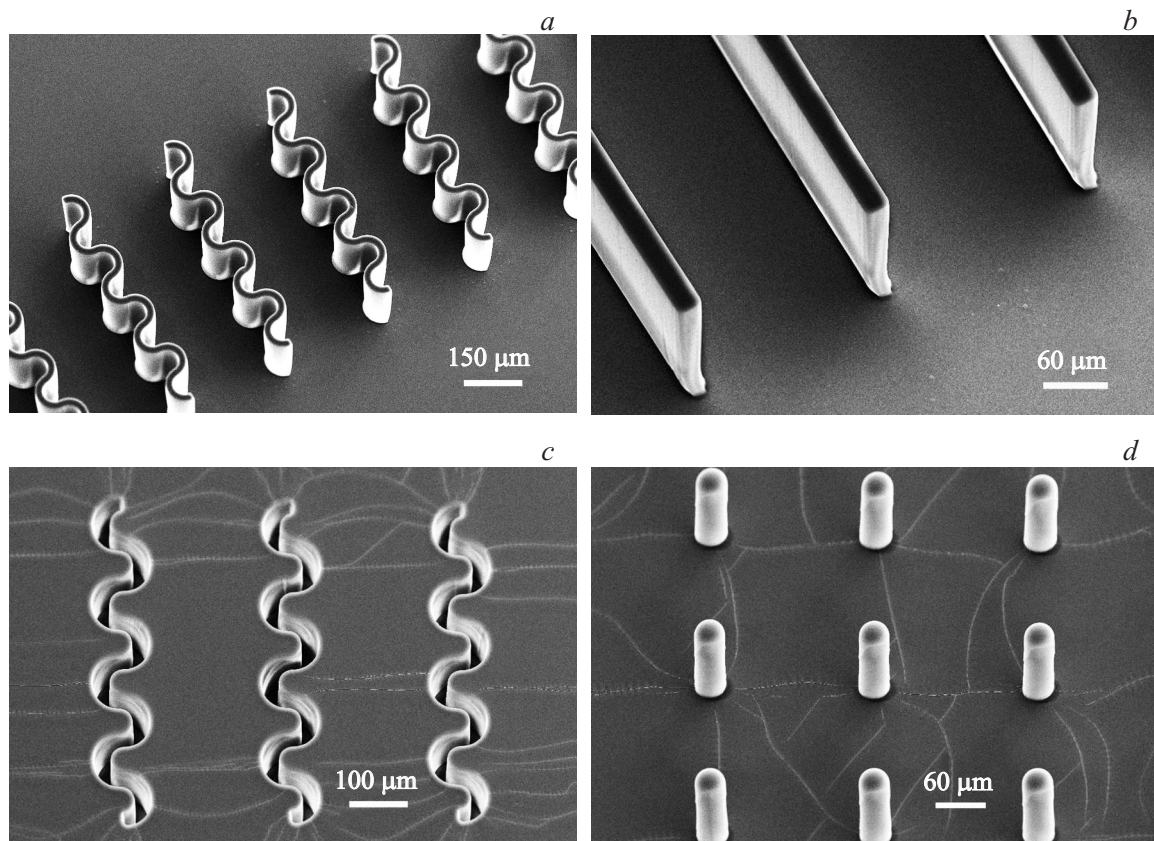


Рис. 3. Примеры изображений тестовых микроструктур в SU–8 и их отпечатков в ПДМС: *a, b* — полоски из SU–8 шириной $25\ \mu\text{m}$ и высотой $250\ \mu\text{m}$; *c* — углубления в ПДМС шириной $25\ \mu\text{m}$ и глубиной $100\ \mu\text{m}$; *d* — ПДМС столбики диаметром $40\ \mu\text{m}$ и высотой $100\ \mu\text{m}$. Все изображения получены с помощью СЭМ Supra 25 (Carl Zeiss, Германия).

вблизи микроструктуры для эффективного растворения необлученного фоторезиста во время процесса проявления. Сила адгезии в свою очередь определяется удельной адгезией SU–8 к кремнию и площадью поверхности контакта микроструктуры с подложкой. Так, площадь контакта изогнутых полосок на единицу длины вдоль оси полоски на 43% больше, чем прямых полосок. Из-за этого аспектное соотношение изогнутых полосок толщиной от $100\ \mu\text{m}$ в 1.3–2 раза выше. Предварительная обработка поверхности кремния в растворе плавиковой кислоты увеличивает удельную адгезию и тем самым позволяет сформировать микроструктуры с аспектным соотношением 12–25 (для полосок). Если сравнивать аспектное соотношение изогнутых полосок обработанной и необработанной поверхностей кремния высотой $250\ \mu\text{m}$, то для обработанной поверхности оно оказалось в 1.3 раза выше. При формировании полосок высотой $25\ \mu\text{m}$ обработка поверхности, а также увеличение удельной площади контакта не приводят к существенному увеличению аспектного соотношения микроструктур.

Аспектное соотношение получаемых в SU–8 углублений не превышает 2.5 и не зависит от его адгезии к подложке. Это объясняется тем, что для эффективного растворения фоторезиста требуется обеспечить циркуля-

цию проявителя вблизи микроструктуры. Стандартный протокол к резисту допускает возможность использования ультразвука для ускорения процесса проявления таких углублений, однако в этом случае может происходить отрыв микроструктур от поверхности подложки.

Измерение геометрических размеров массива из 10 прямоугольных полосок из SU–8 показало, что от образца к образцу уменьшение ширины полосок по сравнению с шириной соответствующего „окна“ на фотошаблоне может достигать до 14% (для полосок шириной $20\ \mu\text{m}$). Для одного образца отклонения в ширине полосок не превышают $0.2\ \mu\text{m}$ (менее 1% для полосок шириной $20\ \mu\text{m}$). В связи с тем, что не обнаружено явной взаимосвязи отклонения геометрических размеров полосок от их аспектного соотношения, было предположено, что отклонение размеров микроструктур в SU–8 связано с однородностью толщины пленки и качеством контакта фотошаблона к ней при контактной фотолитографии.

Для демонстрации возможностей технологии формирования ПДМС микрофлюидных чипов с микроструктурами, имеющими высокое аспектное соотношение, по мастер-формам были изготовлены чипы с „механическими“ ловушками (рис. 4, *a, b*). Фиксация клеток в таких ловушках осуществляется за счет их прижатия к стенкам микроструктур ламинарным потоком жидкости.

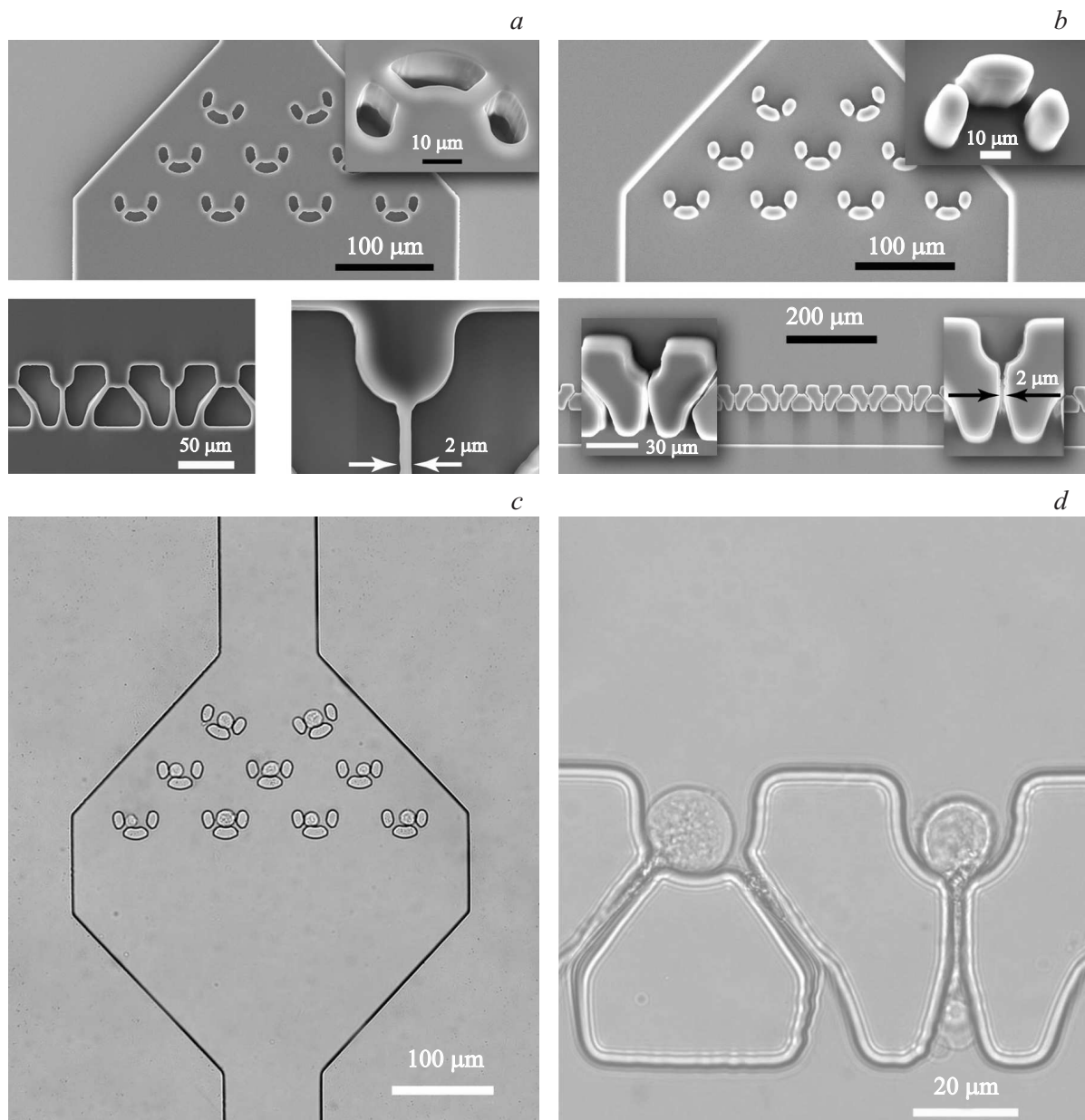


Рис. 4. Изображения микрофлюидных чипов с механическими ловушками для фиксации клеток K562: *a* — Si/SU-8 мастер-форма, *b* — ПДМС микрофлюидные чипы, *c, d* — клетки K562, зафиксированные в механических ловушках. Изображения *a, b* получены с помощью СЭМ Supra 25 (Carl Zeiss, Германия), изображения *c, d* получены с помощью оптического микроскопа AxioObserver Z1 (Carl Zeiss, Германия).

Эти ловушки, размещенные в камере микрофлюидного чипа, могут применяться для длительных исследований одиночных бактерий [15], дрожжей [16] и клеток млекопитающих, например клеток хронического миелоидного лейкоза человека K562 *in vitro* [17]. Характерный размер клеток K562 находится в диапазоне 15–25 μm , поэтому механические ловушки были сформированы высотой 25 μm , а ширина микроканалов в них составила от 2 до 5 μm . Основное предназначение этих каналов — регулирование силы прижатия клеток к стенкам ловушки и обеспечение обмена веществ между клеткой

и окружающей проточной средой. Фиксация клеток осуществлялась в культуральной среде RPMI, течение которой обеспечивалось шприцевым насосом Harvard Pump 11 Plus (Harvard Apparatus, США) (рис. 4, *c, d*).

Проведенные исследования показали возможность многократного (не менее 30 раз) использования мастер-формы для репликации микроструктур в ПДМС. Изготовление одного или нескольких микрофлюидных чипов по одной мастер-форме занимает ~ 5 h. Геометрические размеры микроструктур при этом от реплики к реплике изменяются не более чем на 3%. Таким образом, техно-

логия „мягкой литографии“ может использоваться для прототипирования микрофлюидных чипов из ПДМС, содержащих микроструктуры с высоким аспектным соотношением.

4. Заключение

Получение мастер-форм из кремния с нанесенным фоторезистом SU-8 для метода „мягкой“ литографии с высоким аспектным соотношением микроструктур (до 25) может быть достигнуто при условиях: а) обеспечения хорошей адгезии фоторезиста с подложкой и увеличения площади контакта микроструктур и подложки, б) обеспечения эффективной циркуляции проявителя вокруг микроструктур. Улучшение адгезии фоторезиста к кремниевой подложке может быть достигнуто при предварительной обработке кремния 50%-ным раствором плавиковой кислоты в течение 40 с, что приводит к увеличению аспектного соотношения микроструктур до 1.3 раза. При этом вариация размеров микроструктур с одинаковым дизайном в пределах одной мастер-формы не превышает 0.2 μm . В случае невозможности обеспечения эффективного удаления неотвержденного резиста проявителем аспектное соотношение микроструктур не превышает 2.5 и не зависит от величины силы адгезии.

Одним из вариантов применений микроструктур с высоким аспектным соотношением является их использование при создании микрофлюидных чипов для исследования единичных живых клеток *in vitro*. Демонстрация такой возможности была осуществлена путем изготовления и апробации двух типов микрофлюидных чипов с „механическими“ ловушками для фиксации клеток хронического миелоидного лейкоза человека K562.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект № 15-19-10041.

Список литературы

- [1] Manz A., Graber N., Widmer H.M. // Sensors and Actuators B: Chemical. 1990. Vol. 1. P. 244–248.
- [2] Neuzil P., Giselbrecht S., Lange K., Huang T.J., Manz A. // Nature Reviews Drug Discovery. 2012. Vol. 11. P. 620–632.
- [3] Lo S.-J., Yao D.-J. // Int. J. Mol. Sci. 2015. Vol. 16. P. 16 763–16 777.
- [4] Carlo D.D., Lee L.P. // Anal Chem. 2006. Vol. 78. N 23. P. 7918–7925.
- [5] Ertl P., Sticker D., Charwat V., Kasper C., Lepperdinger G. // Trends in Biotechnology, 2014. Vol. 32. N 5. P. 245–253.
- [6] Kobel S.A., Burri O., Griffa A., Girotra M., Seitzb A., Lutolf M.P. // Lab Chip. 2012. Vol. 12. P. 2843–2849.
- [7] Ren K., Zhou J., Wu H. // Accounts of Chemical Research. 2013. Vol. 46. N 11. P. 2396–2406.
- [8] Евстапов А.А., Мухин И.С., Кухтевич И.В., Букатин А.С. // Письма в ЖТФ. 2011. Т. 37. Вып. 20. С. 32–40.
- [9] Евстапов А.А., Мухин И.С., Букатин А.С., Кухтевич И.В. // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. 2012. Vol. 282. P. 145–148.
- [10] Kim P., Kwon K.W., Park M.C., Lee S.H., Kim S.M., Suh K.Y. // Biochip J. 2008. Vol. 2. N 1. P. 1–11.
- [11] Abgrall P., Conedera V., Camon H., Gue A.-M., Nguyen N.-T. // Electrophoresis. 2007. Vol. 28. P. 4539–4551.
- [12] Lee J.B., Choi K.-H., Yoo K. // Micromachines. 2015. Vol. 6. P. 1–18.
- [13] Chang H.-K., Kim Y.-K. // Sensors and Actuators. 2000. Vol. 84. P. 342–350.
- [14] Zhang J., Chan-Park M.B., Conner S.R. // LabChip. 2004. Vol. 4. P. 646–653.
- [15] Probst C., Grunberger A., Wiechert W., Kohlheyer D. // Micromachines 2013. Vol. 4. P. 357–369.
- [16] Crane M.M., Clark I.B.N., Bakker E., Smith S., Swain P.S. // PLOS ONE. 2014. Vol. 9. N 6. P. e100042.
- [17] Кухтевич И.В., Белоусов К.И., Букатин А.С., Дубина М.В., Евстапов А.А. // Письма в ЖТФ. 2015. Т. 41. Вып. 5. С. 103–110.