

Возможности лазерной технологии изготовления диагностических пептидных матриц максимальной плотности

О.И.Баум, Е.М.Щербаков, А.Нестеров-Мюллер, Э.Н.Соболь

Осуществлено моделирование процесса создания матрично-гелиевого биочипа путем лазерного наплавления на стеклянную подложку слоя полимерных микрочастиц, содержащих чувствительный пептидный элемент. Теоретически определены границы допустимых диапазонов и оптимальные значения лазерных параметров, при которых происходит наплавление полимерной оболочки без повреждения чувствительных элементов биочипа. Результаты экспериментов с лазерным нанесением слоя микрочастиц с размерами 3–4 мкм подтверждают сохранение функций биологических комплексов при оптимальных режимах облучения. Исследуются параметры лазерного воздействия, влияющие на возможное минимальное расстояние между зонами лазерной наплавки. Показана существенная роль теплопроводности и термомонопластичности полимера в увеличении размера наплавленной капли. При фокусировке лазерного излучения с длиной волны 532 нм в пятно диаметром 6 мкм (длительность лазерного импульса 10 мс) достигнута плотность наплавки 110000 точек на 1 см². По оценке максимально возможная плотность лазерной наплавки для исследованной системы составляет 250000 точек на 1 см².

Ключевые слова: лазер, биочип, диагностические пептидные матрицы, лазерная наплавка, теплопроводность, термомонопластичность.

1. Введение

Необходимость проведения большого числа анализов и однотипных исследований на небольшом объеме материала привела к созданию биочипов, позволяющих параллельно и одновременно проводить несколько тестов, а также объединять множество аналогичных тест-систем на одном носителе [1]. Биочип представляет собой подложку, на которую в определенных областях нанесены чувствительные элементы, способные вступать в реакции с веществами анализируемого образца.

На сегодняшний день существуют три основных типа биочипов: клеточные, белковые и ДНК-биочипы. Впервые связывание клеток с иммобилизованными антителами на биочипе произвел Т.Чанг [2]. В 2000 г. МакБитом и Шрайбером [3] был создан первый белковый биочип. Набор различных ДНК, объединенных в биочип, был создан в 1987 г. и применен для определения особенностей регуляции экспрессии генов интерферонами [4], а полный эукариотический геном был размещен на микрочипе уже в 1997 г. [5].

Существующие биочипы подразделяются на два класса [6]: матричные различных соединений, главным образом биополимеров, иммобилизованных на поверх-

ности подложки, и миниатюризованные микролаборатории. Существенный вклад в развитие микрочипов внесли А.Д.Мирзабеков [7–9] и R.Ekins [10–12], показавшие, что размеры аналитической системы в иммунологии могут быть уменьшены без потери чувствительности. Создание ДНК-биочипов оказалось более простой задачей, чем белковых биочипов, т. к. как молекулы ДНК не сильно отличаются друг от друга в биохимикофизическом плане и более стабильны. Белки же различаются по биохимическим свойствам, что создает проблему связывания одинакового количества разных белков на одной подложке, тем более что некоторым белкам необходима специфическая подложка [13]. Дополнительную сложность вызывает и то, что при иммобилизации структура белка может изменяться. Таким образом, основной проблемой при создании биочипов является компактность расположения чувствительных комплексов на подложке. Для ДНК-биочипов она достигает сейчас ~400000 точек на 1 см², тогда как для белковых биочипов в большинстве случаев плотность не превышает 1000 чувствительных комплексов на ту же площадь.

В настоящее время существуют две основные технологии создания биочипов: 1) для матричных биочипов на специально подобранную подложку по секторам распределяют необходимые белки, а прикрепление к подложке производится обычно путем нагрева (при этом антитело диффундирует из оболочки в подложку) или адсорбции; 2) для гелевых биочипов поверх подложки наносятся гелевые капли, и уже в них иммобилизуются антитела. Преимуществами второй технологии являются большая сохранность антител в геле и возможность внесения на порядок большего количества антител, а также использование больших специфичных биоструктур. Однако все это приводит к большему по сравнению с матричными биочипами размеру, более медленной кинетике и усложняет анализ.

О.И.Баум, Е.М.Щербаков, Э.Н.Соболь. Институт проблем лазерных и информационных технологий РАН, Россия, 142190 Москва, Троицк, Пионерская ул., 2; e-mail: baumolga@gmail.com, jenya_sh89@mail.ru, esobol@rambler.ru
A.Nesterov-Mueller. Karlsruhe Institute of Technology Institute of Microstructure Technology, Hermann-von-Helmholtz-Platz 1D- 76344 Eggenstein-Leopoldshafen, Germany; e-mail: alexander.nesterov-mueller@kit.edu

Поступила в редакцию 4 сентября 2015 г., после доработки – 18 ноября 2015 г.

У обеих технологий имеются одни и те же проблемы: большие размеры и избыточное количество антител, что существенно увеличивает стоимость биочипа. Решением проблемы может стать использование при создании биочипа точечной лазерной наплавки, на исследование которой и направлена настоящая работа. Актуальность проблемы обусловлена тем, что диагностика (особенно ранняя диагностика) заболеваний иммунной системы и типа новообразований биологических тканей при их регенерации [14] остаются одними из важнейших задач медицины. Для их решения могут эффективно использоваться пептидные матрицы, взаимодействующие с биологическими тканями. К сожалению, создание пептидных библиотек высоких плотностей остается пока нерешенной задачей.

За основу для нашей работы была взята обобщенная матрично-гелевая технология [15], при которой иммобилизация чувствительных элементов, заключенных в специальную полимерную оболочку, производится с помощью точечной лазерной наплавки.

Ранее в нашей работе [16] было рассмотрено воздействие лазерного излучения с длиной волны 810 нм на аналогичную систему и определены его плотности мощности, при которых оболочка расплавлялась, но чувствительный элемент не повреждался, что было исследовано и подтверждено экспериментально методами термометрии, люминесценции и КР-спектроскопии. Однако использованные в [16] характеристики лазерного излучения не позволили сфокусировать излучение в пятна диаметром менее 30 мкм и получить высокую плотность наплавления.

В настоящей работе использован лазер Ventus VIS (Laser Quantum LTD) на кристалле титанила фосфата калия с длиной волны излучения 532 нм, позволяющий получать лазерное пятно меньшего диаметра и большую поверхностную плотность наплавления. Исследована возможность создания биочипа путем лазерного нагрева слоя сферических полимерных микрочастиц с чувствительным элементом внутри до стадии плавления их полимерной оболочки и выявления параметров нагрева, при которых оболочка расплавится, но чувствительный элемент не будет поврежден. Теоретически рассмотрена ситуация воздействия при большем лазерном пятне (с диаметром, сравнимым с толщиной полимерной пленки), проведены эксперименты, доказывающие сохранение функций биологических комплексов при найденных параметрах облучения для длины волны 532 нм. Для увеличения плотности лазерной наплавки производился переход к воздействию при малом диаметре лазерного пятна, сравнимом с диаметрами полимерных микрочастиц, исследовались параметры, влияющие на возможное минимальное расстояние между точками лазерного воздействия, и роль пластичности в увеличении размера наплавленной капли; в итоге была определена максимально возможная плотность расположения элементов на подложке.

2. Материалы и методы

Объектом исследования являлась пористая трехкомпонентная среда на стеклянной подложке, состоящая из полимерных сфер радиусом 3–4 мкм из полистирола (88% от полного объема среды), в которых содержался чувствительный элемент – biotin-pentafluorophenyl-ester (10%) и наночастицы графита (2%) для увеличения показателя поглощения среды.

Облучение, приводящее к расплавлению полимера и образованию точечных капель на подложке, осуществлялось лазером Ventus VIS (Laser Quantum LTD) с длиной волны излучения 532 нм. Параметры воздействия были выбраны в пределах допустимого диапазона, границы которого были найдены с помощью теоретического моделирования. Лазерное плавление оболочки из полимера высвобождало чувствительные биоэлементы для последующей их импрегнации в поверхностный слой подложки с заданными пространственным распределением и плотностью за характерные времена нагрева, не приводящие к их разрушению.

Для исследования сохранности чувствительного элемента после лазерного воздействия на подложку наносился слой люминофора streptavidin alexa fluor 546 (Life Technologies Corporation), вступающий в химическую реакцию с чувствительным элементом в случае сохранения его биолого-химической активности. После этого с помощью сканера GenePix 4000B Microarray Scanner (Molecular Devices, LLC) наблюдалась люминесценция, наличие которой свидетельствует о сохранности активности чувствительных элементов.

3. Теоретическое описание процесса лазерного плавления трехкомпонентной среды без повреждения чувствительных элементов биочипа

С целью определения допустимых режимов лазерного воздействия рассмотрим возможные механизмы разрушения чувствительных элементов при лазерном плавлении полимерной матрицы на подложке.

3.1. Термическое разрушение, приводящее к плавлению чувствительного элемента

Для нахождения температурного распределения в системе пленка–подложка рассматривалась задача теплопроводности о распространении тепла через пористое трехкомпонентное полупространство, образующее тонкую пленку на стеклянной подложке. В первом приближении материал, облучаемый лазерным пучком, считался изотропным, а оптические и теплофизические коэффициенты полагались не зависящими от температуры. При этом концентрация графита, основного поглощающего агента системы, считалась однородной. В случае достаточно тонких (менее 7 мкм) напыленных пленок высокая теплопроводность графита обеспечивала их равномерный прогрев по толщине. Для диаметра лазерного пучка 15 мкм, значительно превышающего толщину пленки, можно рассматривать одномерную задачу теплопроводности о нагреве тонкой пленки на подложке; при этом предполагается, что поглощательная способность пленки является функцией ее толщины и вся энергия, поглощенная в пленке, равномерно выделяется по ее толщине. Такие допущения позволили в первом приближении воспользоваться аналитическим решением задачи теплопроводности в следующем виде [17]:

$$T(t) = \frac{q\sqrt{a_2 t}}{\lambda_2} \left[\frac{2}{\sqrt{\pi}} + \psi \left(\exp \frac{1}{\psi^2} \operatorname{erfc} \frac{1}{\psi} - 1 \right) \right], \quad (1)$$

где a_1, a_2 – температуропроводность; c_1, c_2 – теплоемкость; $\psi = c_1 h / (c_2 \sqrt{a_2 t})$ (индекс 1 относится к пленке, 2 – к подложке); q – плотность мощности; h – толщина слоя микрочастиц на подложке; λ_2 – коэффициент теплопроводности подложки. Полное количество тепла, протекающего через площадь S за время лазерного нагрева τ и выражающееся через плотность теплового потока q' , прогревает объем V , зависящий от глубины распространения тепла $\sqrt{a_2 \tau}$:

$$q'S\tau = c_2 \Delta T V = c_2 \text{grad} T (h + \sqrt{a_2 \tau}) S.$$

Если пленка из микрочастиц считается тонкой, т. е. $h \ll \sqrt{a_1 \tau}$, то максимальная температура на ее поверхности находится из выражения (1):

$$T_{\max} = \frac{2q\sqrt{a_2 \tau}}{\lambda_2 \sqrt{\pi}}. \tag{2}$$

Если чувствительный элемент разрушается при определенной температуре T^* , то формула (2) позволяет определить зависимость пороговой мощности лазерного излучения от времени воздействия.

3.2. Термомеханическое разрушение чувствительного элемента

Второй возможный механизм разрушения чувствительного элемента связан с возникновением термомеханических напряжений под действием неоднородного лазерного нагрева. В соответствии с теорией термоупругости [18] возникающие при лазерном воздействии градиенты температуры вызывают напряжения

$$\sigma_r = \frac{\alpha E T_{\max}}{1 - 2\nu} = \frac{\alpha E}{1 - 2\nu} \frac{2q\sqrt{a_2 \tau}}{\lambda_2 \sqrt{\pi}},$$

где α – коэффициент теплового расширения; E – модуль упругости; ν – коэффициент Пуассона. Предполагается, что разрушение чувствительного пептида происходит, если напряжения достигают предела прочности σ_r . Этот механизм осуществляется в области лазерных параметров, которая может пересекаться с областью термического разрушения, ограничивая искомый диапазон воздействия. Для плотности мощности, приводящей к разрушению пептида, получаем:

$$q_r = \frac{\sigma_r \lambda_2 (1 - 2\nu) \sqrt{\pi}}{2\alpha E \sqrt{a_2 \tau}}. \tag{3}$$

Расчеты, произведенные на основании теоретической модели, позволяющей рассчитать распределение температурного поля в системе пленка – подложка, позволили определить диапазон лазерных параметров, при которых лазерный нагрев слоя полимерных микрочастиц с чувствительным элементом внутри приводит к расплавлению полимерной оболочки и к сохранению функциональности чувствительного элемента.

Подставив в уравнение (1) температуры, соответствующие началу процесса плавления (70°C) и максимальной температуре, при которой сохраняется работоспособность [19] биологического комплекса из biotin-pentafluorophenyl-ester (90°C), при длительности облучения 10 мс мы получили диапазон плотностей мощности, в котором происходит плавление внешней полимерной оболочки

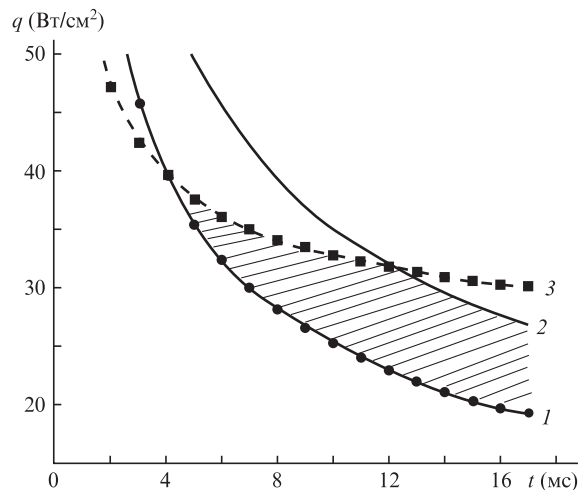


Рис.1. Границы зоны допустимых режимов лазерного воздействия при лазерной наплавке тонкой пленки из чувствительных элементов, покрытых полимерной оболочкой: начало процесса плавления полимерной оболочки при нагревании от температуры 20°C (1), начало термического разрушения чувствительного элемента (2) и плотность мощности, при которой происходит разрушение чувствительного элемента вследствие возникающих напряжений расширения – сжатия облучаемой системы (3). Зона допустимых режимов заштрихована.

микрочастиц без повреждения находящихся внутри них чувствительных элементов. Он составил $25\text{--}35 \text{ Вт/см}^2$.

Результаты расчетов границ области допустимых режимов лазерного воздействия по формулам (2) и (3) представлены на рис.1. Кривая 1 соответствует началу процесса плавления полимерной оболочки при ее нагревании от комнатной температуры (20°C). Видно, что началу плавления при выбранной для последующих экспериментов нижней границе плотности мощности 25 Вт/см^2 отвечает время нагрева 10 мс. Кривая 2 соответствует началу термического разрушения чувствительного элемента. При выбранной для экспериментов верхней границе плотности мощности 35 Вт/см^2 данный процесс начнется через 10 мс. Кривая 3 соответствует плотности мощности, при которой происходит разрушение чувствительного элемента, обусловленное возникновением напряжений расширения – сжатия облучаемой системы, и рассчитывается по формуле (3) ($\sigma_r = 40 \text{ МПа}$, $\lambda_2 = 1 \text{ Вт}\cdot(\text{м}\cdot\text{К})^{-1}$, $\nu = 0.35$, $\alpha = 70 \times 10^{-6} \text{ К}^{-1}$, $E = 1.2 \text{ ГПа}$, $a_2 = 3.4 \times 10^{-7} \text{ м}^2/\text{с}$ [20]). Для рассматриваемого случая на 10-й миллисекунде нагрева она составляет 32.5 Вт/см^2 , что ограничивает диапазон возможных плотностей мощности сверху. Таким образом, оптимальной для получения минимального радиуса наплавленной точки является область между кривыми 1, 2 и ниже кривой 3 на рис.1.

4. Экспериментальное исследование процессов лазерной наплавки чувствительных пептидов в полимерной оболочке на стеклянную подложку

4.1. Влияние лазерных параметров на размер наплавленной капли

Исследовалось влияние параметров лазерного излучения на размер области, подвергшейся воздействию. Средняя мощность излучения изменялась от 150 до 330 мВт, а

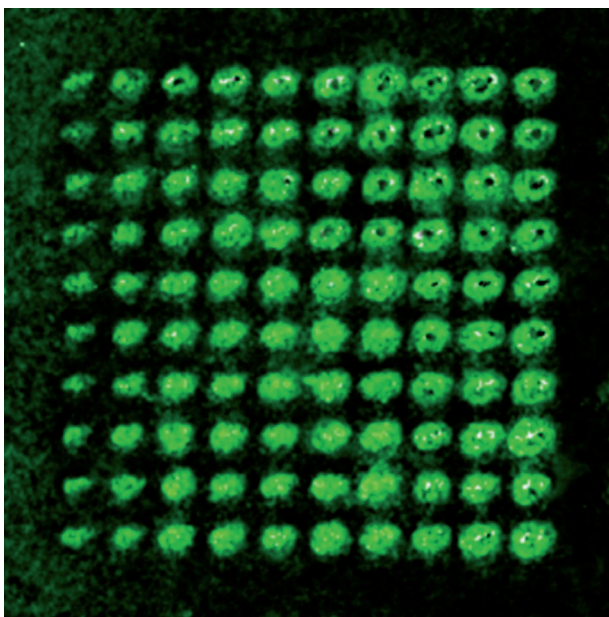


Рис.2. Капли расплавленного полимера с чувствительными элементами внутри, обработанные люминофором streptavidin alexa fluor 546. Мощность лазерного излучения изменялась от 150 до 330 мВт снизу вверх с шагом 20 мВт, длительность импульса – от 5 до 14 мс слева направо с шагом 1 мс.

длительность импульса – от 5 до 14 мс. Диаметр лазерного пятна на поверхности подложки с пленкой полимера составлял 15 мкм, расстояние между центрами лазерного воздействия было равно 100 мкм. Минимальный размер наплавленных капель полимера в этих экспериментах составил 30 мкм.

Для исследования сохранения функциональности чувствительного элемента после лазерного воздействия на подложку наносился слой люминофора, вступающий в химическую реакцию с чувствительным элементом в случае сохранения его биолого-химической активности. Наличие люминесценции свидетельствовало о сохранении активности чувствительных элементов (рис.2).

4.2. Наплавление в случае малого диаметра лазерного пятна

Было проведено наплавление полимера на подложку в режиме, близком к режиму с оптимальными параметрами: длина волны лазерного излучения 532 нм, мощность 40 мВт, время обработки 10 мс; облучение осуществлялось через оптоволокно диаметром 600 мкм при фокусировке в пятно диаметром 6 мкм. На рис.3 представлена оптическая фотография наплавленных капель со средним диаметром 13.5 ± 0.5 мкм при зернистости полимерной пленки 3–4 мкм.

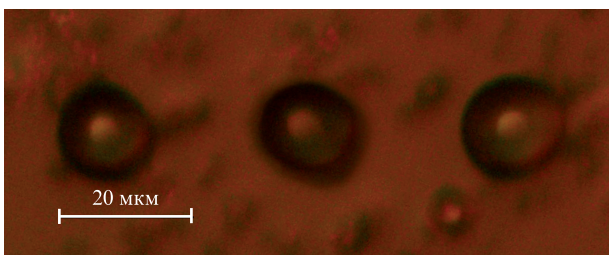


Рис.3. Оптическая фотография наплавленных капель полимера.

5. Оценка максимальной плотности наплавления

Плотность наплавления ограничивается минимальным размером L пятна лазерного воздействия, который складывается из диаметра лазерного пятна d и размеров зоны прогрева:

$$L = d + 2\sqrt{a_1\tau}.$$

Таким образом можно вычислить минимально допустимое расстояние между центрами лазерного воздействия, а его максимальная плотность может быть определена как

$$\frac{1}{L^2} = \frac{1}{(d + 2\sqrt{a_1\tau})^2}. \quad (4)$$

Для рассматриваемой системы (рис.2) рассчитанная по формуле (4) максимальная плотность наплавления при диаметре лазерного пучка 15 мкм равна 30000 точек на 1 см^2 . Уменьшение диаметра пятна в два раза не приводит к увеличению плотности чувствительных элементов чипа в четыре раза. На диаметр зоны лазерного воздействия и максимальную плотность наплавления существенное влияние может оказать также пластичность материала, возникающая при неоднородном лазерном нагреве вне зоны плавления.

6. Влияние термопластичности на максимальную плотность наплавления

Для определения области параметров, в которой наблюдается термопластичность, в теоретической модели термоупругости [18] осуществляется переход к приближению тонкой пленки, находящейся в температурном поле $T(r, q, \tau)$, и решается система дифференциальных уравнений равновесия без рассмотрения распределенной поверхностной нагрузки. Предполагается, что напряжения и перемещения, вызванные нагревом, не меняются в пределах тонкой пластины по ее толщине. Радиальное и угловое напряжения σ_r и σ_θ должны удовлетворять уравнению равновесия:

$$\frac{d\sigma_r}{dr} + \frac{\sigma_r - \sigma_\theta}{r} = 0. \quad (5)$$

Обозначим через ε_r полную радиальную деформацию, а через $\varepsilon_r - \alpha T(r, q, \tau)$ ее часть, возникшую в результате теплового напряжения. Тогда для радиальной и угловой компонент деформации в полярных координатах имеем

$$\varepsilon_r - \alpha T(r, q, \tau) = \frac{1}{E}(\sigma_r - \nu\sigma_\theta), \quad (6)$$

$$\varepsilon_\theta - \alpha T(r, q, \tau) = \frac{1}{E}(\sigma_\theta - \nu\sigma_r).$$

Разрешим соотношения (5) и (6) относительно радиальной и угловой компонент напряжений и получим

$$\sigma_r = \frac{E}{1 - \nu^2}[\varepsilon_r + \nu\varepsilon_\theta - (1 + \nu)\alpha T(r, q, \tau)], \quad (7)$$

$$\sigma_\theta = \frac{E}{1 - \nu^2}[\varepsilon_\theta + \nu\varepsilon_r - (1 + \nu)\alpha T(r, q, \tau)].$$

Подставив (7) в (5), получим

$$r \frac{d}{dr} (\varepsilon_r + \nu \varepsilon_\theta) + (1 - \nu) (\varepsilon_r - \varepsilon_\theta) = (1 + \nu) \alpha r \frac{d[T(r, q, \tau)]}{dr}. \quad (8)$$

Если через u обозначить радиальное перемещение, то радиальная и угловая компоненты деформации в полярных координатах будут иметь следующий вид:

$$\varepsilon_r = \frac{du}{dr}, \quad \varepsilon_\theta = \frac{u}{r}.$$

Подставляя эти выражения в (8) и учитывая, что

$$u = (1 + \nu) \alpha \frac{1}{r} \int_a^r T(r, q, \tau) r dr + C_1 r + \frac{C_2}{r},$$

получаем окончательные выражения для компонент напряжений:

$$\sigma_r = \alpha E \left[\frac{1}{b^2} \int_0^b T(r, q, \tau) r dr - \frac{1}{r^2} \int_0^r T(r, q, \tau) r dr \right], \quad (9)$$

$$\sigma_\theta = \alpha E \left[-T(r, q, \tau) + \frac{1}{b^2} \int_0^b T(r, q, \tau) r dr + \frac{1}{r^2} \int_0^r T(r, q, \tau) r dr \right],$$

где b – граница области интегрирования по радиусу r .

Область пластических деформаций определяется критерием Мизеса: $\sigma_\theta - \sigma_r = \sigma_s$, где σ_s – компонента напряжения, соответствующая приводящему к необратимым деформациям пределу текучести [21]. Область облучаемой лазером поверхности радиусом r не подвержена разрушению и расплыванию по площади в том случае, если мощность облучения и его длительность описываются неравенством

$$\alpha E \left[\frac{2}{r^2} \int_0^r T(q, \tau, r) r dr - T(q, \tau, r) \right] \leq \sigma_s. \quad (10)$$

В каждом слое, перпендикулярном направлению распространения лазерного пучка, температура может быть аппроксимирована распределением Гаусса с эффективным радиусом r_{eff} . В полимерном поверхностном слое максимум температуры может быть рассчитан из выражения (2); тогда (10) можно записать в виде

$$\alpha E \left[\frac{4}{r^2} \frac{q \sqrt{a_2 \tau}}{\lambda \sqrt{\pi}} \int_0^r \exp\left(-\frac{r^2}{r_{\text{eff}}^2}\right) r dr - \exp\left(-\frac{r^2}{r_{\text{eff}}^2}\right) \right] \leq \sigma_s. \quad (11)$$

Подставляя в (11) параметры, соответствующие данным рис.3 (мощность 40 мВт, время 10 мс, $\lambda = 0.1 \text{ Вт} \cdot \text{м} \cdot \text{К}^{-1}$, $a_2 = 3.4 \times 10^{-7} \text{ м}^2/\text{с}$), получаем для максимума выражения в левой части (11) значение 6.5 МПа, которое удовлетворительно согласуется с данными по пределу текучести биополимеров: $\sigma_s = 12 \text{ МПа}$ [14] и 7 МПа [22].

Расчеты показывают, что максимальные напряжения в этом случае расположены по кольцу радиусом 13 мкм. В этой области происходит подплавление полимера по кольцу, приводящее к его слиянию с центральной сферической каплей за счет сил поверхностного натяжения всей расплавленной области, что увеличивает радиус капли и уменьшает достижимую плотность лазерной наплавки. Увеличение мощности и времени воздействия приводит к увеличению области подплавления и к еще большему увеличению радиуса наплавленной капли. Таким образом, превышение предела пластических де-

формаций приводит к увеличению диаметра наплавленного элемента, уменьшая тем самым плотность лазерной наплавки. Результаты расчетов на основе выражения (11) показывают существенный вклад термопластичности в наблюдаемое экспериментально отклонение зависимости максимальной плотности лазерной наплавки от диаметра лазерного пятна от квадратичной.

7. Обсуждение

Теоретическое моделирование различных процессов повреждения чувствительных элементов чипа позволило определить область допустимых режимов (прежде всего интенсивности) лазерного воздействия. Для увеличения плотности наплавленных элементов целесообразно уменьшать диаметр лазерного пятна и длительность лазерного импульса до определенных пределов: при лазерных импульсах длительностью менее 4 мс термомеханическое повреждение происходит при меньших лазерных интенсивностях, чем требуются для плавления системы; при диаметрах лазерного пятна менее 6 мкм минимальный размер наплавленной области в значительной степени определяется процессами распространения тепла и термопластичностью материала.

Экспериментальное исследование влияния различных параметров лазерного облучения на размер наплавленной капли подтвердило теоретические результаты и выводы. Для наплавленных элементов в левой нижней части рис.2 мы имеем оптимальное воздействие, приводящее к плавлению внешней полимерной оболочки и к созданию расплавленных капель на подложке, образующихся после остывания полусферы с характерным радиусом, который зависит от временных и энергетических параметров лазерного облучения. В то же время в правой верхней части рис.2 происходит выход за область оптимального лазерного облучения, приводящий к разрушению центральной части и к исчезновению люминесцентной картины в центрах капель, что соответствует разрушению чувствительных элементов. Из верхнего левого угла рис.2 в правый нижний угол можно провести диагональ, разграничивающую две области – область разрушенных чувствительных элементов и область эффективно взаимодействующих с люминофором центральных частей.

Для увеличения плотности лазерной наплавки нами было исследовано воздействие лазерного излучения с малым (3 мкм) диаметром лазерного пятна, сравнимым с диаметрами полимерных микрочастиц (3–4 мкм). Однако рассмотрение теоретической модели, описывающей влияние термопластичности на максимальную плотность наплавления, показало нецелесообразность уменьшения диаметра пятна до менее 6 мкм, поскольку возникающие большие градиенты температуры и соответствующие пластические деформации (10) приводят к увеличению диаметра наплавленного элемента, уменьшая тем самым плотность лазерной наплавки.

Построенная теория позволила выбрать близкие к оптимальным параметры лазерного облучения (длина волны лазерного излучения 532 нм, мощность 40 мВт, время воздействия 10 мс, диаметр фокального пятна 6 мкм) и провести лазерное облучение для получения большой плотности лазерной наплавки. По плотности мощности это соответствует центральной части диапазона данных, представленных на рис.2 (диаметр пятна 15 мкм, мощность 250 мВт, длительность воздействия 10 мс).

В этом эксперименте в случае малого лазерного пятна диаметр наплавленных каплей составил 13–14 мкм при зернистости полимерной пленки 3–4 мкм. Флуктуация диаметра наплавленных каплей может быть связана с неравномерностью зернистости слоя полимерных микрочастиц. Достигнутая при этом плотность наплавления составляет 110000 точек на 1 см².

По сравнению с первой серией экспериментов (при диаметре лазерного пятна 15 мкм) уменьшение диаметра пятна в 2.5 раза (до 6 мкм) при длительности лазерного импульса 10 мс позволило уменьшить размеры зоны лазерной наплавки в 2.2 раза (до 13.5 мкм). Уменьшение расстояния между каплями ограничено не только диаметром зоны лазерной наплавки, но и расстоянием, на которое распространяется тепло, зависящим от длительности импульса и от коэффициента теплопроводности полимерной матрицы, содержащей наночастицы графита. Для рассматриваемой системы минимально возможное расстояние между наплавленными каплями составляет примерно 20 мкм, что позволяет обеспечить плотность наплавления до 250000 точек на 1 см².

8. Выводы

Теоретическая модель процесса лазерного плавления слоя полимерных микрочастиц с чувствительным элементом внутри позволяет оценить условия термического и термомеханического повреждений чувствительных элементов. Впервые теоретически определены границы допустимых диапазонов и оптимальные значения лазерных параметров, при которых происходит лазерное наплавление полимерной оболочки без повреждения чувствительных элементов биочипа. Показано, что уменьшение диаметра пятна и длительности лазерного импульса целесообразно до определенных пределов, которые определяются процессами теплопроводности и термопластичности полимерной матрицы, а также механизмом термомеханического разрушения чувствительного элемента. Экспериментальное исследование влияния мощности, диаметра лазерного пятна и длительности лазерного импульса на размер наплавленной капли подтвердило результаты и выводы построенной теории. При диаметре лазерного пятна 6 мкм и длительности импульса 10 мс получены наплавленные элементы диаметром 13.5 мкм при плотности наплавления 110000 точек на 1 см². Оце-

нены максимально возможные плотности лазерной наплавки, которые для данной системы составляют 250000 точек на 1 см².

Ряд этапов настоящей работы выполнен при поддержке РФФИ (гранты №12-02-91326-СИГ_а/HRGRG-316, 15-02-06078_а и 14-02-90005 Бел_а).

1. Angenedt P. *Drug Discovery Today*, **10**, 503 (2005).
2. Chang T.W. *J. Immunol. Meth.*, **65**, 217 (1983).
3. MacBeath G., Schreiber S. *Science*, **289** (5485), 1760 (2000).
4. Kulesh D.A., Clive D.R., Zarlenga D.S., Greene J.J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 8453 (1987).
5. Lashkari D.A., DeRisi J.L., McCusker J.H., Namath A.F., Gentile C., Hwang S.Y., Brown P.O., Davis R.W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 13057 (1997).
6. *Reviews: The Chipping Forecast. Nature Genetics*, **21** (1999).
7. Vasiliskov V., Tirnofeev E., Surzhikov S., Drobyshev A., Shick V., Mirzabekov A. *BioTechnique*, **27**, 592 (1999).
8. Bavykin S.G., Akowski J.P., Zakhariev V.M., Barsky V.E., Mirzabekov A.D. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 922 (1997).
9. Chechetkin V.R., Turygin A.Y., Proudnikov D.Y., Prokopenko D.V., Kirillov Eu.V., Mirzabekov A.D. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **18**, 83 (2000).
10. Elcins R.P. *Clin. Biochem. Revs.*, **8**, 1222 (1987).
11. Elcins R.P., Berger H., Chu F.W., Finckh P., Krause F. *Nanobiology*, **4**, 197 (1998).
12. Elcins R.P., Chu F.W. *Clin. Chem.*, **37**, 1955 (1991).
13. Schirwitz C. *Springer International Publishing Switzerland*, doi 10.1007/978-3-319-00807-3, ISBN: 978-3-319-00806-6 (Print), 978-3-319-00807-3 (Online) (2013).
14. Sobol E.N., Milner T.E., Shekhter A.B., Baum O.I., Guller A.E., Ignatieva N.Y., Omelchenko A.I., Zakharkina O.L. *Laser Phys. Lett.*, **4** (7), 488 (2007).
15. Stadler V., Felgenhauer T., Beyer M., Fernandez S., Leibe K., Guttler S., Gruning M., Kunig K., Torralba G., Hausmann M., Lindenstruth V., Nesterov A., Block I., Pipkorn R., Poustka A., Bischoff F.R., Breitling F. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **47**, 7132 (2008).
16. Баум О.И., Щербаков Е.М., Минаева С.А., Нестеров-Мюллер А., Меркле Ф., Соболь Э.Н. *Изв. РАН. Сер. физич.* (в печати).
17. Sobol E. *Phase Transformations and Ablation in Laser-Treated Solids* (New York: John Wiley & Sons Inc., 1995).
18. Тимошенко С.П., Гудьер Дж. *Теория упругости* (М.: Наука, 1975).
19. Beyer M., Nesterov A., Block I., Kunig K., Felgenhauer T., Fernandez S., Leibe K., Torralba G., Hausmann M., Trunk U., Lindenstruth V., Bischoff F.R., Stadler V., Breitling F. *Science*, **318**, 1888 (2007).
20. Григорьев И.С., Мейлихов Е.З. *Физические величины. Справочник* (М.: Энергоатомиздат, 1991).
21. Ишлинский А.Ю., Ивлев Д.Д. *Математическая теория пластичности* (М.: Физматлит, 2001).
22. Bowden P.V. *Phil. Mag.*, **29**, 149 (1974).