

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ УСТАНОВКА
ДЛЯ ЭЛЕКТРОКИНЕТИЧЕСКОГО УПРАВЛЕНИЯ
РАЗДЕЛЕНИЕМ И КОНЦЕНТРИРОВАНИЕМ КЛЕТОК
НА ПОВЕРХНОСТИ ПЛАНАРНОЙ КОНСТРУКЦИИ
МИКРОЧИПА ИЗ МИКРОКАПЛИ СУСПЕНЗИЙ**

¹В.А. Лобан, ¹А.И. Драпеза, ²Т.И. Ореховская, ¹А.И. Хмельницкий,
¹Д.А. Руденко, ³Г.А. Скороход, ³Е.И. Гудкова

¹Белорусский государственный университет,
г. Минск, Беларусь

²Белорусский государственный университет информатики и радиоэлектроники,
г. Минск, Беларусь

³Белорусский государственный медицинский университет,
г. Минск, Беларусь

Разработана экспериментальная установка на основе микроскопа МБИ-8М, включающая аппаратуру для управления электрокинетическим движением клеток и микрочастиц в жидких средах в пределах микроэлектродного чип-формата планарного типа; аппаратуру для получения видео и фотоматериалов при изучении их движения и программы обработки видеоданных для расчета параметров транспорта клеток (скорость, направление).

Ключевые слова: электрокинетический транспорт, клетки, микрочастицы, оптическая микроскопия, микроэлектродный чип-формат, экспериментальная установка

**LABORATORY MADE INSTRUMENT FOR ELECTROKINETIC
CONTROL SEPARATION AND CONCENTRATION
OF CELLS ON SURFACE OF PLANAR MICROCHIP STRUCTURES
OUT OF A SUSPENSIONS MICRODROP**

¹V.A. Loban, ¹A.I. Drapeza, ²T.I. Orekhovskaya, ¹A.I. Khmel'nitsky,
¹D.A. Rudenko, ³G.A. Skorokhod, ³E.I. Gudkova

¹Belarusian State University,
Minsk, Republic of Belarus

²Belarusian State University of Informatics and Radioelectronics,
Minsk, Republic of Belarus

³Belorussian State Medical University,
Minsk, Republic of Belarus

A laboratory made instrument based on the MBI-8M microscope was developed, which includes equipment for controlling the electrokinetic movement of cells and microparticles in liquid media within the microelectrode chip format of the planar type, equipment for obtaining video and photographic materials in the study of their movement and vision-processing software to calculate the parameters of the transport of cells (speed, direction).

Keywords: electrokinetic transport, cells, microparticles, optical microscopy, microelectrode chip-format, laboratory made instrument

E-mail: drapeza@bsu.by

В настоящее время в мире интенсивно развивается одно из перспективных направлений исследований и разработок в области создания аналитического приборостроения для различных областей биологии и медицины — микрофлюидные чип анализаторы (МФЧА).

МФЧА представляют собой универсальную основу для создания относительно недорогих и портативных аналитических приборов различного функционального назначения, которым присущи уникальные эксплуатационно-технические характеристики и потенциальные возможности широкого их применения [1–3]. Базовым элементом МФЧА, в зависимости от типа решаемых задач, является конструкция чипа с микроканалами, в которые встроены микроэлектроды.

Первые классические 3D-конструкции стеклянно-кремниевых МФЧА изготавливались с помощью технологий микроэлектроники на основе вакуумного напыления, фотолитографии и анизотропного травления в кремнии или стекле. Однако данные технологии изготовления МФЧА оказались достаточно дорогими, а экспериментальным образцам таких МФЧА присущ целый ряд недостатков, затрудняющих их широкое применение [4].

Выходом из данного положения послужило развитие эластомерных технологий, которые позволили заменить 3D-конструкции микрофлюидных чипов, получаемых с помощью дорогих технологий анизотропного травления материалов (кремний, стекло), эластомерными 3D-конструкциями, снизив при этом стоимость и ускорив изготовление МФЧА практически в условиях биотехнологических лабораторий [5]. Микроэлектронные технологии (вакуумное напыление, фотолитография) встраивания микроэлектродов в стеклянно-кремниевые 3D-конструкции микрофлюидного чипа, при использовании эластомерных технологий, переходят в разряд изготовления 2D-конструкций микроэлектродов на планарных подложках из стекла, кремния или ситалла, что оказывается намного проще и значительно дешевле. Сборку конечного варианта эластомерной 3D-конструкции с сетью микроканалов, например, реплики из полидиметилсилоксана (ПДМС), и подложки из стекла с микроэлектродами, производят простым соединением их поверхностей, которые предварительно активируют в кислородной плазме [5].

В работе [6] показано, что известные из литературных источников конструкции МФЧА для изучения клеток могут быть разделены только условно по трем основным признакам (1 — функциональному назначению, 2 — методам детектирования, 3 — решаемым задачам). Существует большое разнообразие конструкций МФЧА, в которых, например, совмещаются функции и/или различные методы детектирования в зависимости от типа решаемых задач.

В силу сложности объекта исследования, которыми являются живые клетки, для их разделения и концентрирования традиционно применяются электрокинетические методы, широкое применение среди которых нашли разные варианты диэлектрофореза (Dielectrophoresis, DEP) [7].

В основе диэлектрофореза лежит явление взаимодействия суспензии клеток с неоднородным электрическим полем, которое несложно получить, например, с помощью системы двух внутренних электродов различной формы. Перемещение клеток при диэлектрофорезе обусловлено наводимыми в клетках диполями и их взаимодействием с внешним электрическим полем. Эффект разделения клеток определяется диэлектрофоретической силой и основан на том, что различные типы клеток в зависимости от характеристик неоднородного переменного электрического поля (амплитуда, частота) проявляют разные диэлектрические свойства. Вектор диэлектрофоретической силы, определяющий движение клеток в направлении градиента электрического поля или против него, оценивается с помощью знака фактора Клаузиуса–Моссоти (КМ), в математическом выражении которого фигурируют значения проводимости и диэлектрической проницаемости клетки и окружающей ее среды с учетом частоты и напряженности переменного электрического поля. При положительном значении фактора КМ клетка притягивается в область более сильного электрического поля, при отрицательном значении ее притяжение происходит по противоположному направлению [8].

С помощью данных методов проводят разделение клеток в потоке, пошаговое разделение в потоке (Stepped Flow Separation); диэлектрофоретическое фракционирование в поле потока (DEP-Field Flow Fractional); диэлектрофоретическое разделение по типу «бегущей волны» (Traveling Wave Dielectrophoresis), когда на каждый микроэлектрод системы из четырех микроэлектродов, которые выполнены в виде эквидистантной спирали Архимеда, подаются электрические сигналы с последовательным сдвигом фазы на 90° , т.е. 1– 0° , 2– 90° , 3– 180° , 4– 270° [9]. Разновидность метода диэлектрофореза на основе изолирующих постов, которые размещают в микроэлектродной сенсорной области чипа, и постоянного электрического поля также успешно применяют для концентрирования и разделения клеток [7, 9].

В последние годы сделаны попытки создания платформы на основе микроэлектродного чип-формата планарного типа для обнаружения и дифференциации различных клеток в течение нескольких минут из микрокапли исследуемой суспензии. Конструкция используемого чип-формата основана на использовании трех планарных микроэлектродов, с помощью которых организуется электрокинетический транспорт клеток в суспензии. Управление электрокинетическим транспортом обеспечивается совмещением явлений электрофореза, электроосмоса и диэлектрофореза на переменном токе, и рядом других электрокинетических явлений с позиции быстроты разделения и концентрирования клеток [10].

Анализ литературы в области проведения такого рода исследований показывает, что для этих целей необходимо специализированное высокотехнологичное оборудование в качестве экспериментальной базы для моделирования и изучения условий и режимов электрокинетического разделения и концентрирования клеток, а также соответствующая программная обработка получаемых результатов с целью доказательства их репрезентативности при решении поставленных задач.

Поэтому целью настоящей работы является создание экспериментальной установки для электрокинетического управления разделением и концентрированием клеток на поверхности планарной конструкции микрочипа из микрокапли суспензий.

Результаты разработки и исследований

Обобщенная структурная схема разработанной экспериментальной установки показана на рис. 1. Она состоит из следующих основных узлов: 1 — система формирования биоструктур пленочного типа и измерения вольтамперных характеристик (ВАХ);

2 — функциональный генератор; 3 — цифровой двухканальный осциллограф DS1102E; 4 — микроскоп биологический исследовательский МБИ-8М, 5 — цифровая фотокамера DCM-510, 6 — микроэлектродный чип-формат планарного типа, 7 — персональный компьютер.

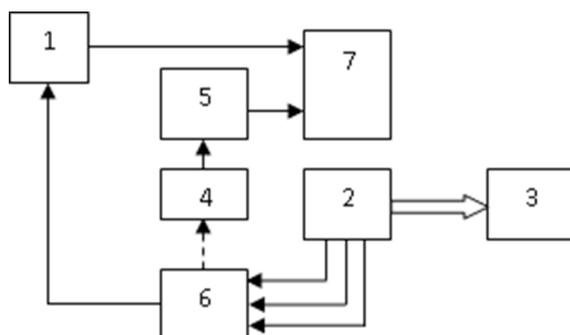


Рис. 1. Обобщенная структурная схема установки для изучения условий и режимов разделения и концентрирования клеток

Общий вид системы 1, входящей в состав установки, представлен на рис. 2. В состав системы 1 входят: термостат, блок измерения и поддержания температуры в камере термостата с помощью элементов Пельтье, узел измерения относительной влажности воздуха в камере термостата, узел вентиляции и поддержания влажности, узел измерения ВАХ, узел задания режима формирования пленки; 10-ти канальный планарно-емкостной чип-формат; универсальный мультиплексор, с режимами работы «10×1» и «произвольный», которые используются соответственно при измерении ВАХ и формировании биоструктур пленочного типа.



Рис. 2. Система для формирования биоструктур пленочного типа и измерения ВАХ

Функциональный генератор 2, входящий в состав установки, разработан на основе микросхемы AD 9833, которая представляет собой программируемый генератор, позволяющий генерировать поочередно сигналы синусоидальной, треугольной и прямоугольной формы. В разработанном варианте функциональный генератор 2 имеет три выхода, два из которых служат для подачи на микроэлектроды переменных сигналов различной формы и частоты, а один канал служит для подачи постоянного напряжения смещения. Выходы функционального генератора содержат буферные узлы, допускающие работу с слабо- и высокопроводящими типами сред. Диапазон рабочих частот переменного сигнала лежит в области от 0,1 Гц до 500 кГц с возможностью расширения до 1 МГц. Диапазон амплитуды (от пика до пика) переменного

сигнала любой формы лежит в области от 0 В до 15 В. Диапазон области смещений постоянного напряжения составляет $(0 - \pm 5)В$.

Цифровой двухканальный осциллограф 3 (тип DS1102E, компания RIGOL) имеет полосу пропускания 100 МГц, частоту выборки 1 ГГц, цветной 5,6" жидкокристаллический дисплей с активной матрицей (TFT LCD), объем памяти 1 Мб. Функциональные возможности цифрового осциллографа используются для визуализации и измерения электрических сигналов переменного и постоянного тока, подаваемых на контактные площадки микроэлектродного чип-формата планарного типа 6.

Микроскоп биологический исследовательский МБИ-8М 4 имеет следующие основные параметры: увеличение микроскопа 140 \times –2700 \times ; собственное увеличение стереоскопической насадки 1 \times –2 \times ; максимально допустимые размеры образца 150 \times 150 мм; пределы перемещения столика в горизонтальной плоскости (в двух направлениях) 60 мм. В составе микроскопа имеются различные объективы: 90 \times 1,25-МИ, 20 \times 0,80-МИ, 60 \times 1,25-МИ, 90 \times 1,30-МИ, а также окуляры компенсационные: 7 \times , 10 \times и 15 \times .

Цифровая камера-окуляр DCM-510 (5 МПикс., USB 2.0) оптически и конструктивно совместима с микроскопом МБИ-8М и используется для получения изображений в режиме реального времени. Программное приложение к камере ScopePhoto обеспечивает простую и удобную работу с видео и фотоматериалами. Для оценки скорости и направления электрокинетического транспорта клеток нами используются видеоматериалы, получаемые с помощью программы ScopePhoto, например, при изучении объемной скорости жидкости под действием электроосмотических сил на переменном токе, и плагин PIV (Particle Image Velocimetry) для программы MATLAB (7.10.0, R2010a), не требующие оплаты при их загрузке с интернета.

Что касается конструкции микроэлектродного чип-формата планарного типа 6 в составе установки, то следует отметить, что ее нельзя рассматривать как нечто консервативное с точки зрения физического устройства, которое используется для решения абсолютно всех задач, связанных с управлением электрокинетическим транспортом клеток или частиц. Микроэлектродный чип-формат планарного типа 6 является, прежде всего, предметом исследований и разработки с позиции обеспечения оптимальных условий и режимов электрофоретического их разделения и концентрирования.

Узел измерения ВАХ и камера DCM-510 работают с компьютером 7 посредством USB-портов.

На рис. 3 представлен общий вид разработанной экспериментальной установки.



Рис. 3. Общий вид установки для изучения условий и режимов разделения и концентрирования клеток

Для предварительной оценки функциональных возможностей разработанной установки был проверен хорошо известный эффект клеточного электрофореза, характеризующий поведение живых клеток в однородном электрическом поле. Эффект заключается в том, что из-за различия электрических характеристик клетки и окружающей ее среды клетка вынужденно поляризуется, происходит смещение ее двойного электрического слоя с образованием наведенного заряда на границе раздела фаз, что придает клетке свойства электрического диполя, дипольный момент которого, в силу размеров клетки, оказывается достаточно большим по величине. В результате воздействия однородного электрического поля все клетки достаточно быстро перемещаются к соответствующему электроду [9].

Для подтверждения данного эффекта был использован чип-формат из четырех сенсоров с микроэлектродами на основе индий-олово-оксида, изготовленных на подложке из стекла. С помощью системы, общий вид которой показан на рис. 2, были приготовлены пленочные структуры из микрокапли суспензии бактерий *S.aureus* при значениях напряжения 0,0 мВ и 0,5 мВ на контактных площадках электродов.

Методика получения пленок достаточно подробно описана в работе [11]. Окраску бактерий для последующего их фотографирования проводили следующим образом. Полученные пленки с бактериями фиксировали с помощью пламени горелки, беря пальцами правой руки стеклянную подложку чипа за торцевые плоскости так, чтобы пленка находилась сверху подложки. После чего плавными движениями проводили 2–3 раза над верхней частью пламени горелки. Весь процесс фиксации занимает при этом не более 2 с. После этого раствор фуксина Пфейффера наносили на фиксированные пленки, так, чтобы они полностью их покрывали. После экспозиции в течение 1–2 мин краситель сливался, препарат промывался стружкой воды, встряхивался и высушивался.

Фотографии общего вида используемого чип-формата с микроэлектродами из индий-олово-оксида и фрагментов сенсорной поверхности чувствительной области микроэлектродного чип-формата в зависимости от условий формирования представлены на рис. 4 а, б, в.

Измерение исходной емкости датчиков и емкости датчиков с пленками от условий формирования проводили с помощью цифрового измерителя L,C,R типа E7-12 (частота сигнала 1МГц, амплитуда — 250 мВ). Полученные результаты, после статистической обработки с помощью программы EXCEL выборочной совокупности ($n=4$, $\alpha=95\%$), показывают, что изменение емкости датчиков, содержащих пленки, полученные из микрокапли суспензии бактерий *S.aureus*, относительно исходных значений, сформированных при нулевом напряжении, составляет $(0,24 \pm 0,04)$ пФ, а при напряжении 0,5 мВ — $(0,10 \pm 0,04)$ пФ.

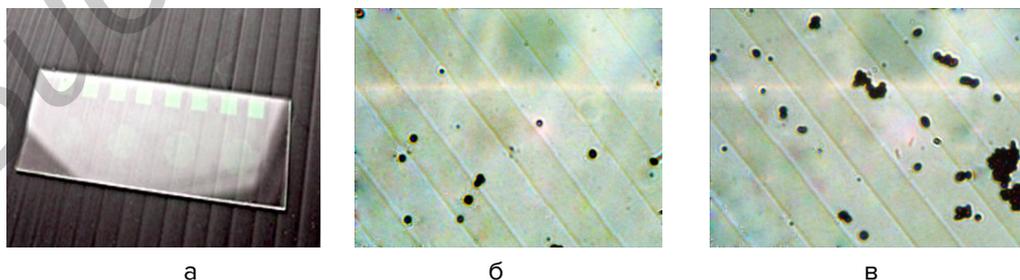


Рис. 4. Фотографии микроэлектродного чип-формата (а) и фрагментов сенсорной поверхности чипа от условий формирования: 0,0 мВ (б), 0,5 мВ (в)

Такое различие объясняется, по всей видимости, тем, что под воздействием сил поверхностного натяжения, согласно, так называемому, «coffee ring»-эффекту [12],

бактерии *S.aureus*, формируемые при нулевом напряжении на контактных площадках микроэлектродов, вытесняются к самому краю формируемой пленочной биоструктуры и практически не принимают участия в компенсации заряда измеряемой области пленки, в отличие от условий формирования при напряжении 0,5 мВ. Этот вывод подтверждается приведенными фотографиями (рис. 4 б, в), из которых видно, что в условиях формирования при напряжении на электродах в активной зоне датчиков задерживается значительно большее количество бактерий. Образование кластеров бактерий, которые видны на фотографиях, скорее всего, обусловлено неоптимальностью подбора значения электрической проводимости среды, при котором обеспечивается качественный электрокинетический транспорт клеток.

Заключение

1. Разработана экспериментальная установка на основе микроскопа МБИ-8М, включающая аппаратуру для управления электрокинетическим движением клеток в жидких средах в пределах микроэлектродного чип-формата планарного типа; аппаратуру для получения видео и фотоматериалов при изучении их движения и программы обработки видеоданных для расчета параметров транспорта клеток (скорость, направление).

2. На примере бактерий *S.aureus* установлено, что изменение, относительно исходных значений, емкости датчиков, содержащих пленки, полученные из микрокапли суспензии бактерий *S.aureus*, которые сформированы при нулевом напряжении, составляет $(0,24 \pm 0,04)$ пФ, а при напряжении 0,5 мВ — $(0,10 \pm 0,04)$ пФ. Полученные фотографии подтверждают результаты измерений, из которых видно, что в условиях формирования пленок из микрокапли суспензии бактерий при наличии напряжения 0,5 мВ на электродах, в активной зоне датчиков задерживается значительно большее количество бактерий, которые в большей степени и компенсируют исходный заряд среды суспензии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Yager P., Edwards T., Fu E. et al. Microfluidic diagnostic technologies for global public health // Nature, 2006, vol. 442, iss. 7101, pp. 412–418. DOI: 10.1038/nature05064.
2. Weigl B., Domingo G., LaBarre P., Gerlach J. Towards non- and minimally instrumented, microfluidics-based diagnostic devices // Lab on a Chip., 2008, vol. 8, iss. 12, pp. 1999–2014. DOI: 10.1039/b811314a.
3. Lenshof A. and Laurell T. Continuous separation of cells and particles in microfluidic systems // Chem. Soc. Rev., 2010, V. 39, iss. 3, pp. 1203–1217. DOI: 10.1039/b915999c.
4. Беленький, Б. Г. Высокоэффективный капиллярный электрофорез и микрофлюидные чип-анализаторы. II. Микрофлюидные чип-анализаторы / Б. Г. Беленький. — Научное приборостроение, 2003, том 13, №1. — С. 3–13
5. McDonald J. et al. Fabrication of microfluidic systems in polydimethylsiloxane // Electrophoresis, 2000, vol. 21, iss. 1, pp. 27–40.
6. Кухтевич, И. В. Микрофлюидные устройства для исследования клеток (Обзор) / И.В. Кухтевич, А.А. Евстратов, А.С. Букатин // Научное приборостроение, 2013, том 23, № 4. — С. 66–75.
7. Евстратов, А. А. Физические методы управления движением и разделением микрочастиц в жидких средах. I. Диэлектрофорез, фотофорез, оптофорез, оптический пинцет // Научное приборостроение, 2005, том 15, №1. — С. 3–20.
8. Казанкин, Д. С. Электрокинетические методы прижизненного исследования клеток. Практическая информация. Теоретическая информация и математические выкладки / Д. С. Казанкин. — <http://ikar.udm.ru>

9. Beatriz del Moral Zamora et al. Dielectrophoretic concentrator enhancement based on dielectric poles for continuously flowing samples// *Electroforesis*, 2015, vol. 36, iss. 13, pp. 1405–1413.
10. I-Fang Cheng, Hsien-Chang Chang et al. Rapid (< 5 min) identification of pathogen in human blood by electrokinetic concentration and surface-enhanced Raman spectroscopy // *Scientific Reports*. 2013. 3:2365. DOI:10.1038/strep02365
11. Повышение информативности обнаружения и дифференциации микроорганизмов при использовании планарно-емкостных чип-форматов фарадеевского и нефарадеевского типа / А.И. Драпеца [и др.] // *Современные методы и технологии создания и обработки материалов: Сб. научных трудов. В 3 кн. Кн.1 Материаловедение / редколлегия: С.А. Астапчик (гл.ред.) [и др.]. Минск: ФТИ НАН Беларуси, 2016. С.226–232.*
12. Deegan, R. D. et al. Capillary flow as the cause of ring stains from dried liquid drops// *Nature*, 1997, vol. 389, iss.6653, pp. 827–829, DOI:10.1038/39827

REFERENCES

1. Yager P., Edwards T., Fu E. et al. Microfluidic diagnostic technologies for global public health // *Nature*, 2006, vol.442, iss.7101, pp. 412–418. DOI: 10.1038/nature05064.
2. Weigl B., Domingo G., LaBarre P., Gerlach J. Towards non- and minimally instrumented, microfluidics-based diagnostic devices // *Lab on a Chip.*, 2008, vol. 8, iss. 12, pp. 1999–2014. DOI: 10.1039/b811314a.
3. Lenshof A. and Laurell T. Continuous separation of cells and particles in microfluidic systems // *Chem. Soc. Rev.*, 2010, V.39, iss.3, pp. 1203–1217. DOI: 10.1039/b915999c.
4. Belen'kiy B. G. Vysokoeffektivnyy kapillyarnyy elektroforez i mikroflyuidnyye chip analizatory. II. Mikroflyuidnyye chip-analizatory [B.G. Belenky High-performance capillary electrophoresis and microfluidic chip analyzers. II. Microfluidic Chip-Analyzers] // *Nauchnoye priborostroyeniye [Scientific Instrumentation]*. 2003, vol. 13, iss.1, pp.3–13 (in Russian)
5. McDonald J. et al. Fabrication of microfluidic systems in polydimethylsiloxane // *Electrophoresis*, 2000, vol. 21, iss.1, pp. 27–40.
6. Kukhtevich I. V., Yevstratov A. A., Bukatin A. S. Mikroflyuidnyye ustroystva dlya issledovaniya kletok (Obzor)[Microfluidic devices for cell studies: (Review)] // *Nauchnoye priborostroyeniye[Scientific Instrumentation]*. 2013, vol.23, iss.4, pp.66–75. (in Russian)
7. Yevstratov A. A. Fizicheskiye metody upravleniya dvizheniyem i razdeleniyem mikrochastits v zhidkikh sredakh.I. Dielektroforez, fotoforez, optoforez, opticheskiy pintset [Physical methods of microparticle transport and separation control in liquid media. I. Dielectrophoresis, photophoresis, optophoresis, optical tweezers]. *Nauchnoye priborostroyeniye[Scientific Instrumentation]*, 2005, vol.15, iss.1, pp.3–20. (in Russian)
8. D.S. Kazankin Elektrokineticheskiye metody prizhiznennogo issledovaniya kletok. Prakticheskaya informatsiya. Teoreticheskaya informatsiya i matematicheskiye vykladki [Electrokinetic methods of intravital cell research. Practical information. Theoretical information and mathematical calculations], <http://ikar.udm.ru> (in Russian)
9. Beatriz del Moral Zamora et al. Dielectrophoretic concentrator enhancement based on dielectric poles for continuously flowing samples// *Electroforesis*, 2015, vol. 36, iss. 13, pp.1405–1413.
10. I-Fang Cheng, Hsien-Chang Chang et al. Rapid (< 5 min) identification of pathogen in human blood by electrokinetic concentration and surface-enhanced Raman spectroscopy // *Scientific Reports*. 2013. 3:2365. DOI:10.1038/strep02365
11. Драпеца А. И., Лазарык С. К., Пleshko Н. В., et al. Povysheniye informativnosti obnaruzheniya i differentsatsii mikroorganizmov pri ispol'zovanii planarno-yemkostnykh chip-formatov faradeyevskogo i nefaradeyevskogo tipa [Increase of information content of detection and dif-

ferentiation of microorganisms using planar-capacitive chip formats of Faraday and non-Faraday type] // *Sovremennye metody i tehnologii sozdania i obrabotki materialov: Sb. nauchnih trydov*. vol. 3 kn. Kn.1 Materialovedenie. Minsk: FTI NAN Belarus, 2016. pp.226–232. (in Russian).

12. Deegan, R. D. et al. Capillary flow as the cause of ring stains from dried liquid drops// *Nature*, 1997.

Статья поступила в редакцию 28.04.17

Библиотека БГУИР