

ROZPRAWA
DOKTORSKA



Instytut Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk

ul. Kasprzaka 44/52, 01-224 Warszawa

Biblioteka Instytutu Chemii Fizycznej PAN

F-B.439/12



90000000184840

ROZPRAWA DOKTORSKA

Mikroprzepływowe minilaboratoria kombinatoryczne

A-21-7

Autor:

mgr inż. Krzysztof Churski

Promotor:

dr hab. Piotr Garstecki, prof. nadzw. IChF PAN

Rozprawa została przygotowana w ramach Międzynarodowych Studiów Doktoranckich Instytutu Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk w Warszawie.

Warszawa, kwiecień 2012 r.



B. 439/12

Spis treści

1.	Teza	5
2.	Mikrofluidyka kropelkowa	8
2.1.	Mikroprzepływowe tworzenie kropel	10
2.2.	Tworzenie kropel 'na żądanie'	11
2.2.1.	Kontrola ruchu cieczy siłami elektrycznymi	12
2.2.2.	Kontrola ruchu cieczy siłami napięcia powierzchniowego	14
2.2.3.	Kontrola ruchu cieczy siłami Marangoniego	15
2.2.4.	Kontrola ruchu cieczy siłami mechanicznymi	16
2.2.5.	Kontrola ruchu cieczy zaworami	17
2.3.	Wysokowydajne kropelkowe układy mikroprzepływowe i ich zastosowanie w biochemii i mikrobiologii	18
2.3.1.	Mechaniczna kontrola natężenia przepływu płynów w układzie.	18
2.3.2.	Kontrola natężenia przepływu płynów geometrią kanałów układu.	19
2.3.3.	Tworzenie bibliotek kropel w układzie.	20
2.4.	Mikroprzepływowe moduły do tworzenia kropel z małych objętości próbek	23
3.	Cel pracy	25
4.	Wyniki	27
4.1.	Wewnętrzny pneumatyczny zawór membranowy	27
4.1.1.	Szczelność zaworu	30
4.1.2.	Tworzenie kropel w złączu ogniskującym	30
4.1.3.	Tworzenie pęcherzy w złączu 'T'	35
4.1.4.	Sekwencje kropel	36
4.2.	Zawory zewnętrzne	38
4.2.1.	Zawór solenoidowy kapilarowy oraz tworzenie kropel z kontrolą przepływu obydwu faz	38
4.2.1.1.	Budowa zaworu	38
4.2.1.2.	Hydrodynamiczne podstawy działania zaworu	40
4.2.1.3.	Tworzenie kropel z kontrolą przepływu obydwu faz	45
4.2.1.4.	Opis pracy zaworu	48
4.2.2.	Zawór zaciskowy	52
4.3.	Tworzenie kropel z próbek o małych objętościach	54

4.3.1.	Tworzenie kropeł przez zasysanie próbek	54
4.3.2.	Moduł do deponowania próbek na chipie	55
4.3.2.1.	Budowa i sposób działania	55
4.3.2.2.	Tworzenie kropeł z cieczy o różnych lepkościach	56
4.4.	Układ mikroprzepływowy do wysokowydajnych badań przesiewowych	58
4.4.1.	Układ prototypowy	58
4.4.2.	Układ do badań przesiewowych	61
4.4.3.	Działanie układu	63
4.5.	Badanie oddziaływań pomiędzy parami antybiotyków	65
4.5.1.	Test intensywności dyfuzji antybiotyków między kroplami	66
4.5.2.	Wyznaczanie minimalnego stężenia hamującego	67
4.5.3.	Wyznaczanie typów oddziaływań między parami antybiotyków	69
5.	Podsumowanie i wnioski	74
6.	Metody	75
6.1.	Wytwarzanie układów mikroprzepływowych	75
6.2.	Używane płyny	75
6.3.	Techniki mikrobiologiczne	75
6.4.	Przygotowanie roztworów antybiotyków	76
6.5.	Wyznaczanie minimalnego stężenia hamującego metodą klasyczną	77
7.	Podziękowania	78
	Lista publikacji oraz zgłoszeń patentowych	79
7.1.	Publikacje	79
7.2.	Zgłoszenia patentowe	79
8.	Literatura	81

1. Teza

W ostatnim czasie rośnie oporność na antybiotyki wśród bakterii wywołujących najpowszechniejsze i najważniejsze zakażenia u człowieka. Dzieje się tak na skutek niewłaściwego oraz nadmiernego stosowania antybiotyków przez ludzi. Konsekwencją tego procesu jest ograniczenie sposobów skutecznego leczenia infekcji, a także związana z tym większa zachorowalność oraz śmiertelność z powodu zakażeń^{1, 2}. Jednym ze sposobów walki z bakteriami wykazującymi nieznaną do tej pory oporność jest wprowadzanie nowych antybiotyków, co jest procesem bardzo wolnym z powodu wykorzystania już wielu możliwości ich budowy. Inną strategią jest stosowanie mieszanin istniejących już antybiotyków, ponieważ często wykazują one nową, bądź silniejszą aktywność antibakteryjną, niż antybiotyki stosowane pojedynczo³.

Do testowania oporności antybiotykowej bakterii wykorzystywane są technologie bazujące na pomiarze ich szybkości wzrostu. Najczęściej opierają się one na metodzie seryjnych rozcieńczeń⁴ oraz metodzie dyfuzyjnej^{4, 5}. Są one czasochłonne oraz zużywa się w nich relatywnie dużych objętości odczynników. Użycie technologii polegającej na przygotowywaniu automatycznymi pipetami mieszanin reakcyjnych o różnych stężeniach antybiotyków w studzienkach płytek 96-dołkowych znacząco przyspiesza badania oraz minimalizuje zużywane objętości reagentów. Technologia ta nie zapewnia jednak wysokiej precyzji dozowania objętości cieczy (odchylenie standardowe < 5 %). Ponadto, w przypadku małych objętości próbek ich parowanie z otwartych do atmosfery studzienek bądź adhezja reagentów/bakterii na ściankach mogą mieć znaczący wpływ na otrzymywane wyniki⁶.

Wykorzystanie mikroprzepływów kropelkowych może okazać się ciekawą alternatywą dla technologii płytek wielodołkowych – zamknięta w kropli próbka nie paruje i nie ma bezpośredniego kontaktu z powierzchnią kanałów. Co więcej, technologie

mikroprzepływowe przy zachowaniu podobnej konsumpcyjności badanych substancji oraz wydajności, co technologie płytek wielodołkowych, mogą znacznie precyzyjniej od nich dozować mikroporcje cieczy i ustalać stężenia substancji chemicznych w mikromieszaninach.

Niniejsza rozprawa przedstawia skonstruowane w ramach studiów doktoranckich moduły służące automatyzacji dwufazowych przepływów w mikroskali oraz układ mikroprzepływowy do wysokowydajnych badań przesiewowych, który: i) wykorzystuje małe objętości (< 100 μ L) reagentów/zawiesiny bakteryjnej deponowanych bezpośrednio na chipie, ii) tworzy z nich sekwencje kropeł o składzie zaprogramowanym przez użytkownika, nawet jeśli roztwory reagentów/zawiesiny bakteryjnej różnią się znacząco lepkością, iii) bardzo precyzyjnie dozuje objętości cieczy (odchylenie standardowe < 1 %), iv) przenosi wygenerowane sekwencje kropeł do wężyków, w których są one magazynowane na czas inkubacji oraz v) po inkubacji dokonuje optycznego pomiaru stężenia danej substancji w kropli w celce mikroprzepływowej połączonej światłowodami ze źródłem światła i spektrofotometrem. Skonstruowany układ mikroprzepływowy wykorzystaliśmy do wyznaczania minimalnego stężenia hamującego antybiotyków oraz zbadania typu oddziaływań pomiędzy parami trzech antybiotyków: ampicyliny, chloramfenikolu i tetracykliny wobec bakterii *Escherichia coli*. Uzyskaliśmy wysoką zgodność uzyskanych wyników z wynikami uzyskanymi klasyczną metodą pomiarową (metodą seryjnych rozcieńczeń⁴) oraz z danymi literaturowymi.

Z technicznego punktu widzenia, opracowania będące podstawą niniejszej rozprawy wprowadziły do technologii mikroprzepływowej nowy sposób kontrolowania przepływu – z wykorzystaniem zaworów znajdujących się na zewnątrz układów mikroprzepływowych. Podejście to, kontrastujące z powszechnym w literaturze wykorzystaniem mikrozaworów zintegrowanych w układach mikroprzepływowych, ma szereg zalet obejmujących: i) zmniejszenie kosztów poprzez wykorzystanie konwencjonalnych zaworów, ii) znaczące

obniżenie złożoności procedur mikrofabrykacji układów mikroprzepływowych, iii) kompatybilność z układami mikroprzepływowymi wykonanymi w dowolnych materiałach, a więc również z najróżniejszymi rodzajami procesów chemicznych przeprowadzanymi wewnątrz tych kanałów. Wyniki będące podstawą niniejszej rozprawy zaowocowały już wykorzystaniem zewnętrznej kontroli przepływu na chipach mikroprzepływowych w szeregu złożonych układów służących m.in. wyznaczaniu diagramów fazowych białek oraz długoterminowej hodowli mikroorganizmów.

2. Mikrofluidyka kropelkowa

Mikrofluidyka (z ang. *microfluidics*) lub ogólniej techniki mikroprzepływowe to młoda interdyscyplinarna dziedzina nauki zajmująca się charakteryzacją przepływów cieczy i gazów w mikroskali oraz tworzeniem urządzeń wykorzystujących takie przepływy do zastosowań w chemii i biologii. Nauka ta łączy w sobie wiele dziedzin, m.in. fizykę, chemię czy inżynierię chemiczną.

Po raz pierwszy technologie oparte na przepływie cieczy przez mikrometrowe kanały zostały wykorzystane w latach 80. XX wieku do budowy głowic drukarek atramentowych. Dziedzina, którą dziś nazywamy mikrofluidyką, zaczęła się rozwijać na początku lat 90. minionego stulecia ^{7, 8}. Zajmuje się ona zarówno zachowaniem płynów w mikroskali (najczęściej w mikrokanałach wytworzonych w planarnych płytkach), jak i wykorzystaniem zaobserwowanych zachowań do stworzenia układów m.in. umożliwiających wysokowydajne badania przesiewowe reakcji.

Zainteresowanie zachowaniem płynów w mikrokanałach związane jest z innym rozkładem sił w skali mikroskopowej niż w skali makroskopowej. Dla przepływów w skali mikroskopowej liczba Reynoldsa wyrażona jako

$$Re = \frac{\rho U l}{\mu}$$

gdzie:

ρ – gęstość płynu [kg m^{-3}],

U – prędkość charakterystyczna płynu [m s^{-1}],

l – wymiar charakterystyczny [m],

μ – lepkość dynamiczna płynu [Pa s].

mówiąca o stosunku sił bezwładności do sił lepkościowych, przyjmuje wartości dużo mniejsze od 1. Pokazuje to, że w skali mikroskopowej siły bezwładności odgrywają bardzo małą rolę w odróżnieniu od roli tych sił w skali makroskopowej. Zachowania płynów w mikrokanałach są dominowane siłami lepkościowymi, efekty bezwładnościowe są pomijalnie małe, stąd trajektorie cząsteczek płynów mogą być dokładnie kontrolowane ⁹.

Można wyróżnić trzy najpopularniejsze działy mikrofluidyki: i) z przepływem ciągłym płynu w mikrokanałach ⁸, ii) z przepływem nieciągłym płynów w mikrokanałach – płyny się nie mieszają, bądź nie wszystkie się ze sobą mieszają i w układzie tworzą się pojedyncze bądź wielokrotne emulsje (z ang. *droplet microfluidics*) ¹⁰ oraz iii) z przepływem cieczy na otwartej płytce pokrytej elektrodami (z ang. *digital microfluidics*) ¹¹.

W mojej pracy zajmowałem się układami mikrofluidycznymi, w których głównie tworzyłem emulsje ciecz/ciecz. Takie układy z powodzeniem mogą być wykorzystane do prowadzenia reakcji chemicznych lub inkubacji mikroorganizmów wewnątrz pojedynczych kropelek. Reakcje wewnątrz kropli charakteryzują się i) brakiem dyspersji czasu przebywania w nich substancji – cała wprowadzona w danym momencie objętość próbki jest zamknięta w danej kropli, ii) szybkim mieszaniem wprowadzanych substancji – w płynącej kropli tworzą się wiry ułatwiające równomierne rozprowadzenie substancji zamkniętych w całej jej objętości, iii) niskim zużyciem odczynników, iv) prostą budową chipów, v) precyzyjną kontrolą warunków prowadzonych/badanych procesów oraz vi) statystycznie wysoką wiarygodnością otrzymywanych wyników – na skutek możliwości kilkakrotnego powtórzenia tej samej sekwencji kropelek w relatywnie krótkim czasie ¹².

2.1. Mikroprzepływowe tworzenie kropeł

Istnieją dwa typy mikroprzepływowych złączy, w których najczęściej tworzone są pojedyncze emulsje. Pierwszym z nich jest złącze "T", które składa się z dwóch łączących się pod kątem prostym mikrokanałów. W takim złączu Thorsen jako pierwszy zademonstrował mikrofluidyczne tworzenie emulsji¹⁰. Drugim typem złącza jest złącze ogniskujące przepływ (z ang. *flow-focusing*). Tworzą je dwa kanały o wspólnym wlocie łączące się z kanałem trzecim naprzeciwko siebie pod kątem prostym.

Mechanizmy tworzenia kropeł w obydwu typach złączy zostały dokładnie poznane i opisane. Tworzenie kropeł i pęcherzy we wprowadzonym przez Thorsena złączu "T" opisali Garstecki *i in.*¹³, Colin *i in.*¹⁴, De Menech¹⁵ oraz Anna *i in.*¹⁶.

Geometria ogniskująca przepływ w układzie osiowosymetrycznym została wprowadzona przez Gañana-Calvo *i in.*¹⁷, a w układzie planarnym przez Annę *i in.*¹⁸. Tworzenie pęcherzy w planarnym złączu ogniskującym zostało opisane przez Garsteckiego *i in.*¹⁹, Marmottanta *i in.*²⁰, a tworzenie kropeł przez Kumachevę *i in.*²¹ i Anna *i in.*²².

O dynamice tworzenia kropeł w złączach mikroprzepływowych decydują naprężenia ścinające związane z lepkością płynów oraz siły kapilarne związane z napięciem powierzchniowym na granicy fazy rozpraszanej i rozpraszającej. Stosunek tych dwóch sił wyrażana liczba kapilarna

$$Ca = \frac{\mu U}{\gamma}$$

gdzie:

μ – dynamiczna lepkość płynu [Pa s],

U – prędkość charakterystyczna płynu [m s⁻¹],

γ – napięcie powierzchniowe między płynącymi płynami [J m^{-2}].

Dla $Ca < 10^{-2}$ proces tworzenia kroplel/pęcherzy w mikrozłączach dominowany jest przez efekty powierzchniowe – kropla/pęcherz podczas tworzenia się jest stabilizowana siłami napięcia powierzchniowego. Rosnący w złączu język fazy rozpraszanej blokuje je dążąc do minimalizacji swojej powierzchni. Na skutek blokowania przepływu fazy rozpraszającej jej ciśnienie rośnie, co powoduje ściskanie języka fazy rozpraszanej. Ściskanie to następuje z szybkością proporcjonalną do natężenia przepływu fazy rozpraszającej. Po osiągnięciu pewnej wartości granicznej język pęka i tworzy się kropla/pęcherz. Mechanizm ten powoduje, że objętość tworzonych kroplel/pęcherzy skaluje się wyłącznie przez stosunek natężeń przepływów dwóch niemieszających się płynów.

Dla $Ca > 10^{-2}$ mechanizm tworzenia kroplel zależy dodatkowo od stosunku lepkości dwóch płynów. Faza rozpraszana tylko częściowo blokuje złącze, przez co miejsce urwania kroplel/pęcherza przesuwa się w dół kanału. Efekt ten jest szczególnie widoczny dla faz rozpraszanych o większych lepkościach. Urwanie kroplel/pęcherza następuje w momencie, kiedy siły napięcia powierzchniowego zostają zrównoważone przez naprężenia ścinające wywierane przez fazę rozpraszającą.

W obydwu reżimach hydrodynamicznych mechanizm mikroprzepływowego tworzenia kroplel/pęcherzy jest bardzo dobrze poznany i umożliwia bardzo dobrą kontrolę objętości tworzonych kroplel/pęcherzy oraz częstości ich emisji.

2.2. Tworzenie kroplel ‘na żądanie’

Mimo że mechanizmy tworzenia kroplel w układach mikroprzepływowych zostały bardzo dokładnie poznane i opisane, istnieje nadal mało komercyjnie dostępnych urządzeń opartych na kropelkowych układach mikroprzepływowych. Związane jest to z brakiem rozwiązań pozwalających na pełną ich automatyzację. W odniesieniu do technologii

kropelkowych automatyzacja jest rozumiana jako możliwości kontrolowanego i predefiniowanego tworzenia kropeł o zadanym składzie chemicznym, łączenia oraz dzielenia ich w zadanych stosunkach, sortowania, inkubowania oraz monitorowania *on-line* przebiegu badanego procesu.

Pierwszym etapem prac nad pełną automatyzacją kropelkowych układów mikroprzepływowych jest opracowanie techniki pozwalającej na precyzyjne tworzenie kropeł 'na żądanie' (z ang. *droplet-on-demand*), czyli kropeł o zadanych objętościach w zadanych odstępach czasu, również różnych dla każdej kolejno tworzonej kropli. Tworzenie kropeł 'na żądanie' wymaga kontrolowanego otwierania oraz zamykania przepływu cieczy. Taka kontrola może opierać się na i) działaniu na ciecz sił zatrzymujących bądź indukujących jej ruch lub ii) pracy urządzenia mechanicznego – zaworu – zamykającego oraz otwierającego światło przewodu.

2.2.1. Kontrola ruchu cieczy siłami elektrycznymi

He *i in.*²³ do tworzenia kropeł wykorzystali mechanizm elektrohydrodynamiczny²⁴. Za pomocą krótkich impulsów (10 ms) napięcia elektrycznego (800 V) wyciągali oni fazę rozpraszaną w stożek Taylora. Stożek Taylora tworzy się z płynu przewodzącego o małej objętości znajdującego się w polu elektrycznym o dostatecznie wysokim napięciu. Napięcie elektryczne wciąga płyn w pole, jednocześnie siły napięcia powierzchniowego starają się temu przeciwdziałać, co w efekcie powoduje powstanie stożka płynu. Z powstałego stożka He *i in.* urywali krople naprężeniami ścinającymi wywoływanymi przepływem fazy rozpraszającej. Tworzone krople były polidispersyjne (średnica 3-25 μm), a podczas urywania pojedynczej kropli generowały się krople satelitarne.

Link *i in.*²⁵ generowali krople o objętości od kilku do kilkuset pikolitrow ucinając w dwóch złączach ogniskujących końce stożków Taylora wyciąganych z kanałów fazy

rozpraszanej. Objętość generowanych kropeł zależała od napięcia pola elektrycznego użytego do wytworzenia stożka (do 800 V). Złącza były ustawione naprzeciwko siebie, a ich kanały wylotowe łączyły się ze sobą. Synchronizacja impulsów napięcia elektrycznego przykładanych do fazy rozpraszanej w obydwu złączach skutkowałą zsynchronizowanym tworzeniem się kropeł w tych złączach. Dzięki synchronizacji krople spotykały się parami w miejscu schodzenia się kanałów i łączyły się ze sobą w skutek różnoimiennego naładowania cieczy, z których były tworzone.

Zjawisko dielektroforezy opiera się na polaryzowalności cieczy będącej dielektrykiem o zerowym ładunku sumarycznym. Pod wpływem działania niejednorodnego pola elektrycznego spolaryzowana kropla przesuwa się bądź do obszarów o silniejszym polu (dielektroforeza pozytywna), bądź do obszarów o słabszym polu (dielektroforeza negatywna). Kierunek, w którym się porusza, zależy właśnie od polaryzowalności cieczy tworzącej kroplę, a konkretnie od tego, czy jest ona mniejsza czy większa od polaryzowalności otaczającej ją cieczy. Szybkoszienne napięcie przyłożone do równoległe ułożonych elektrod generuje przepływ cieczy w przestrzeni nad nimi, co pozwala na zasysanie cieczy z kropli będącej na jednym z końców równoległe ułożonych elektrod ²⁶. Jones *i in.* ²⁷ zaprezentowali układ składający się z dwóch współpłaszczyznowych i równoległych elektrod. Elektrody miały kształt trzech liniowo ułożonych połączonych ze sobą półkoli. Przełożenie szybkosziennego napięcia elektrycznego powodowało zasysanie cieczy z rezerwuaru znajdującego się na jednym z końców elektrod. Po jego odłączeniu w miejscu półkoli tworzyły się krople o dużych różnicach objętości, mimo identycznych wymiarów elektrodowych półkoli.

Elektrozwilżanie (z ang. *electrowetting* – EW) i elektrozwilżanie na dielektryku (z ang. *electrowetting on dielectric* - EWOD) związane jest z istnieniem wolnych ładunków na powierzchni międzyfazowej kropla – ciało stałe. W przypadku elektrozwilżania ciałem stałym jest elektroda, w przypadku elektrozwilżania na dielektryku warstwa izolacyjna

(dielektryk) pokrywająca elektrodę. Stosowanie dielektryka wynika z faktu, że wyższe napięcia elektryczne mogą powodować elektrolizę próbki znajdującej się bezpośrednio na elektrodzie. Elektrozwilżanie polega na zmianie (zmniejszeniu) kąta zwilżania elektrody/dielektryka przez kroplę na skutek przyłożonego napięcia. Fair *i in.* ¹¹ kontrolowali położenie kropli w układzie składającym się z dwóch równolegle ułożonych płytek jednej pokrytej izolatorem hydrofobowym – elektrodą uziemiającą, a drugiej macierzą elektrod. Pomiedzy płytkami umieścili kroplę 100 mM KCl o objętości ok. 1 μ L. Przełączanie napięcia 40-80 V pomiędzy poszczególnymi elektrodami macierzy powodowało ruch kropli na płytce. W swoich kolejnych pracach Fair ²⁸⁻³⁰ pokazał, że można w ten sposób tworzyć krople poprzez urywanie ich z dużych objętości oraz je łączyć, mieszać i dzielić. Malloggi *i in.* ³¹ wykorzystali elektrozwilżanie do wciągania języka fazy rozpraszanej w mikroprzepływowe złącze ogniskujące generując w ten sposób krople.

2.2.2. Kontrola ruchu cieczy siłami napięcia powierzchniowego

Zakrzywiona powierzchnia płynu wytwarza ciśnienie opisywane wzorem Laplace'a

$$\Delta p = \gamma \frac{dA}{dV}$$

gdzie:

γ – napięcie powierzchniowe między płynami [J m^{-2}],

dA - zmiana powierzchni płynu wywołana dV zmianą objętości.

Zatem dla zdefiniowanego kształtu mikrokanалу ciśnienie to jest funkcją napięcia powierzchniowego na granicy faza rozpraszana/faza rozpraszająca. Napięcie powierzchniowe silnie zależy od temperatury i zmniejsza się wraz z jej wzrostem, co wykorzystali Prakash *i in.* ³² do mikroprzepływowego tworzenia pęcherzy 'na żądanie' w

złącza ogniskującym. Umieścili oni pod rezerwuarem fazy rozpraszanej będącym pod stałym ciśnieniem platynową grzałkę o szerokości 50 μm , grubości 200 nm i oporze 95 Ohm pokrytą dielektryczną warstwą tlenku krzemu o grubości 2 μm . Zwężający się wylot z rezerwuaru indukował ciśnienie Laplace'a zatrzymujące wypływ gazu do złącza. Podanie krótkiego (100 ms) impulsu napięcia na grzałkę zwiększało temperaturę gazu, przez co zmniejszało się napięcie powierzchniowe na granicy faz, a wraz z nim ciśnienie Laplace'a blokujące wypływ gazu z rezerwuaru. Skutkowało to wysunięciem się języka gazu do złącza, który był urywany przez płynącą fazę rozpraszającą i tworzył się pęcherz.

2.2.3. Kontrola ruchu cieczy siłami Marangoniego

Zmiana ciśnienia bądź temperatury na jednym z końców kropli powoduje powstanie gradientu napięcia powierzchniowego wzdłuż tej kropli. Powstała na powierzchni różnica ciśnień wywołuje przepływ cieczy z obszarów o niższym do obszarów o wyższym napięciu powierzchniowym. W rezultacie kropla porusza się w kierunku strefy o niższym napięciu powierzchniowym. W przypadku ruchu indukowanego gradientem temperatury zjawisko to nazywane jest przepływem termokapilarnym. Ponieważ napięcie powierzchniowe maleje liniowo wraz ze wzrostem temperatury, ruch płynu odbywa się w kierunku do strefy o wyższej temperaturze ³³.

Baroud *i in.* ³⁴ oświetlali kanał wylotowy złącza ogniskującego prostopadłą do jego osi wiązką światła laserowego. Indukowała ona przepływ termokapilarny w języku tworzonej kropli oraz w fazie rozpraszającej. Powstałe naprężenia Marangoniego zatrzymywały język kropli do momentu, w którym ciśnienie w nim (przepływ generowany był przy użyciu pompy strzykawkowej) przekroczyło pewną wartość krytyczną i tworzyła się kropla. Objętość kropel zależała liniowo od mocy lasera (30 – 50 mW) dla ustalonych natężeń przepływu fazy rozpraszanej i rozpraszającej.

2.2.4. Kontrola ruchu cieczy siłami mechanicznymi

Attinger *i in.* ³⁵ tworzyli krople 'na żądanie' w układzie składający się z rezerwuaru, którego kanał wylotowy łączył się z mikrokanalem pod kątem prostym. Stożkowy kształt wylotu generował ciśnienie Laplace'a, które zatrzymywało ciecz w rezerwuarze. Na membranie wykonanej z polidimetylosiloksanu przykrywającej rezerwuar z cieczą był umieszczony piezoelektryczny siłownik. Po podłączeniu do niego napięcia elektrycznego odkształcał on membranę, co powodowało wysuwanie języka fazy rozpraszanej przez wylot do prostopadłego kanału. Faza rozpraszająca płynąca w tym kanale ścinała wysunięty język i tworzyła się kropla. Układ generował monodispersyjne krople (ok. 6 nL) tylko w bardzo wąskim zakresie objętości. Ponadto, nie był on w stanie wygenerować pojedynczej kropli.

Bransky *i in.* ³⁶ zaprezentowali podobny układ do tworzenia kropel, z tym że zintegrowali go z mikroprzepływowymi złączami "T" oraz ogniskującym, a piezoelektryczny siłownik był na stałe zintegrowany z chipem. Przykładając do niego krótkie (20 ms) impulsy napięcia (90 i 50 V) otrzymywali krople o średnicach odpowiednio 195,8 μm i 104,3 μm z odchyleniem standardowym objętości równym 0,3 %. Podobnie, jak w poprzednio opisanym rozwiązaniu, ten układ również tworzył monodispersyjne krople w wąskim zakresie objętości.

2.2.5. Kontrola ruchu cieczy zaworami

Najczęściej wykorzystywanym urządzeniem do zamykania bądź otwierania przepływu płynu jest zawór. Istnieje wiele rodzajów zaworów, jednak działanie większości z nich polega na mechanicznym zamykaniu bądź otwieraniu światła duktu, w którym porusza się płyn.

Mówiąc o zaworach mikroprzepływowych należy zwrócić szczególną uwagę na dwa zawory, które zaprezentowali Quake *i in.*³⁷ oraz Grover *i in.*³⁸.

Rozwiązanie Quake'a *i in.*³⁷ bazowało na dwóch prostopadle ułożonych kanałach oddzielonych cienką ścianką (30 μm). Całość była wytworzona w polidimetylosiloksanie, który jest materiałem elastycznym. W dolnym kanale znajdował się płyn, którego ruch był kontrolowany przez opisywany zawór, górny zaś nieprzelotowy kanał był kanałem kontrolującym. Kanał kontrolujący na skutek sterowanego przez użytkownika wzrostu w nim ciśnienia rozszerzał się, ściskając jednocześnie kanał z poruszającym się płynem. Dostatecznie wysokie ciśnienie (50-100 kPa) powodowało całkowite zamknięciem przepływu płynu. Dużą zaletą tego rozwiązania jest bardzo mała objętość martwa zaworu szacowana na ok. 100 pL.

Grover *i in.*³⁸ pokazali zawór składający się z trzech warstw: górnej i dolnej wykonanych ze szkła – górna z wytrawionymi kanałami, dolna z wytrawioną komorą – oraz środkowej, będącej elastyczną membraną wykonaną z polidimetylosiloksanu. Przyłożenie podciśnienia do komory odciągało membranę w dół powodując otwarcie zaworu, natomiast nadciśnienia dociskało membranę do górnej warstwy i zamykało przepływ płynu. Rozwiązanie to jest ciekawe szczególnie dlatego, że zawór wykonany był prawie w całości w sztywnym materiale, jedynie membrana była elastyczna.



Należy podkreślić, że obydwie opisane zawory były zintegrowane na chipie, podobnie jak większość prezentowanych do tej pory rozwiązań.

2.3. Wysokowydajne kropelkowe układy mikroprzepływowe i ich zastosowanie w biochemii i mikrobiologii

2.3.1. Mechaniczna kontrola natężenia przepływu płynów w układzie.

Song *i in.*³⁹ zaprezentowali układ, w którym tworzyli krople w potrójnym złączu 'T'. Reagenty dopływały do złącza dwoma skrajnymi kanałami, natomiast trzecim, środkowym – bufor dopełniający objętości tworzonych kropeł do stałej wartości. Ciecze były tłoczone pompami strzykawkowymi sterowanymi komputerowo. Natężenia przepływu poszczególnych strumieni zmieniały się w zaprogramowany sposób w zakresie od 4 do 63 nL s⁻¹, przy czym suma natężeń przepływów trzech strumieni była zawsze stała. Generowane w złączu krople (o objętości poniżej 0,5 nL) tworzyły sekwencje przemiatające jeden rząd stężenia każdego z reagentów. Układ ten został z powodzeniem wykorzystany m.in. do badań szybkich kinetyk reakcji biochemicznych – kinetyki pojedynczego obrotu RNAzy A. Należy podkreślić, że na pomiar 15 kinetyk zużyto tylko 2 μL reagentów.

Cao *i in.*⁴⁰ podobnie jak Song *i in.*³⁹ tworzyli krople, urywając wiązkę łączących się wcześniej strumieni, których natężenia przepływu kontrolowane były pompami strzykawkowymi. W swoim rozwiązaniu użyli pomp (Cetoni, GmbH) o znacznie krótszym czasie reakcji, dzięki czemu uzyskali większe różnice składu pomiędzy kolejnymi kroplami sekwencji. Skonstruowany system użyli do badania oddziaływań między antybiotykami. Mimo że uzyskiwany w sekwencjach przebieg zmian stężenia był nieco inny niż żądany w

protokole pracy układu, autorom udało się wyznaczyć m.in. mapy toksyczności mieszanin antybiotyków ampicyliny i chloramfenikolu na bakterie *Escherichia coli*.

2.3.2. Kontrola natężenia przepływu płynów geometrią kanałów układu.

Niu *i in.* ⁴¹ generowali sekwencje kropeł o malejącym liniowo bądź asymptotycznie dążącym do danej wielkości gradiencie stężenia danej substancji. W tym celu skonstruowali mikroprzepływową komorę pułapkującą kroplę-matkę. Krople z wygenerowanej wcześniej sekwencji zawierające jedynie bufor dopływały kolejno do unieruchomionej kropli zawierającej wodny roztwór fluoresceiny o stężeniu 100 mM i łączyły się z nią. Każdorazowo po dołączeniu wzrastała jej objętość i blokowała ona przepływ fazy rozpraszającej. Skutkowało to wypychaniem kropli-matki do kanału wylotowego z komory i urywaniem z niej kropli przez już częściowo odblokowany przepływ fazy rozpraszającej. Kształt komory został tak zaprojektowany, aby objętość emitowanej kropli była równa objętości kropli dołączanej. Od objętości kropeł dołączanych do kropli-matki zależał czas, po którym emitowana była kropla licząc od momentu dołączenia. Od tego czasu zależało wymieszanie się zawartości dołączanej kropli z zawartością kropli-matki. Stąd w zależności od objętości kropli w sekwencji autor uzyskiwał bądź liniowo malejący gradient stężenia w kolejnych kroplach, bądź asymptotycznie dążący do danej wartości (determinowanej przez stężenie substancji w kroplach dołączanych do kropli-matki). Układ został użyty w badaniach interakcji pomiędzy białkami do generowania sekwencji kropeł o malejącym asymptotycznie do zera stężeniu fluorescencyjnie znakowanej streptawidyny, które były następnie łączone z kroplami o stałym stężeniu znakowanej fluorescencyjnie biotyny. Cząsteczki znakujące były tak dobrane, aby oddziaływania między białkami w zależności od

stężenia streptawidyny mogły zostać zbadane techniką *FRET* (z ang. *Fluorescence Resonance Energy Transfer*).

Układ mikroprzepływowy zaprezentowany przez Damean *i in.* ⁴² z dwóch wpływających do niego strumieni generował równoległe cztery sekwencje kropeł. Krople te miały objętości z zakresu 5 – 60 pL zależnie od dobranych natężeń przepływu cieczy. Geometria układu determinowała liniową zmianę stężenia substancji dostarczanych w strumieniach wlotowych między sekwencjami kropeł. Układ ten został z powodzeniem wykorzystany w badaniu kinetyki stanu stacjonarnego enzymatycznej hydrolizy difosofranu fluoresceiny przez fosfatazę alkaliczną pochodząca z bakterii *Escherichia coli*.

2.3.3. Tworzenie bibliotek kropeł w układzie.

Inne podejście do wysokowydajnych badań przesiewowych zaprezentowali m.in. Huck ⁴³ i Link ^{44, 45}. Wykorzystali oni w tym celu biblioteki kropeł, które tworzyli przepuszczając interesujące ich substancje z wysokim natężeniem przepływu najczęściej przez złącze ogniskujące o małych wymiarach. Uzyskiwali w ten sposób długie sekwencje kropeł (rzędu 10^6) o nanolitrowych bądź jeszcze mniejszych objętościach. Późniejsze ich łączenie z innymi sekwencjami kropeł, dzielenie, sortowanie pozwalało na uzyskanie wielu danych o badanych próbkach bądź o procesach chemicznych i biochemicznych, w których one uczestniczą.

Theberge *i in.* ⁴³ wykorzystali mikroukład tworzący biblioteki kropeł do przeprowadzania syntez kombinatorycznych potencjalnych inhibitorów trombiny. Z trzech reagentów typu A (mieszanina amin i trietyloamin) stworzyli trzy biblioteki pikolitrowych kropeł, a następnie je ze sobą zmieszali. W układzie mikroprzepływowym połączyli je z kroplami bibliotek utworzonych z siedmiu reagentów typu B (mieszanina aldehydów i izocyjanków), z tym że biblioteki reagenta B nie były już ze sobą mieszane (nie potrzebne ze

względów statystycznych). Do analizy produktów reakcji autorzy użyli chromatografii cieczerwnej sprzężonej ze spektrometrem mas. Zaprezentowane rozwiązanie pozwalało na bardzo szybkie tworzenie sekwencji kropeł (2 kHz) z równolegle biegnącymi 21 reakcjami chemicznymi, a otrzymane wyniki były bardzo wiarygodne statystycznie (średnio 10^6 kropeł dla każdej z 21 reakcji).

Joensson *i in.* ⁴⁵ oznaczali komórki na podstawie markerów ich błony komórkowej również używając układu mikroprzepływowego do tworzenia bibliotek kropek. Biblioteki generowali z zawiesin zawierających komórki znakowane specyficznymi przeciwciałami przeciw markerom błonowym połączonymi z układem biotyna – streptawidyna – β -galaktozydaza. Znakowanie komórek wykonali według standardowych procedur. Z częstotnością 2,5 kHz stworzyli trzy biblioteki kropek o średnicach 40 μm : i) z przeciwciałami przeciw markerowi CCR5, który jest koreceptorem w zakażeniu HIV-1, ii) z przeciwciałami przeciw markerowi CD19, który jest markerem przyłączania komórek B oraz iii) kontrolę negatywną. Komórki w kropelkach w każdej z bibliotek pokryli innym stężeniem znacznika fluorescencyjnego. Następnie biblioteki połączyli z kropelkami zawierającymi substrat (di- β -D-galaktopyranozyd fluoresceiny) reakcji katalizowanej przez β -galaktozydazę. Oznaczanie komórek opierało się na pomiarze intensywności fluorescencji produktu tej reakcji. Zaprezentowana technika pozwalała na wysokowydajne (0,5 – 1,5 kHz) oznaczanie komórek, z większą rozdzielczością niż używane do tego celu standardowe sortery komórkowe.

Brouzes *i in.* ⁴⁴ użyli biblioteki kropek do wysokowydajnych analiz pojedynczych komórek. W swojej pracy badali przeżywalność ludzkich monocytów poddanych działaniu cytotoksyny, jaką jest mitomycyna C. Zaproponowaną procedurę można podzielić na pięć etapów: i) tworzenie z częstotnością 350 Hz ośmiu bibliotek o objętości pojedynczej kropli 200 pL, każda z bibliotek o innym stężeniu antybiotyku kodowanym innym stężeniem fluorescencyjnego markera, ii) łączenie z częstotnością 100 Hz każdej kropli z bibliotek toksyn z

kroplą (700 pL) zawierającą (statystycznie) pojedynczą komórkę, iii) inkubację utworzonych bibliotek, iv) łączenie bibliotek z kroplami znacznika przeżywalności komórek oraz v) pomiar intensywności fluorescencji każdej kropli pochodzącej od znacznika przeżywalności komórki oraz będącej znacznikiem stężenia antybiotyku. Otrzymane wyniki pozwalały z bardzo wysoką pewnością (duża liczba kropeł o każdym z badanych stężeń antybiotyku) określić cytotoksyczność mitomycyny C na komórki monocytów.

Fallah-Araghi *i in.* ⁴⁶ wykorzystali biblioteki kropelkowe do wysokowydajnych badań w inżynierii białkowej i programowanej ewolucji białek. W zaprezentowanym układzie w kroplach bibliotek zamykali pojedyncze geny. Biblioteki zebrane w mikroprobówce poddawali łańcuchowej reakcji polimeryzacji (z ang. *Polymer Chain Reaction - PCR*). Po amplifikacji każda kropla zawierała 30 000 kopii genu. Następnie łączyli je z kroplami zawierającymi pozakomórkowy układ transkrypcyjno-translacyjny (z ang. *cell-free coupled transcription-translation system - IVTT*) oraz substrat, z którego na drodze katalizy enzymem kodowanym szukanym genem powstawał produkt fluorescencyjny. Krople zawierające geny o szukanej aktywności selekcjonowali z częstotliwością 2 kHz przez łączenie ich z płynącym równoległe do nich strumieniem wody wykorzystując fluorescencyjne aktywowane elektrołączenie. Stosowalność układu w inżynierii białkowej zademonstrowali na przykładzie sortowania mieszaniny genów *lacZ*, kodujących enzym β -galaktozydazę oraz genów *lacZmut*. Z mieszaniny o stosunku molarnym *lacZ* do *lacZmut* 1 : 100 w pojedynczej rundzie udało im się uzyskać 504-krotny wzrost ilości białka *lacZ*. Błąd sortowania był bardzo mały ($<10^{-4}$) i wynikał głównie z przypadkowego zamykania w jednej kropli obydwu genów: *lacZ* i *lacZmut*. Do zbadania 10^6 genów układ zużył jedynie 150 μ L wszystkich reagentów.

2.4. Mikroprzepływowe moduły do tworzenia kropeł z małych objętości próbek

Procesy badane w układach mikroprzepływowych zachodzą w małych objętościach, co jest niejednokrotnie utożsamiane z niską konsumpcją reagentów. W tych szacunkach nie są jednak brane pod uwagę objętości, którymi należy wypełnić elementy doprowadzające ciecze do chipów, m.in. strzykawki, zawory, wężyki czy zbiorniki ciśnieniowe. Stąd potrzeba rozwiązania i) pozwalającego na użycie próbek o objętościach niewiele większych, niż te potrzebne do zbadania danych procesów oraz ii) minimalizującego ilość elementów systemu, z którymi próbka będzie miała kontakt.

Clausell-Tormos *i in.*⁴⁷ zaprezentowali rozwiązanie, w którym próbki były zasysane z płytek wielodołkowych. Proces ten kontrolował zawór wielokanałowy popularnie wykorzystywany w technikach chromatograficznych. Pompa strzykawkowa wytwarzała podciśnienie wywołujące ruch próbki. Pobrane próbki (5 μ L) przed wprowadzeniem do wężyka były rozdzielane olejem tworząc w nim sekwencję kropeł.

Trivedi *i in.*⁴⁸ dostarczali próbki do układu mikroprzepływowego podłączając go bezpośrednio do wylotu z kolumny chromatograficznej. Generowali w ten sposób bibliotekę kropeł o objętościach z zakresu od 2 nL do 2 μ L (w zależności od dobranych natężeń przepływu cieczy) z częstością 200 Hz. Następnie łączyli je z reagentem z częstością 20 Hz. Działo się to w złączu 'T' na drodze samoistnej fuzji płynącej kropli z językiem reagenta wypływającym ze stałym natężeniem przepływu z bocznego kanału.

Chen *i in.*⁴⁹ zaprezentowali moduł, który nazwali *chemistrodą*. Umożliwiała ona pobieranie próbek bezpośrednio z hodowli komórkowej. *Chemistroda* składała się dwóch prostopadle ułożonych szklanych kapilar, stykających się każda pod kątem 45° z powierzchnią medium hodowlanego. Krople dopływające jedną z kapilar dotykając

powierzchni hodowli komórkowej wymieniały częściowo z nią masę. Pobrana w ten sposób próbka wypływała drugą z kapilar.

Liu *i in.*⁵⁰ zmodyfikowali *chemistrodę* zaprezentowaną przez Chen *i in.*, co pozwoliło na pobieranie próbek o znacznie mniejszych objętościach (ok. 10 nL). Składała się ona z kapilary krzemowej i wężyka teflonowego umieszczonego koncentrycznie wewnątrz niej. Faza rozpraszająca wpływała powstałym w ten sposób płaszczem zewnętrznym. Docierając do wylotu dotykającego powierzchni roztworu, z którego pobrana miała być próbka, zawracała w przestrzeń rdzenia porywając ze sobą objętość cieczy i formowała ją w kroplę.

Sun *i in.*⁵¹ pokazali układ działający podobnie do zmodyfikowanej przez Liu *i in.* *chemistrody*, z tym że dysza do pobierania próbek posiadała oprócz kanału rdzeniowego i dwóch kanałów go otaczających, dodatkowe dwa zewnętrzne kanały opłaszczające całość. Kanałami zewnętrznymi płynęły strumienie reagentów, które zawracając do kanału rdzeniowego zasysały próbki (poniżej 50 pL). Olej płynący kanałami pośrednimi zawracał i ogniskował strumień reagentów zawierający próbki, formując z niego sekwencję kropeł. Konstrukcja wylotu dyszy umożliwia pobieranie substancji z mikropróbówek posiadających dodatkowy otwór na dnie. Ponadto, układ automatycznie przełączał dyszę między mikropróbówkami zawierającymi różne roztwory.

Du *i in.*⁵² zaprezentowali układ, który nazwali *SlipChip*. Składał się on z dwóch płaskich szklanych płytek z wyfrezowanymi dołkami, które po zsunięciu tworzyły matrycę mikrokomór. W myśl idei działania tego urządzenia, użytkownik otrzymuje chip, w którym dołki w jednej z płytek napełnione są zestawem reagentów, charakterystycznym dla danego oznaczenia. Dołki w drugiej płytce napełniane są badaną substancją przez użytkownika. Zsunięcie płytek powoduje połączenie się parami dołków i powstanie macierzy komór. Przebieg zachodzących równolegle reakcji jest badany optycznie, a otrzymane wyniki pozwalają na uzyskanie szukanych informacji o próbce.

3. Cel pracy

Celem pracy było stworzenie układu mikroprzepływowego do wysokowydajnych badań przesiewowych oraz zademonstrowanie jego użyteczności w badaniach biologicznych.

W szczególności istotne było opracowanie zaworu: i) o prostej konstrukcji, umożliwiającej w przyszłości łatwe wprowadzenie go do masowej produkcji, ii) relatywnie taniego, iii) pozwalającego na bardzo precyzyjną kontrolę nanolitrowych objętości cieczy, iv) sterowanego sygnałem elektrycznym, aby do kontroli jego stanu móc użyć wykorzystywanego popularnie w automatyce laboratoryjnej systemu LabView, v) kompatybilnego z układami mikroprzepływowymi wykonanymi w sztywnych materiałach oraz vi) możliwie inertnego chemicznie. Pozwolił on na tworzenie kropeł 'na żądanie', czyli o zadanej objętości i z określoną częstością, co było niezbędne do stworzenia zautomatyzowanego laboratorium na chipie.

Kolejnym celem pracy było skonstruowanie systemu opartego na układzie mikroprzepływowym tworzącego krople przez łączenie kropeł wygenerowanych 'na żądanie': i) o możliwie największej różnicy objętości oraz ii) z małych objętości próbek. Wymagało to zarówno i) opracowania protokołu tworzenia kropeł o dużych różnicach objętości, jak i ii) zaprojektowania układu mikroprzepływowego, który pozwalał na depozycję na nim próbek oraz na łączenie w jego kanałach kropeł o dużych różnicach objętości.

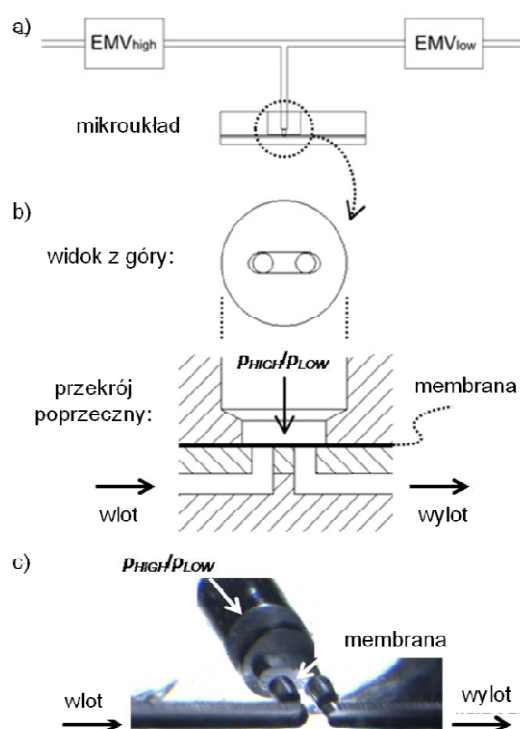
Działający układ wykorzystaliśmy do zbadania procesu biologicznego z udziałem mikroorganizmów. Przetestowaliśmy w ten sposób możliwość stosowania naszego rozwiązania w naukach biologicznych, a także sprawdziliśmy wiarygodności wyników

otrzymywanych przy jego użyciu porównując je z wynikami badań przeprowadzonych metodami klasycznymi oraz z danymi literaturowymi.

4. Wyniki

4.1. Wewnętrzny pneumatyczny zawór membranowy

Jednym ze skonstruowanych przez nas zaworów do kontroli nanolitrowych objętości płynów umożliwiających tworzenie kroplel/pęcherzy 'na żądanie' w układach mikroprzepływowych jest pneumatyczny zawór membranowy.



Rys. 1 (a) Schemat podłączenia zaworów elektromagnetycznych kontrolujących ciśnienie zamykające (EMV_{high}) i otwierające (EMV_{low}) do zaworu membranowego na chipie, (b) przekrój przez zawór oraz (c) zdjęcie zaworu na chipie.

Skonstruowany zawór membranowy opiera się na idei zaworu autorstwa Grovera *i in.*³⁸. Charakteryzuje się on tym, że jest stan (otwarty – zamknięty) jest pneumatycznie kontrolowany przez system zaworów elektromagnetycznych znajdujących się poza chipem,

ii) ma wymiennalną membranę, iii) kontroluje ruch płynów o ciśnieniu do 2 barów, iv) jego objętość martwa wynosi 10 nL oraz v) może pracować z częstością do 20 Hz.

Zawór składa się z i) dolnej warstwy z wyfrezowanymi mikrokanalami, ii) warstwy pośredniej posiadającej dwa otwory w miejscu zakończeń kanałów w warstwie dolnej, iii) warstwy górnej z wyfrezowanym miejscem na korek, iv) korka i v) utrzymywanej przez ten korek membrany (Rys. 1). Trzy pierwsze warstwy są ze sobą zespolone przez kompresję w podwyższonej temperaturze. Membrana jest naciągnięta na wciskany w układ korek. Warstwy układu oraz korek zostały wykonane w poliwęglanie. Jako membrana została użyta cienka warstwa gumy nitrylowej pochodząca z rękawiczki laboratoryjnej. Guma nitrylowa jest i) odporna na wiele substancji chemicznych, ii) bardzo wytrzymała mechanicznie oraz iii) nie pęcznieje w kontakcie z olejami, jak np. guma lateksowa czy polidimetylosiloksan w kontakcie z popularnie używanym w mikrofluidyce kropelkowej heksadekanem.

Montaż membrany poprzez dociśnięcie jej korkiem ma kilka zalet. W przypadku pęknięcia membrany bądź dostania się do komory zaworu zanieczyszczeń korek może zostać łatwo usunięty. Co więcej, dzięki takiemu rozwiązaniu membrana ma kontakt z płynem tylko w komorze zaworu. Zastosowanie warstwy pośredniej oraz naciągania membrany na korek pozwoliło na zminimalizowanie powierzchni kontaktu membrana – płyn. Ma to szczególne znaczenie w przypadku mikroprzepływów kropelkowych, gdzie bardzo ważnym parametrem wpływającym na stabilność kropel i hydrodynamikę ich tworzenia jest współczynnik zwilżalności ścian przez wykorzystywane płyny. W zaworze Grovera ³⁸ oraz w opisywanych wariacjach tego zaworu ⁵³ jedną ze ścian kanału stanowiła membrana, która często może być zupełnie inaczej zwilżana niż ściany. Powoduje to, iż płyny kontaktują się z membraną, co może bardzo ograniczać stosowanie tego rozwiązania do tworzenia kropel. W naszym zaworze płyn kontaktuje się z membraną jedynie w obszarze samego zaworu, który umiejscowiony jest przed złączem do generowania kropel. Dzięki takiemu rozwiązaniu krople nigdy nie kontaktują się z membraną. Ponadto,

opracowany zawór membranowy może być wykonany również w innych materiałach niż poliwęglan, co umożliwia dość swobodne dobranie ich, zarówno pod kątem właściwości mechanicznych, jak i inercji chemicznej.

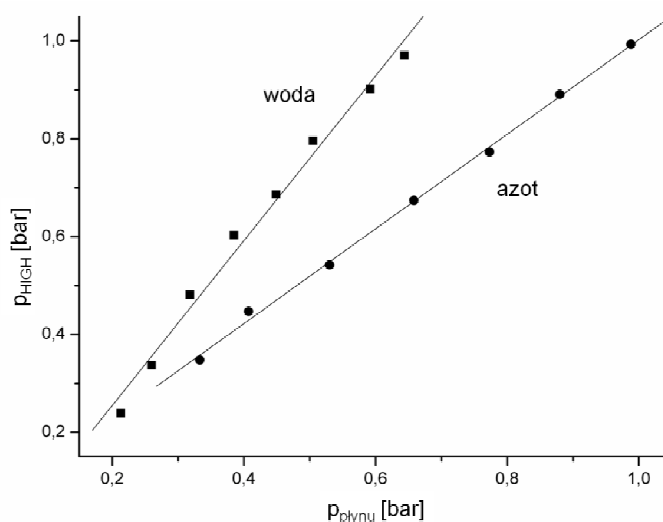
Korek połączony jest poprzez układ dwóch zaworów elektromagnetycznych (Sirai, V165, Włochy) z i) nadciśnieniem (zawór oznaczony na Rys. 1 jako EMV_{high}) oraz ii) ciśnieniem atmosferycznym/próżnią (zawór oznaczony na Rys. 1 jako EMV_{low}). Stan obydwu zaworów kontrolowany jest przy użyciu sterownika własnej konstrukcji. Opis budowy oraz działania zaworu elektromagnetycznego znajduje się w Rozdziale 4.2.1. Otwarcie przestrzeni nad membraną do nadciśnienia powoduje dociśnięcie membrany do warstwy pośredniej zaworu i zamknięcie przepływu płynu, natomiast otwarcie do ciśnienia atmosferycznego bądź podciśnienia powoduje jej podniesienie i otwarcie przepływu płynu. Zawory elektromagnetyczne pracują w przeciwfazie, z uwzględnieniem opóźnienia reakcji zaworów na włączenie/wyłączenie napięcia otwierającego.

Przepływ fazy rozpraszającej jest generowany pompami strzykawkowymi (Harvard PHD 2000, USA). Przepływ fazy rozpraszanej jest wymuszany ciśnieniowo poprzez wypychanie jej do układu mikroprzepływowego z pojemników ciśnieniowych, które są podłączone do źródła nadciśnienia szeregowym układem dwóch reduktorów.

Możliwość wykorzystania zaworu do kontroli ruchu płynów w mikroskali pokazaliśmy na przykładzie tworzenia kropeł 'na żądanie' w złączu ogniskującym oraz pęcherzy 'na żądanie' w złączu 'T'. Ponadto, w układzie z dwoma złączami 'T' ustawionymi naprzeciw siebie zademonstrowaliśmy możliwość generowania sekwencji kropeł zawierających dwa różne składniki.

4.1.1. Szczelność zaworu

W pierwszym eksperymencie dotyczącym działania zaworu membranowego zauważyliśmy, że ciśnienie szczelnie zamakające zawór rośnie liniowo wraz z ciśnieniem kontrolowanego płynu. Dla cieczy ciśnienie to musi być znacząco wyższe od ciśnienia płynu kontrolowanego, niż ma to miejsce dla gazów. Związane jest to z większą lepkością cieczy, a zatem z większą trudnością wypchnięcia jej z komory zaworu, szczególnie w ostatnim stadium zamykania (Rys. 2).

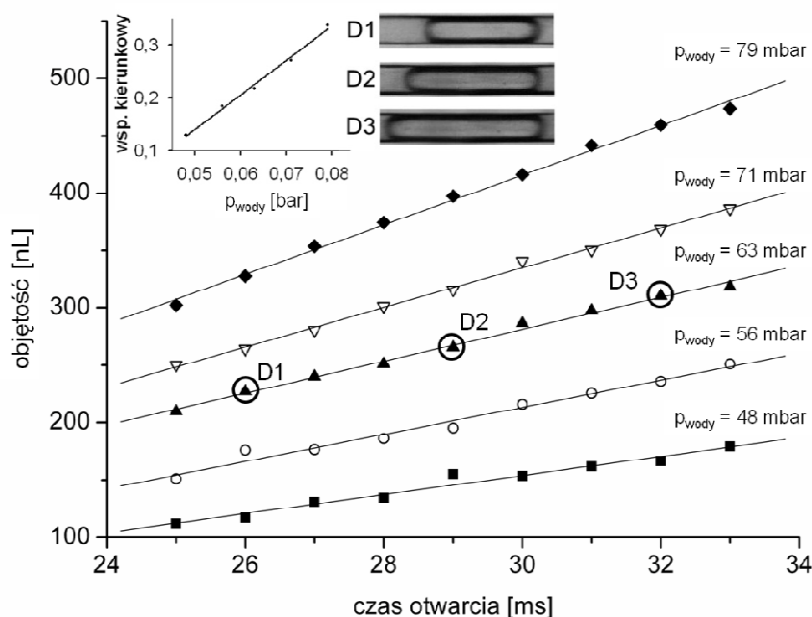


Rys. 2 Minimalne ciśnienie zamykające zawór membranowy w zależności od ciśnienia i rodzaju płynu.

4.1.2. Tworzenie kropeł w złączu ogniskującym

Szczegółową charakterystykę pracy zaworu oraz możliwość jego zastosowania w technikach mikroprzepływowych zademonstrowaliśmy wykorzystując opracowany zawór do kontroli przepływu fazy rozpraszanej w złączu ogniskującym. Użyliśmy złącza o

szerokości i wysokości kanałów 200 μm x 200 μm wykonanego z poliwęglanie. Zawór był umieszczony 4 mm przed złączem patrząc w kierunku przepływu płynu.



Rys. 3 Zależności objętości kropeł tworzonych z użyciem zaworu membranowego oraz zależność współczynnika kierunkowego tych zależności od ciśnienia fazy rozpraszanej.

Tworzyliśmy krople 'na żądanie' z częstotliwością 1 Hz z rosnącym liniowo czasem otwarcia zaworu dla różnych wartości ciśnienia fazy rozpraszanej przy stałym natężeniu przepływu fazy rozpraszającej. Otrzymaliśmy liniowe zależności objętości tworzonych kropeł od czasu otwarcia zaworu (Rys. 3). Ponadto, współczynniki kierunkowe tych zależności rosły liniowo wraz ze wzrostem ciśnienia fazy rozpraszanej. Generowane krople były monodispersyjne (odchylenie standardowe ich długości mierzonej w kanale było poniżej 5 %). Najmniejsza możliwa do wygenerowania kropla miała 100 nL.

Objętości tworzonych kropeł zależały również od natężenia przepływu fazy rozpraszającej – wraz z jego wzrostem malała ich objętość. Wraz ze wzrostem natężenia przepływu wzrastało ciśnienie, co powodowane było oporem hydrodynamicznym mikrokanalu za złączem. Efektywna siła wypychająca fazę rozpraszaną zależy od różnicy ciśnień pomiędzy rezerwuarem a złączem. Wzrost ciśnienia w złączu zmniejszał tę siłę i

powodował tworzenie kropeł o mniejszych objętościach. Ponadto, generując krople z częstotliwością 1 Hz dla różnych natężeń przepływu fazy rozpraszającej przy stałym ciśnieniu fazy rozpraszanej zaobserwowaliśmy, że dla danej wartości ciśnienia fazy rozpraszanej oraz czasu otwarcia zaworu istnieje taka wartość natężenia przepływu, powyżej której tworzona kropla jest rozrywana na dwie mniejsze. Objętość pierwszej z nich nie zależy od czasu otwarcia zaworu i jej wartość V wynika z naturalnego czasu urywania kropli ¹³

$$V \sim Q W^3$$

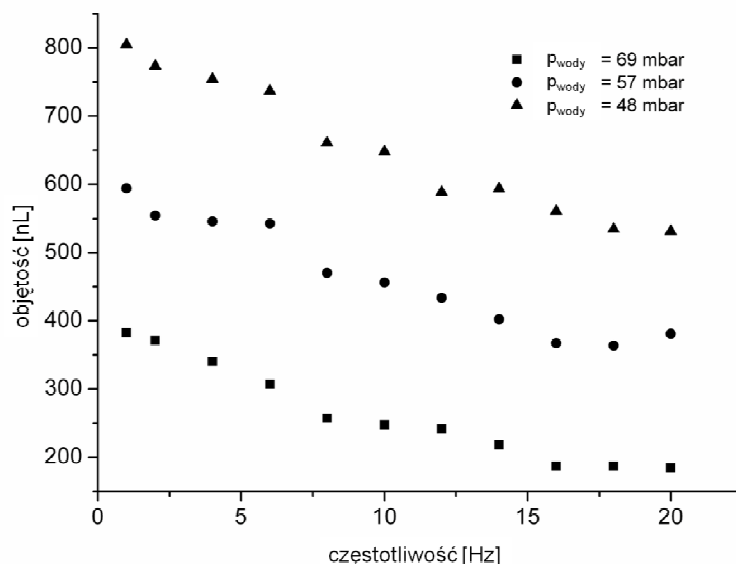
gdzie:

V – objętość kropli [L],

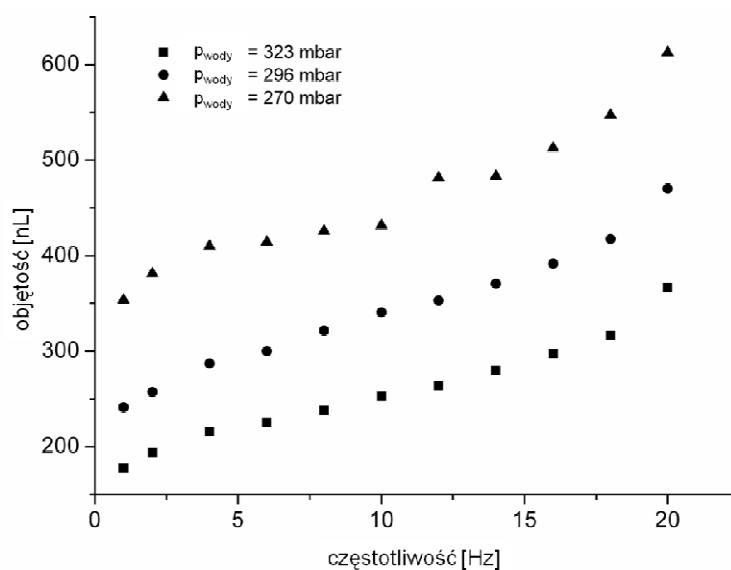
Q – natężenie przepływu fazy rozpraszanej [$\text{m}^3 \text{s}^{-1}$],

W – wymiar liniowy kanałów złącza [m].

Na objętość drugiej kropli wpływa czas otwarcia zaworu i jest ona proporcjonalna do różnicy czasów otwarcia zaworu i czasu, po którym została urwana pierwsza kropla.



Rys. 4 Zależność objętości kropeł od częstotliwości ich tworzenia przy zastosowaniu próżni, jako ciśnienia otwierającego zawór.

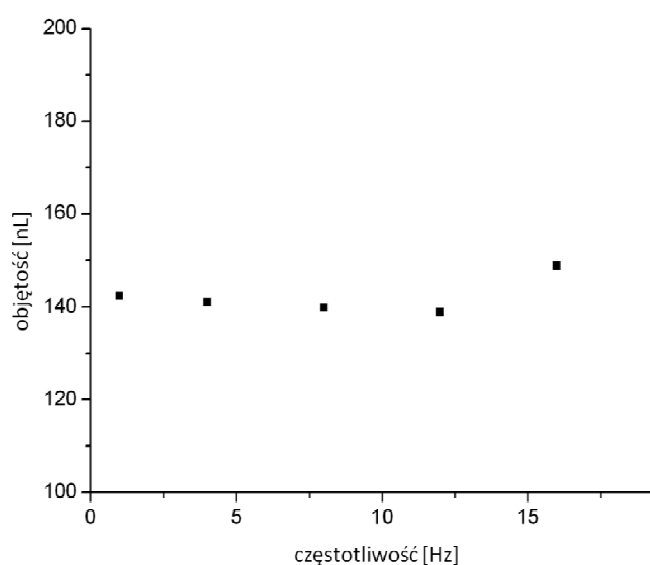


Rys. 5 Zależność objętości kropeł od częstotliwości ich tworzenia przy zastosowaniu ciśnienia atmosferycznego, jako ciśnienia otwierającego zawór.

Przetestowaliśmy również zdolności zaworu do kontrolowania czasu tworzenia kropeł oraz interwałów między nimi. W eksperymencie zmienialiśmy częstość tworzenia kropeł przy zachowaniu stałości wszystkich pozostałych parametrów. Gdy próżnia była ciśnieniem otwierającym zawór, wraz ze wzrostem częstości tworzenia kropeł malała ich objętość (Rys. 4). Po zmierzeniu wartości ciśnienia otwierającego dla różnych częstości tworzenia kropeł okazało się, że rośnie ono wraz z nią. Powodowane to było zbyt małą wydajnością pompy próżniowej, która dla większej częstości tworzenia musiała odprowadzać z nad membrany większe objętości powietrza. Po odłączeniu zaworu od pompy próżniowej, używając ciśnienia atmosferycznego, jako ciśnienia otwierającego, zaobserwowaliśmy efekt odwrotny (Rys. 5). Wraz ze wzrostem częstości tworzenia kropeł ich objętość rosła. Szybkość wypychania płynu spod membrany podczas zamykania zaworu maleje asymptotycznie. Wraz ze wzrostem częstości generowania kropeł maleje czas pozostawiony na zamknięcie się zaworu. Dla wysokich częstości mógł być on niewystarczający do pełnego wypchnięcia cieczy spod membrany. Taki niedomknięty zawór było znacznie łatwiej otworzyć niż zawór w pełni zamknięty, stąd rzeczywisty czas otwarcia

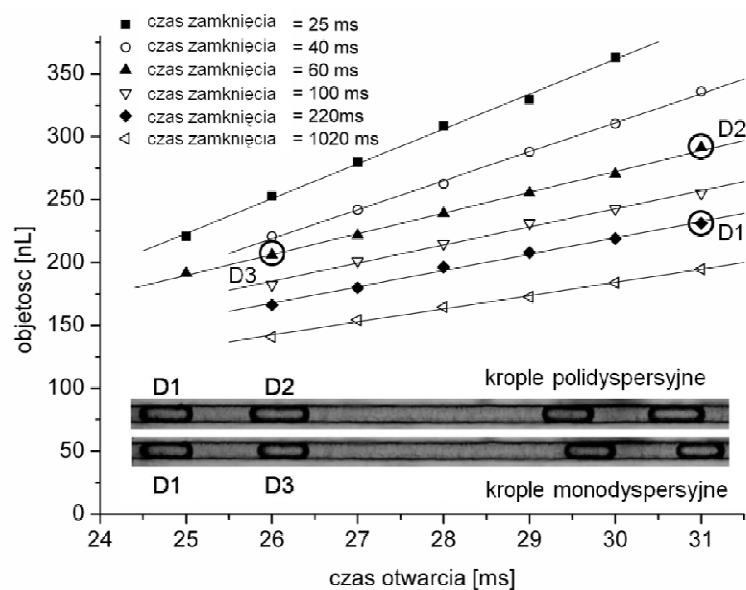
zaworu niedomkniętego był dłuższy, co przejawiało się w większej objętości tworzonych kropeł.

Opisane dwa efekty zmieniające objętości tworzonych kropeł na skutek zmiany częstości ich tworzenia można zbilansować dobierając odpowiednio ciśnienie otwierające i zamykające zawór. Dla ciśnienia otwierającego równego -150 mbar i zamykającego równego 300 mbar uzyskaliśmy charakterystykę generowania kropeł niezależną od częstości ich emisji (Rys. 6).



Rys. 6 Charakterystyka generowanie kropeł przy użyciu zaworu membranowego dla ciśnienia otwierającego równego -150 mbar i zamykającego równego 300 mbar.

Podobny efekt osiągnęliśmy w inny, prostszy sposób. Znając charakterystykę tworzenia kropeł dla różnych czasów zamknięcia zaworu (Rys. 7), wyznaczyliśmy dla każdego z nich taki czas otwarcia zaworu, by objętość tworzonych kropli była zawsze stała. Uwzględnienie tych wartości w protokole pracy zaworów elektromagnetycznych umożliwiło tworzenie monodispersyjnych kropeł przy zmiennej częstości ich emisji (Rys. 7).

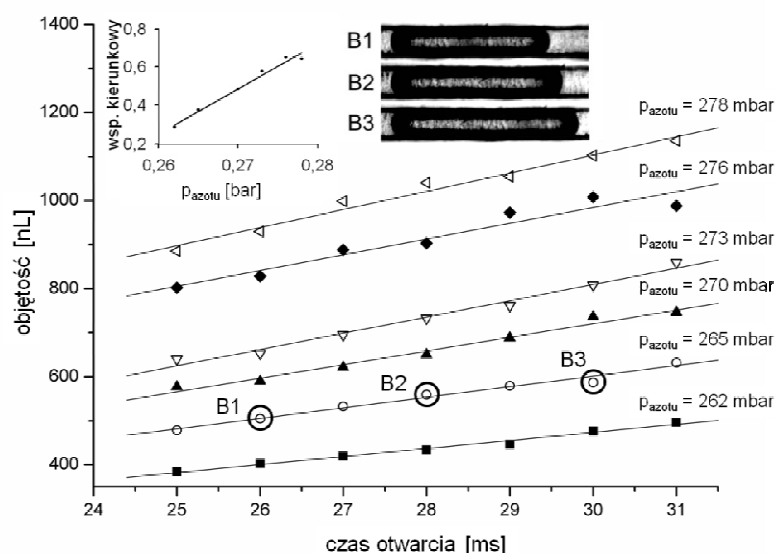


Rys. 7 Zależność objętości tworzonych kropelek od czasu otwarcia zaworu dla różnych czasów zamknięcia zaworu oraz demonstracja możliwości wyeliminowania polidispersji kropelek powodowanej zmienną częstością ich tworzenia.

4.1.3. Tworzenie pęcherzy w złączu 'T'

Sprawdziliśmy również użyteczność opisywanego zaworu do tworzenia pęcherzy 'na żądanie', wykorzystując w tym celu mikroprzepływowe złącza "T" o przekroju poprzecznym kanałów $400\ \mu\text{m} \times 400\ \mu\text{m}$. Podobnie, jak w przypadku tworzenia kropelek, układ generował monodispersyjne pęcherze z częstością do 20 Hz.

Bez kontroli przepływu objętość tworzonych mikrofluidycznie pęcherzy jest proporcjonalna do ciśnienia fazy rozpraszanej oraz odwrotnie proporcjonalna do natężenia przepływu fazy rozpraszającej. Kontrola przepływu fazy rozpraszanej uzależnia objętości tworzonych pęcherzy od czasu otwarcia zaworu (Rys. 8) (podobnie jak dla kropelek, maksymalna objętość tworzonych pęcherzy bez kontroli przepływu fazy rozpraszanej jest naturalnie ograniczona). Najmniejsza możliwa do wygenerowania objętości pęcherza wynosiła 350 nL.

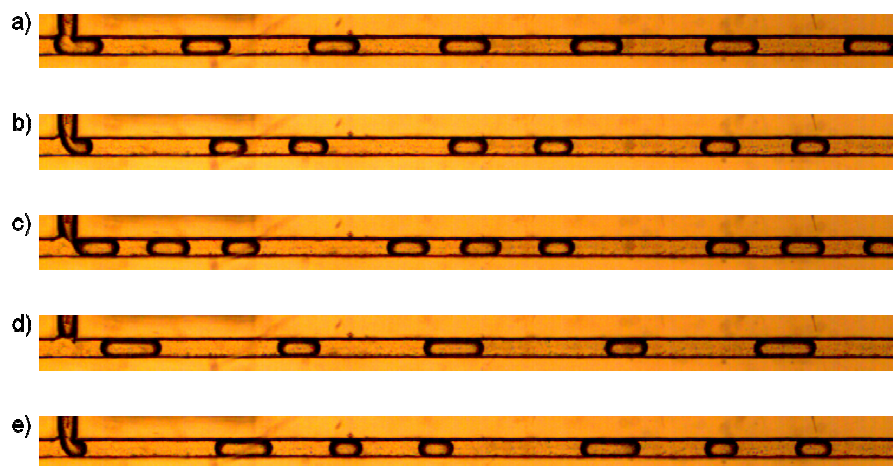


Rys. 8 Zależności objętości pęcherzy od czasu otwarcia zaworu membranowego oraz zależność współczynnika kierunkowego tych zależności od ciśnienia fazy rozpraszanej.

Podobnie jak dla kropeł, objętość pęcherzy ‘na żądanie’ zależała od natężenia przepływu fazy rozpraszającej – zwiększenie natężenia powodowało zmniejszenie objętości tworzonych pęcherzy. W odróżnieniu od tworzenia kropeł ‘na żądanie’ niemożliwe było kontrolowanie objętości pęcherzy używając próżni, jako ciśnienia otwierającego zawór. Przepływ gazu otwierany próżnią był zbyt gwałtowny, by móc tworzyć monodispersyjne pęcherze.

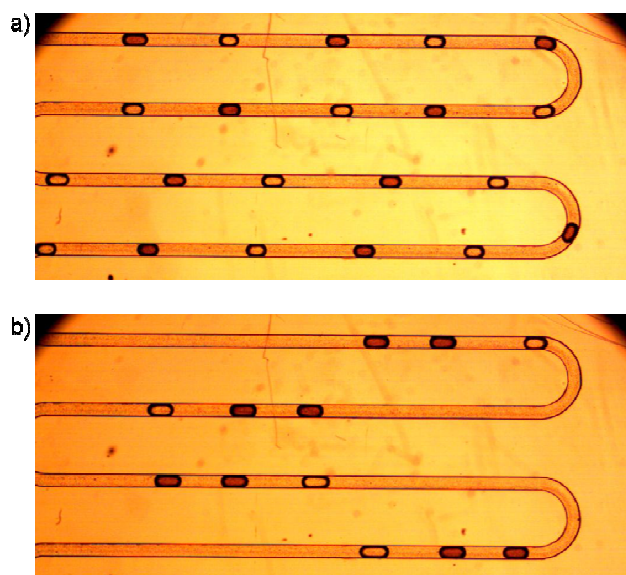
4.1.4. Sekwencje kropeł

Znając charakterystykę tworzenia kropeł ‘na żądanie’ wygenerowaliśmy sekwencje kropeł o różnych predefiniowanych objętościach i odległościach między nimi (Rys. 9). Tworzenie takich sekwencji może być użyteczne w zintegrowanych układach mikroprzepływowych do wysokowydajnych badań przesiewowych, w których konieczne będzie łączenie kropli o różnych objętościach w celu tworzenia kropeł-matek o zadanej ściśle kontrolowanej kompozycji.



Rys. 9 Sekwencje kropeł o (a) jednakowych objętościach w równych odstępach, (b) pakietów po dwie, (c) bądź trzy krople, (d) kropeł o dwóch objętościach w dwóch różnych odstępach oraz (e) pakietów po 3 krople o dwóch objętościach.

Używając układu z dwoma złączami "T" umieszczonymi naprzeciwko siebie, zasilając każde z nich inną substancją (czystą wodą i wodą z czarnym atramentem) tworzyliśmy sekwencje kropeł nie tylko o różnych objętościach i odległościach między nimi, ale również o różnym składzie (Rys. 10).



Rys. 10 Sekwencje jednakowych dwukolorowych kropeł (a) ułożonych naprzemiennie oraz (b) w pakietach po trzy krople.

4.2. Zawory zewnętrzne

Wykorzystywane w mikrofluidyce zawory kontrolujące nanolitrowe objętości płynów, m.in. te zaproponowane przez Grovera³⁸ czy Quake'a³⁷, jak i opisany wyżej zawór membranowy, są zaworami wewnętrznymi zintegrowanymi na chipie. W efekcie w każdym chipie, w którym potrzebna jest kontrola przepływu płynów, dodatkowo oprócz kanałów, trzeba wytwarzać skomplikowane struktury, jakimi najczęściej są zawory. Zwiększa to znacząco koszt oraz czas wytwarzania pojedynczego układu.

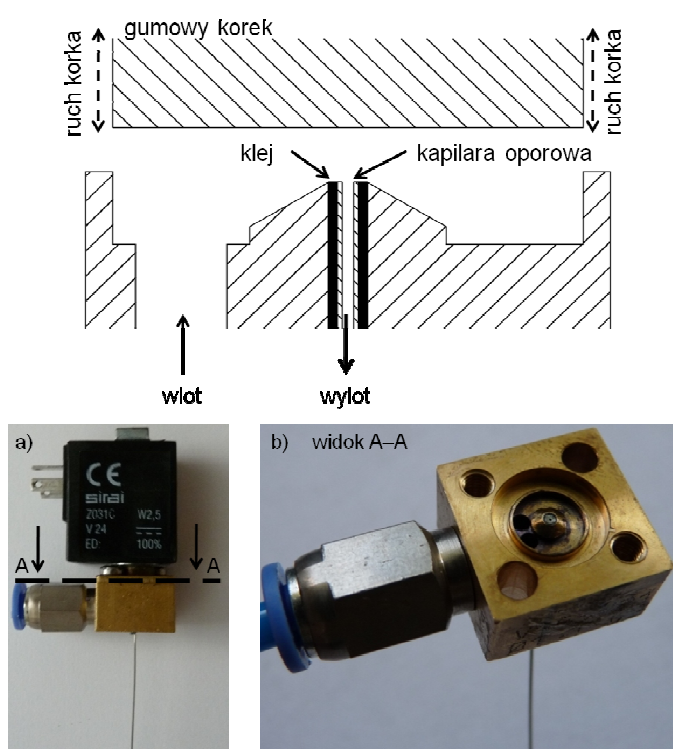
Zastosowanie zaworu zewnętrznego pozwoliłoby znacząco zmniejszyć koszty wytworzenia pojedynczego chipu, a on sam w większości przypadków składałby się jedynie z kanałów. Ponadto, takie podejście jest spójne z ideą jednorazowych układów mikroprzepływowych. W jej myśl docelowo układy te będą wytwarzane masowo i cena pojedynczego będzie na tyle niska, że jego wielokrotne użycie nie będzie opłacalne – np. koszty sterylizacji będą znacznie wyższe niż koszty fabrykacji. Zastosowanie zaworów zewnętrznych umożliwi wielokrotne wykorzystanie tych samych zaworów do różnych chipów i eksperymentów.

4.2.1. Zawór solenoidowy kapilarowy oraz tworzenie kropeł z kontrolą przepływu obydwu faz

4.2.1.1. Budowa zaworu

Budowa drugiego skonstruowanego przez nas zaworu bazuje na budowie komercyjnie dostępnego zaworu solenoidowego (V165, Sirai, Włochy), który oryginalnie składa się z trzech części: i) mosiężnego korpusu z cylindryczną komorą i usytuowanym

koncentrycznie w niej wylotem o stożkowym kształcie, ii) trzpienia ze stali nierdzewnej zakończonego gumowym korkiem oraz iii) cewki elektromagnetycznej. Prosta modyfikacja zaworu, polegająca na umieszczeniu w jego otworze wylotowym kapilary odporowej o znacząco wyższym, około 10^5 razy, oporze hydraulicznym niż opór wlotu, pozwoliła nam kontrolować przy jego użyciu nanolitrowe objętości płynów i tym samym wykorzystać go w technikach mikroprzepływowych (Rys. 11).



Rys. 11 Przekrój poprzeczny przez korpus zaworu solenoidowego, (a) widok zaworu z boku oraz (b) korpusu z góry.

Stan zaworu (otwarty – zamknięty) był kontrolowany napięciem elektrycznym. Normalnie, kiedy napięcie nie było przyłożone do cewki elektromagnetycznej zaworu, stalowy trzpień zakończony gumowym korkiem znajdował się w dolej pozycji zamykając w ten sposób wylot z komory zaworu. Przyłożenie napięcia 24 V do cewki powodowało wciągnięcie trzpienia w jej przestrzeń rdzeniową i w efekcie otwarcie wylotu zaworu.

4.2.1.2. Hydrodynamiczne podstawy działania zaworu

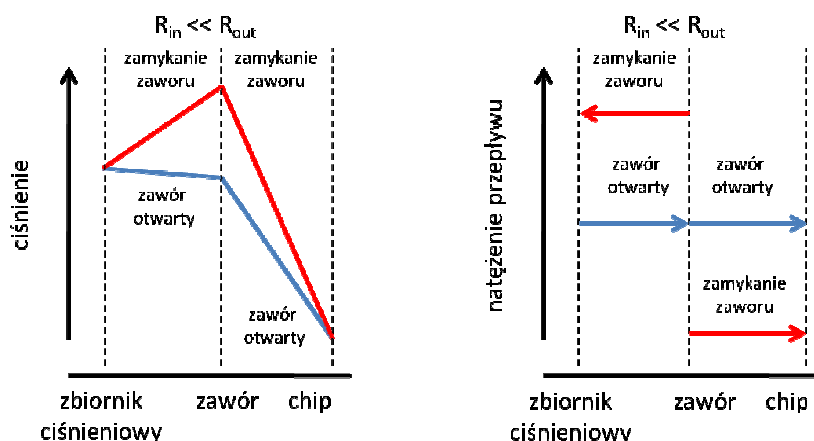
Wykorzystanie komercyjnego zaworu kontrolującego oryginalnie objętości mikrolitrowe do tworzenia nanolitrowych kropeł możliwe było dzięki dokonanej przez nas modyfikacji wprowadzającej dużą różnicę pomiędzy oporem wlotu R_{in} i oporem wylotu R_{out} z zaworu. Natężenie przepływu Q przez przewód o oporze R zależy od różnicy ciśnień dp na jego końcach, co opisuje prawo Hagen-Poiseuille

$$Q = \frac{dp}{R}$$

Opór przewodu jest proporcjonalny do jego długości L oraz odwrotnie proporcjonalny do d^4 , gdzie d jest średnicą przewodu. Jako że wlot do korpusu zaworu miał średnicę około 30 razy większą niż średnica kapilary oporowej modyfikującej oryginalną budowę zaworu, różnica oporów pomiędzy wylotem a wlotem z zaworu była rzędu 10^5 . Dzięki temu, mimo znacznie większej różnicy ciśnienia między zaworem i układem mikroprzepływowym, niż różnica między zaworem i zbiornikiem ciśnieniowym, zawór zamykając się wypychał ciecz w górę – w kierunku do zbiornika ciśnieniowego, a nie w dół – w kierunku do chipa (Rys. 12). W efekcie objętość cieczy wypychanej podczas zamykania z komory zaworu została zredukowana do 10-15 nL, mimo iż całkowita objętość martwa zaworu jest rzędu pojedynczych mililitrów.

Ponadto, użyta kapilara oporowa stabilizowała natężenie przepływu cieczy. Oscylacje natężenia skutkują dużym rozrzutem objętości tworzonych kropeł 'na żądanie', pomimo stałego czasu otwarcia zaworu. Korczyk *i in.*⁵⁴ pokazali, że niestabilność natężenia przepływu fazy rozpraszającej silnie wpływa na objętość generowanych kropeł. Zależność ta wynika z faktu, że objętość kropeł jest proporcjonalna do natężenia przepływu i do czasu otwarcia zaworu. Zmiany w charakterystyce generowania kropeł uniemożliwiają tworzenie kropeł o żądanej objętości. Wysoka wartość $\frac{R_{out}}{R_{in}}$ eliminuje ten problem i pozwala na

tworzenie monodispersyjnych kropeł dla stałego czasu otwarcia zaworu. Z drugiej strony, zmniejszanie średnicy wewnętrznej wykorzystywanych kapilar podwyższa ryzyko zatykania się ich. Stąd należy tak dobrać kapilarę, by jej wymiary były kompromisem pomiędzy oporem a funkcjonalnością.



Rys. 12 Schematy rozkładu ciśnienia oraz natężenia przepływu w układzie zbiornik ciśnieniowy – zawór – chip, gdy zawór jest otwarty oraz podczas zamykania zaworu.

Elastyczność materiału, z którego wykonana jest kapilara, ma istotny wpływ na dynamikę tworzenia się kropeł. Zamykanie się zaworu powoduje wzrost ciśnienia w jego kanale wylotowym. Przewody elastyczne w pierwszej fazie zamykania rozszerzając się kompensują to ciśnienie. Następnie relaksując się zmniejszają swoją średnicę wewnętrzną, co powoduje wypychanie z nich do złącza mikroprzepływowego dodatkowej objętości cieczy. Objętość ta wzrasta wraz ze wzrostem elastyczności materiału, z którego wykonany jest przewód. Na przykład dla przewodów wykonanych w polietylenie (dokładnie w PE60) objętość ta jest rzędu objętości pojedynczej kropli. Uniemożliwia to w oczywisty sposób precyzyjne tworzenie kropeł. Stalowe kapilary użyte do modyfikacji zaworów są nieelastyczne. Dzięki temu nie kompensują one ciśnienia generowanego przez zawór podczas zamykania, wobec czego wypychana podczas ich relaksacji objętość cieczy jest pomijalnie mała.

Dokładność odmierzenia objętości kropli jest ograniczona przez całkowitą podatność hydrauliczną kapilary c , która może być wyrażona jako

$$c=c_p+c_k$$

gdzie

c_p – podatność hydrauliczna związana ze ścisłością płynu,

c_k - podatność hydrauliczna związana z rozszerzalnością elastyczną kapilary.

Podatność hydrauliczna charakteryzuje podatność elastyczną ścian kapilary oraz ścisłość płynu wypełniającego tę kapilarę na przyłożone do niej ciśnienie. Jeżeli kapilara o objętości V_0 pod ciśnieniem p_0 zostanie połączona ze zbiornikiem płynu o ciśnieniu $p_1=p_0+\Delta p$, to na skutek ścisłości płynu oraz rozszerzalności elastycznej kapilary wpłynie do niej dodatkowa objętość płynu (ΔV)

$$\Delta V=\Delta p(c_p+c_k)$$

Podatność hydrauliczna związana ze ścisłością płynu c_p zależy od rodzaju płynu wypełniającego kapilarę i jest opisana w dobrym przybliżeniu wzorem

$$c_p=V_0\beta_t$$

gdzie

β_t – ścisłość izotermiczna płynu wypełniającego kapilarę.

Ze względu na bardzo dużą ścisłość gazów, ograniczenie efektów związanych z podatnością hydrauliczną wymaga, aby w kapilarze nie znajdowały się pęcherze gazu.

Ścisłość większości cieczy w temperaturach normalnych jest do siebie zbliżona: ścisłość izotermiczna wody wynosi ok. $5 \times 10^{-10} \text{ Pa}^{-1}$, a ścisłość alkanów i olejów zawiera się w przedziale od ok. $5 \times 10^{-10} \text{ Pa}^{-1}$ do ok. $12 \times 10^{-10} \text{ Pa}^{-1}$.

Podatność hydrauliczna związana z rozszerzalnością elastyczną kapilary c_k zależy i) od własności materiału kapilary, m.in. od jego modułu Younga (E) i liczby Poissona (σ) oraz ii) od geometrii kapilary, m.in. od jej długości (L), promienia wewnętrznego (r) oraz grubości ściany (h). Dla kapilar grubościennych (tj. takich, których grubość ścian jest większa niż promień światła kapilary) dobre przybliżenie podatności c_k opisuje wzór

$$c_k = 2V_0(1+\sigma)E^{-1}$$

Dla kapilar cienkościennych, dobre przybliżenie podatności hydraulicznej opisuje wzór

$$c_k = 2V_0\left(\frac{r}{h}\right)E^{-1}$$

Dla uproszczenia w rozważaniach zakładamy wyłącznie oszacowanie podatności hydraulicznych kapilar grubościennych, jako że cienkościennie są z założenia niekorzystne w omawianym zastosowaniu.

Wstawiając wyrażenia na podatności hydrauliczne c_k oraz c_p otrzymujemy wyrażenie na objętość wypchniętą z kapilary po obniżeniu ciśnienia o wartość Δp

$$\Delta V = \Delta p V_0 \beta_t + 2\Delta p V_0 (1+\sigma)E^{-1} = \Delta V_p + \Delta V_k$$

Z powyższego wzoru wynika, że objętość wypychana z kapilary na skutek obniżenia ciśnienia panującego w kapilarze posiada wkład ΔV_p związany ze ściśliwością izotermiczną wypełniającego kapilarę płynu oraz wkład ΔV_k związany z własnościami elastycznymi materiału, z którego wykonana jest kapilara.

Po otwarciu zaworu w przewodzie zaczyna płynąć ciecz i po rozwinięciu przepływu laminarnego ciśnienie w kapilarze zmienia się liniowo z jej długością od ciśnienia zaworu (p_{zaworu}) do ciśnienia układu ($p_{układu}$). W wyniku działania tego ciśnienia przewód rozszerza się elastycznie o objętość

$$\Delta V = \Delta V_p + \Delta V_k$$

gdzie

$$\Delta V_p \sim \left(\frac{\Delta p}{2}\right) V_0 \beta_t$$

oraz

$$\Delta V_k \sim \Delta p V_0 (1 + \sigma) E^{-1}$$

przy czym $\Delta p = p_{zaworu} - p_{układu}$. Po zamknięciu zaworu ciśnienie w przewodzie spada do wartości $p_{układu}$ i jednocześnie wypychana jest do kropli objętość ΔV .

Aby zachować precyzję ok. 1% w odmierzaniu objętości generowanej kropli, objętość wypchnięta ΔV powinna być nie większa niż 1% objętości V_{min} najmniejszej generowanej kropli.

Dla oceny przydatności poszczególnych średnic i materiałów kapilar, rozpatrzmy trzy wartości minimalnej objętości kropli generowanych w układzie: $V_{min} = 1 \text{ nL}$, 10 nL , oraz 100 nL oraz przyjmijmy, że ściśliwość izotermiczna cieczy wypełniającej kapilarę równa się $\beta_t = 1 \times 10^{-9} \text{ Pa}^{-1}$.

Zakładając precyzję generowania kropeł 1%, graniczne wartości na oczekiwaną objętość wypychaną z kapilary ze względu na jej podatność hydrauliczną równe są $\Delta V_{max} = \frac{V_{min}}{100} = 0,01 \text{ nL}$, $0,1 \text{ nL}$ oraz 1 nL .

Ze względu na zachowanie oporu kapilary znacznie większego niż opór hydrauliczny układu mikroprzepływowego zakładamy, że średnica kapilary wynosi $50 \text{ }\mu\text{m}$, a długość 5 cm . Przyjmując, że liczba Poissona wynosi $0,4$, otrzymujemy minimalną wartość modułu Younga

$$E_{min} = 1,4 V_0 \Delta p \Delta V_{max}^{-1}$$

Jako że zazwyczaj do generowania przepływu ciecży w układach mikroprzepływowych używaliśmy ciśnienie rzędu 10^{-1} bara, przyjęliśmy $\Delta p = 0,5$ bara otrzymując w ten sposób:

$$E_{min} = 2,749 \text{ GPa (dla } V_{min} = 1 \text{ nL); } E_{min}^{-1} = 0.36 \times 10^{-9} \text{ Pa}^{-1},$$

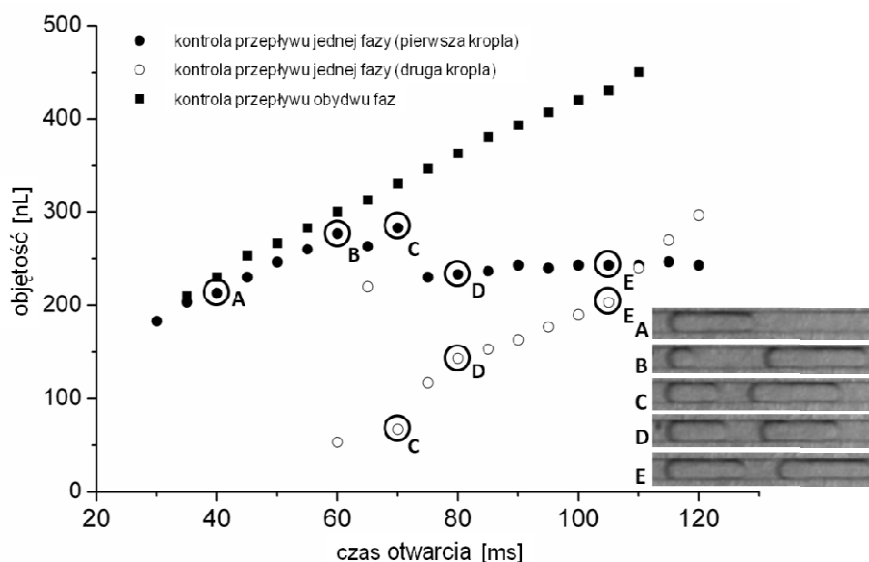
$$E_{min} = 0,275 \text{ GPa (dla } V_{min} = 10 \text{ nL); } E_{min}^{-1} = 3.6 \times 10^{-9} \text{ Pa}^{-1},$$

$$E_{min} = 0,027 \text{ GPa (dla } V_{min} = 100 \text{ nL); } E_{min}^{-1} = 36 \times 10^{-9} \text{ Pa}^{-1}.$$

Powyższe wyniki jednoznacznie ograniczają rodzaj materiałów, z których mogą być wykonane przewody łączące zawory z układem mikroprzepływowym. Wynika z nich, że zasilając układ cieczą roboczą z rezerwuarów pod ciśnieniem ok. 0,5 bara, do generowania kropli mniejszych niż 1 nL konieczne jest stosowanie kapilar z najtwardszych polimerów (np. polieteroeteroketonu), szklanych lub stalowych, a do generowania kropli mniejszych niż 10 nL konieczne jest stosowanie kapilar polimerowych (np. teflonowych, polietylenowych lub polieteroeteroketonowych), szklanych bądź stalowych.

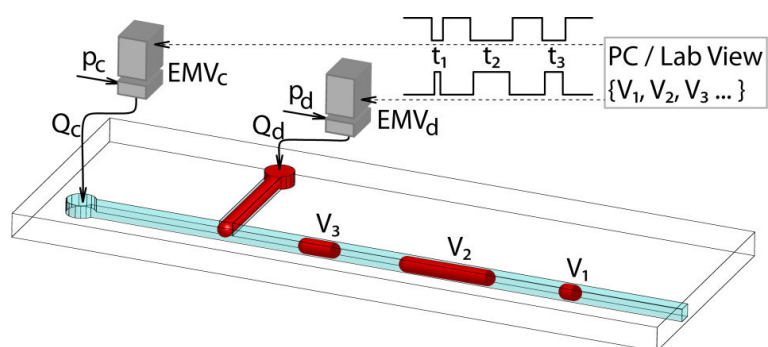
4.2.1.3. Tworzenie kropeł z kontrolą przepływu obydwu faz

Maksymalna objętość kropli tworzonych 'na żądanie' kontrolując przepływ jedynie fazy rozpraszanej jest naturalnie ograniczona i jest proporcjonalna do stosunku natężeń przepływów fazy rozpraszanej do fazy rozpraszającej. Jeśli czas otwarcia zaworu przekracza czas urwania kropli wynikający z tego stosunku (w wykonanym przez nas eksperymencie czas urwania był równy 60 ms), język fazy rozpraszanej rozrywany jest na dwie lub więcej kropeł (Rys. 13). Objętość pierwszej kropli jest stała, a objętość kropli drugiej rośnie liniowo z czasem. Wraz z dalszym wydłużaniem czasu otwarcia zaworu druga generowana kropla osiąga objętość pierwszej i urywana jest trzecia kropla. Najczęściej maksymalna objętość kropli stanowi 2 - 3 objętości kropli minimalnej.



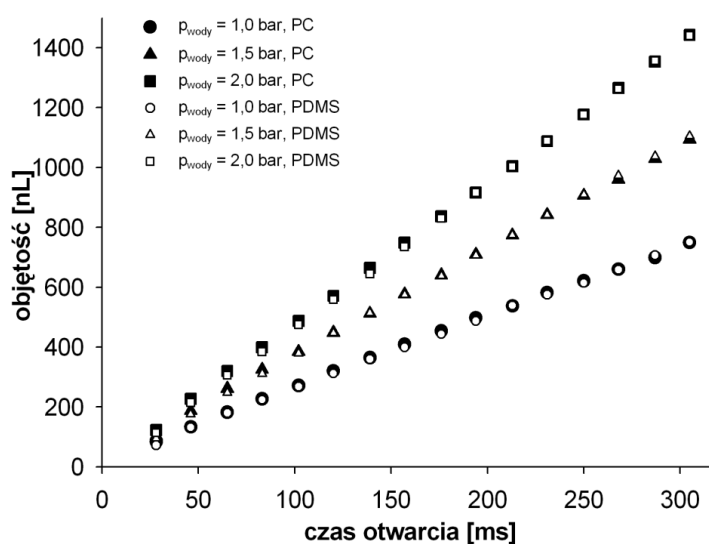
Rys. 13 Zależności objętości kropli tworzonych z kontrolą tylko fazy rozpraszanej oraz z kontrolą obydwu faz.

Ograniczenie to ominęliśmy stosując protokół, w którym przepływ fazy rozpraszającej zamykaliśmy na czas wysuwania się języka fazy rozpraszanej (Rys. 14). Uniezależniliśmy w ten sposób objętość tworzonej kropli od natężenia przepływu fazy rozpraszającej (Rys. 13), którego zmiana jedynie proporcjonalnie zmienia szybkość wypływania utworzonych kropli ze złącza. Ograniczenie na maksymalną objętość tworzonej kropli związane jest tylko z geometrią używanego układu mikroprzepływowego. W układzie, w którym zademonstrowaliśmy tworzenie kropli 'na żądanie' z kontrolą przepływu obydwu faz, generowaliśmy krople o 14-krotnej rozpiętości objętości dla czasów otwarcia zaworu z zakresu 25 ms - 300 ms (Rys. 13).



Rys. 14 Schemat układu do tworzenia kropli 'na żądanie' z kontrolą przepływu obydwu faz.

Ponadto, niezależnie od tego, czy układ mikroprzepływowy był wykonany w poliwęglanie – sztywnym polimerze, czy w polidimetylosiloksanie – elastomerze, dla tych samych ciśnień fazy rozpraszanej oraz czasów otwarcia zaworów generowane krople miały identyczną objętość (Rys. 15). Uniezależnienie charakterystyk tworzenia kropli od właściwości mechanicznych materiałów, z których są wykonane układy, a także od ich właściwości fizykochemicznych, takich jak współczynnik zwilżania, wynika z faktu, że główny opór pomiędzy zaworem a miejscem tworzenia się kropli jest po stronie kapilary. Różnice pomiędzy oporami układów wykonanych z różnych materiałów wynikające np. z różnego współczynnika zwilżania ścian są znikomo małe w porównaniu z oporem kapilary.

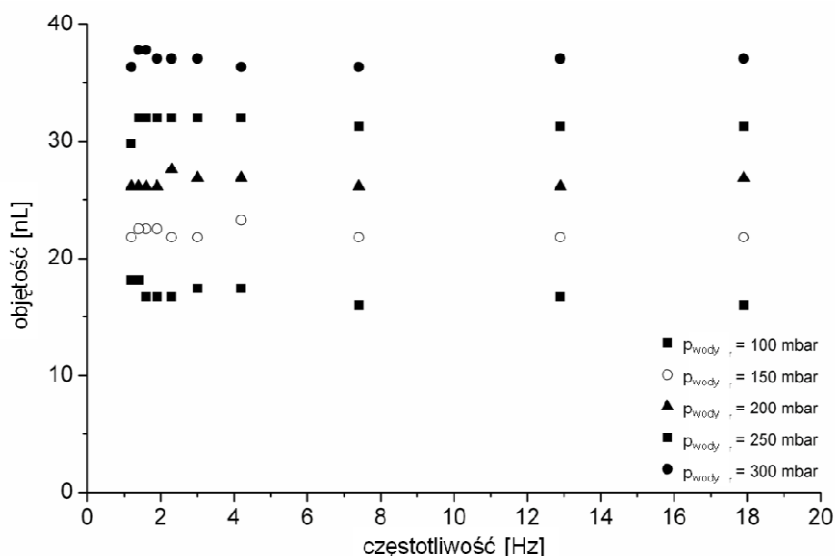


Rys. 15 Zależności objętości kropli od czasu otwarcia zaworu tworzonych w układach mikroprzepływowych wykonanych w poliwęglanie i polidimetylosiloksanie.

Kontrola przepływu obydwu faz była możliwa dzięki odporności materiałów użytych do budowy zaworu na działanie wykorzystywanych cieczy. Publikowane do tej pory zawory mikroprzepływowe są najczęściej w całości bądź częściowo zbudowane z popularnego w mikrofluidyce, lecz pęczniejącego w obecności olejów, polidimetylosiloksanu ^{55, 56}, co uniemożliwia wykorzystanie ich do realizacji opisanego protokołu tworzenia kropli.

Najkrótszy rzeczywisty czas otwarcia zaworu jest równy 28 ms (szczegóły w rozdziale 4.2.1.4), stąd jego maksymalna częstość pracy równa się 35,7 Hz. Ponieważ

tworzenie kropeł 'na żądanie' z kontrolą obydwu faz wymaga użycia dwóch zaworów, maksymalna częstość generowania kropeł jest równa 17,85 Hz. Rys. 16 pokazuje, że objętość generowanych kropeł nie zależy od częstości ich tworzenia w całym możliwym do uzyskania zakresie częstości, co miało miejsce m.in. w przypadku stosowania do kontroli przepływu cieczy opisanego wyżej zaworu membranowego.

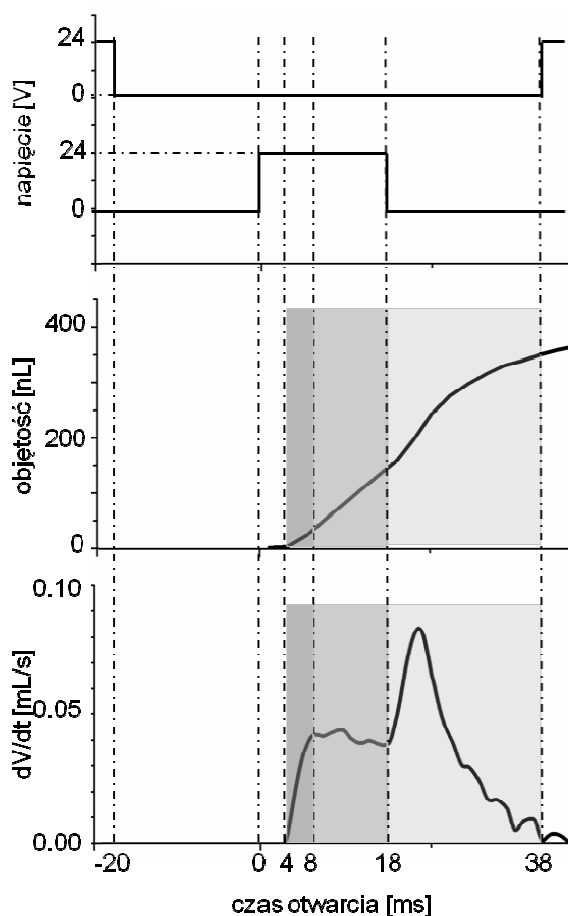


Rys. 16 Zależności objętości tworzonych kropeł od częstości ich tworzenia przy kontroli ruchu cieczy zaworami solenoidowymi.

4.2.1.4. Opis pracy zaworu

Szczegółowe zbadanie pracy zaworu wymagało sprawdzenia, jak objętość tworzonej kropli zmienia się w trakcie jej tworzenia dla stałej długości kapilary oporowej dla pięciu ciśnień fazy kropelkowej (wody). Generowaliśmy krople z częstością 0,5 Hz według protokołu, w którym zaworami kontrolowany był przepływ obydwu faz. Zawór kontrolujący przepływ wody otwieraliśmy podając napięcie równe 24 V przez czas 18 ms. Proces tworzenia się kropeł rejestrowaliśmy przy użyciu szybkiej kamery (Photron, FastCam 100k, USA) umieszczonej na stereoskopie (Nikon SMZ 1500, Japonia). Znajdująca się przy złączu dioda (jej świecenie) informowała o napięciu podawanym na cewkę zaworu. Pozwoliło to

nam skorelować obserwowane zachowanie się cieczy w złączu wartością napięcia sterującego zaworem.

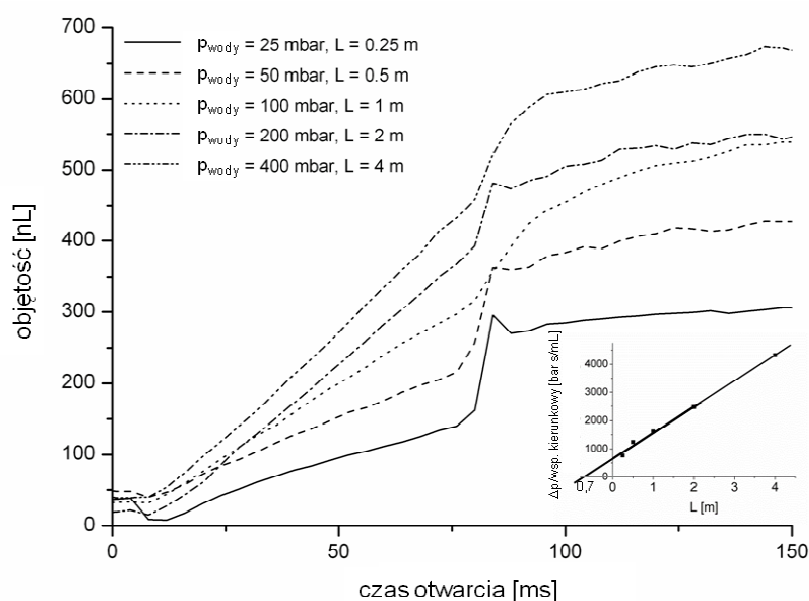


Rys. 17 Objętość oraz szybkość zmian tworzonej kropli w zależności od wartości napięcia sterującego zaworem oraz czasu otwarcia.

Rys. 17 pokazuje zależność pomiędzy wartością sygnału elektrycznego (0 V - 24 V) kontrolującego stan zaworu (zamknięty – otwarty), objętością tworzonej kropli oraz szybkością zmian tej objętości. Od momentu przyłożenia napięcia 24 V do cewki potrzebuje ona 4 ms na rozszczelnienie zaworu. Po kolejnych 4 ms zawór jest w pełni otwarty. Następnie przez okres, w którym do cewki przyłożone jest napięcie, przepływ przez zawór jest stały i objętość kropli rośnie liniowo. W momencie odłączenia napięcia sterującego od cewki następuje gwałtowny wzrost objętości kropli na skutek wypychania cieczy z komory zaworu przez opadający trzpień. Następnie szybkość tworzenia się kropli maleje asymptotycznie do zera. Z powyższej charakterystyki wynika, że najkrótszym rzeczywistym

czasem otwarcia zaworu są 28 ms, traktując czas otwarcia, jako okres od rozpoczęcia rozszczelniania zaworu do momentu jego całkowitego zamknięcia.

W celu zoptymalizowania wartości oporu zmieniającego oryginalny stosunek oporów wlotu i wylotu zaworu elektromagnetycznego V165 tworzyliśmy krople dla pięciu różnych długości kapilary. Chcąc mieć dla wszystkich długości takie samo natężenie przepływu dobieraliśmy ciśnienie fazy rozpraszanej tak, aby spełniony był warunek $dp L^{-1} = 0,1 \text{ bar m}^{-1}$. Relacja ta jest modyfikacją prawa Hagen-Poiseuille $Q = dp R^{-1}$ mówiącego, że natężenie przepływu płynu przez przewód jest proporcjonalne do różnicy ciśnień pomiędzy jego wlotem i wylotem oraz odwrotnie proporcjonalne do jego oporu. Zastępując w tym prawie opór przewodu przez jego długość, do której opór ten jest proporcjonalny, otrzymaliśmy warunek na stałość natężenia przepływu przez dukt.

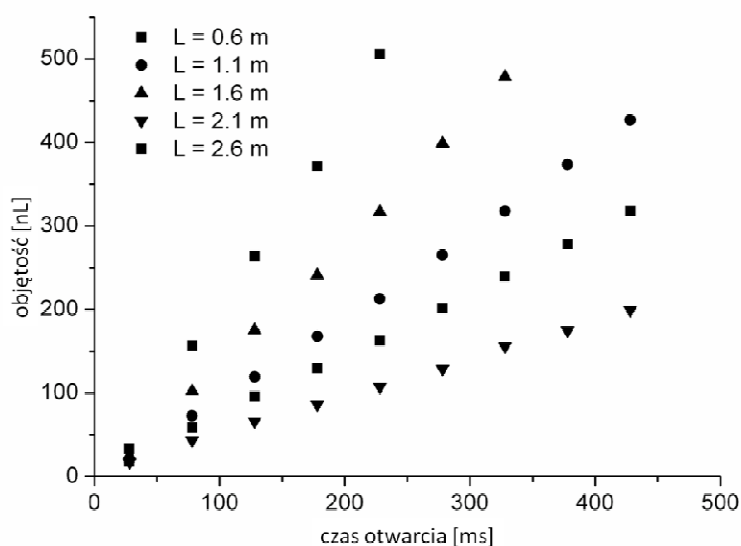


Rys. 18 Objętości pojedynczych kropli w trakcie ich tworzenia dla pięciu różnych kombinacji ciśnienia fazy rozpraszanej i długości kapilary odporowej oraz graficzne wyznaczenie oporu mikroukładu.

Objętość tworzonej kropli rosła wraz z długością kapilary (Rys. 18). Działo się tak dlatego, że w warunkach $dp L^{-1} = 0,1 \text{ bar m}^{-1}$ wzięliśmy pod uwagę jedynie opór kapilary, pomijając opór układu mikroprzepływowego. Aby go wyznaczyć, założyliśmy, że opór systemu zawór-układ mikroprzepływowy jest sumą oporu układu mikroprzepływowego R_0 ,

który jest wartością stałą oraz oporu kapilary $R_{kapilary}$ (L), który zależy liniowo od jej długości. Natężenie przepływu przez w pełni otwarty zawór jest proporcjonalne do współczynnika kierunkowego liniowego fragmentu zależności objętości kropli od czasu tworzenia (Rys. 18). Podstawiając tę zależność do prawa Hagen-Poiseuille po przekształceniu równania otrzymaliśmy zależność ($L_{kapilary} = dp \text{ wsp.kierunkowy}^{-1}$), która pozwoliła na graficzne wyznaczenie oporu układu wyrażonego w długości używanej kapilary (Rys. 18). Opór ten jest równy oporowi kapilary o długości 0,7 m, co można uznać za średni opór prostego układu mikroprzepływowego.

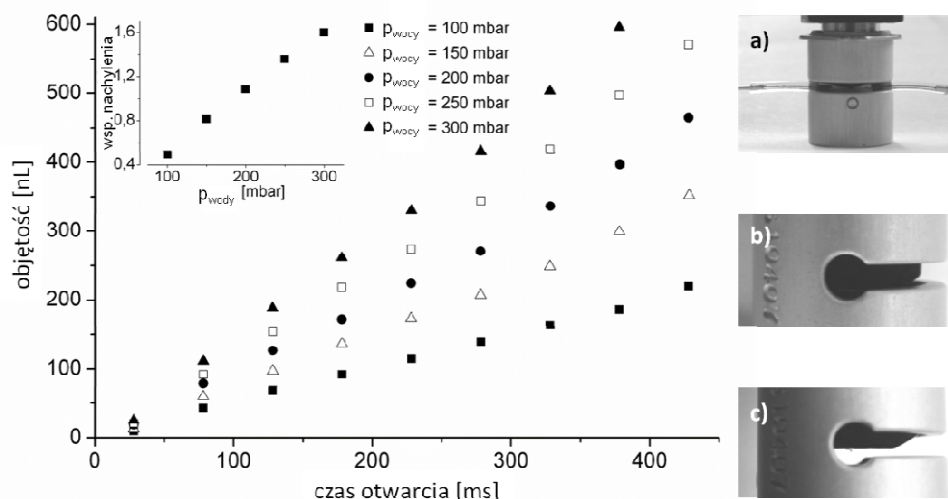
Stosowanie długich kapilar uniezależnia charakterystyki tworzenia kropeł od fluktuacji ciśnienia w układzie mikroprzepływowym, które mogą być powodowane m.in. zmienną w czasie ilością i objętością kropeł przebywających w układzie. Z drugiej strony dla dłuższych kapilar objętość kropli rośnie wolniej z czasem otwarcia zaworu (Rys. 19), co zmniejsza częstotliwość pracy układu, a przez to jego wydajność. Eksperymentalnie dobrana minimalna dostateczna długość kapilary eliminująca wpływ fluktuacji ciśnienia równa się 2 m (dla wody i cieczy o lepkości zbliżonej do lepkości wody).



Rys. 19 Zależności objętości kropeł od czasu otwarcia zaworu dla pięciu różnych długości kapilar oporowych.

4.2.2. Zawór zaciskowy

Zawór zaciskowy jest kolejnym skonstruowanym przez nas zaworem. Dzięki swojej budowie jest on bardzo łatwy w montażu, a kontrolowany przy jego użyciu płyn nie ma z nim bezpośredniego kontaktu. Podobnie, jak w zaworze kapilarowym, jego konstrukcja oparta jest o komercyjnie dostępne rozwiązanie (S104, Sirai, Włochy) (Rys. 20). Działanie zaworu polega na ścisaniu elastycznego wężyka ruchomym elementem, którego zakończenie otoczone jest cewką elektromagnetyczną. Pozycja tego elementu (górną-dół) kontrolowana jest przykładaniem do cewki napięciem.

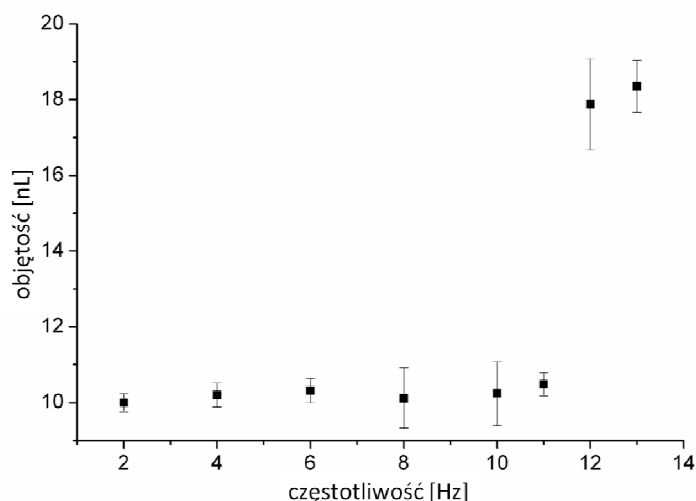


Rys. 20 Zależności objętości kropli od czasu otwarcia zaworu przy kontroli zaworem zaciskowym przepływu fazy rozpraszanej oraz zależność współczynnika nachylenia tych zależności od ciśnienia wody, (a) widok zaworu ściskającego elastyczny wężyk, (b) widok zaworu z boku po odłączeniu napięcia oraz (c) widok zaworu z boku po podłączeniu napięcia.

Wprowadzona przez nas modyfikacja oryginalnego rozwiązania polega na zastosowaniu innego wężyka niż ten proponowany przez producenta. Wykorzystaliśmy wężyk o średnicy wewnętrznej 250 μm i takiej samej grubości ścianki wykonany z elastycznego i mechanicznie wytrzymałego materiału (Tygon®). Zminimalizowanie przekroju poprzecznego przewodu w stosunku do tego proponowanego przez producenta (760 μm) pozwoliło na i) istotne zmniejszenie objętości martwej zaworu do ok. 5 nL,

ii) kontrolowanie małych objętości cieczy oraz iii) łatwą integrację z kapilarami stosowanymi przez nas do doprowadzania cieczy do mikroukładów. Jako że średnica wewnętrzna użytego wężyka jest zbliżona do średnicy wewnętrznej kapilar ($205\ \mu\text{m}$), w miejscu łączenia wężyka z kapilarą nie następuje drastyczna, a przez to niekorzystna zmiana warunków hydrodynamicznych.

Opisywany zawór z powodzeniem użyliśmy do mikroprzepływowego tworzenia kropeł 'na żądanie'. Objętość generowanych z jego użyciem kropeł i) jest proporcjonalna do czasu otwarcia zaworu (Rys. 20) i ii) do ciśnienia fazy rozpraszanej dla stałego ciśnienia fazy rozpraszającej oraz iii) nie zależy od częstości ich tworzenia w zakresie do 6 Hz (Rys. 21).



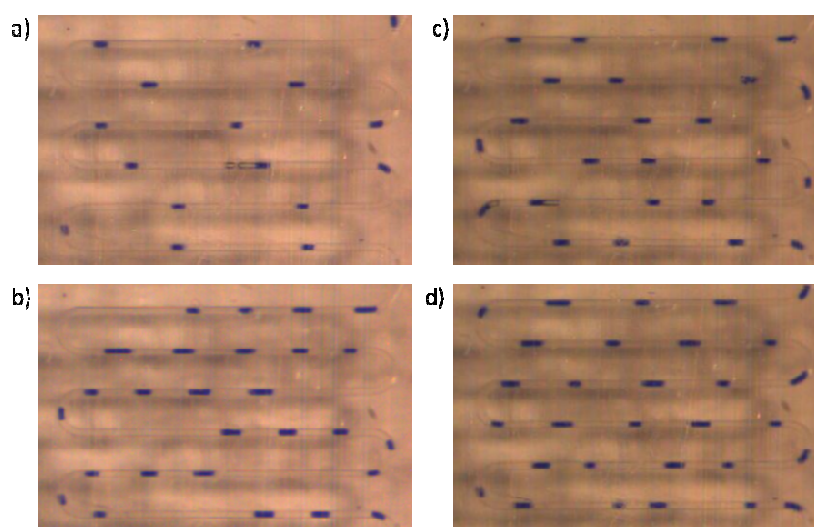
Rys. 21 Zależność objętości kropeł tworzonych przy użyciu zawory zaciskowego od częstości ich generowania.

Mankamentem tego rozwiązania jest konieczność usuwania wężyka z zaworu bądź wymiany na nowy, jeśli przez dłuższy czas (np. 1 dzień) zawór nie jest używany. Wężyk pozostający w zaworze odkształca się stale w miejscu ściśnięcia, co zwiększa jego opór hydrauliczny i w efekcie zmienia charakterystykę tworzenia kropeł.

4.3. Tworzenie kropeł z próbek o małych objętościach

Mała objętość wewnętrzna układów mikroprzepływowych jest niejednokrotnie utożsamiana z niską konsumpcją reagentów. W tych szacunkach nie są jednak brane pod uwagę objętości, którymi należy wypełnić elementy doprowadzające ciecze do chipów, m.in. strzykawki, zawory, wężyki czy zbiorniki ciśnieniowe. Stąd potrzeba rozwiązania i) pozwalającego na użycie próbek o objętościach niewiele większych, niż te rzeczywiście potrzebne oraz ii) minimalizującego ilość elementów układu, z którymi próbka ma kontakt.

4.3.1. Tworzenie kropeł przez zasysanie próbek



Rys. 22 Sekwencje kropeł wygenerowanych z zasysanej próbki (a) o jednakowych objętościach w równych odstępach, (b) o liniowo rosnących objętościach kolejnych kropeł, (c) o jednakowych objętościach w dwóch różnych odstępach oraz (d) o dwóch różnych objętościach w dwóch różnych odstępach.

W opisanym wcześniej układzie mikroprzepływowym do tworzenia kropeł 'na żądanie' z membranowym zaworem pneumatycznym wywoływaliśmy ruch cieczy przykładając podciśnienie do jego wylotu. W ten sposób tworzyliśmy mikrokrople zasysając

kroplę naniesioną na otwór wlotowy kanału fazy rozpraszanej. Pozwoliło to nam na generowanie sekwencji kropeł z próbek o małych objętościach (Rys. 22).

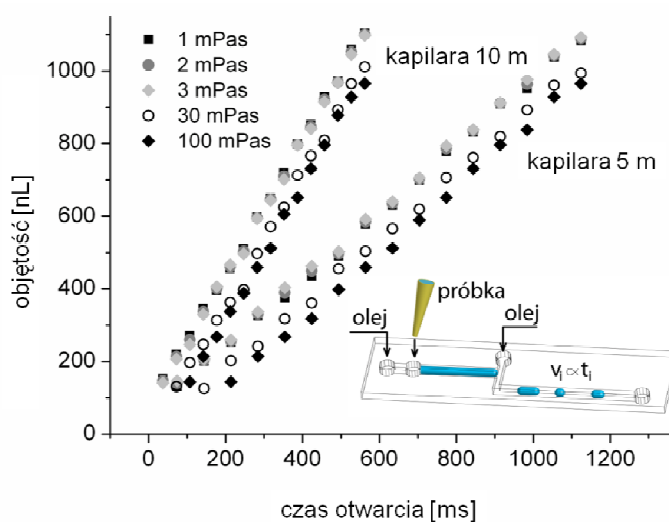
4.3.2. Moduł do deponowania próbek na chipie

4.3.2.1. Budowa i sposób działania

Innym rozwiązaniem umożliwiającym tworzenie kropeł z małych objętości jest opracowany przez nas moduł do deponowania próbek na chipie. Składa się on z kanału fazy rozpraszanej o znacznie zwiększonej objętości w stosunku do rozwiązań klasycznych zwężającego się przed złączem, posiadającego dodatkowy wlot. (Rys. 23). Kształt tego dodatkowego wlotu jest dopasowany do kształtu tipsa pipety laboratoryjnej. Dzięki temu można przy użyciu standardowego urządzenia laboratoryjnego deponować próbki na chipie. Wlot ten zamykany jest przy użyciu uszczelki typu *o-ring*, która jest dociskana mechanicznie elementem systemu ThorLabs. Podczas deponowania próbki należy uważać, by przy uszczelce nie został pęcherz powietrza, ponieważ jego obecność zakłóca stabilność tworzenia się kropeł. Zdeponowana próbka jest pchana przez ten sam olej, który stanowi fazę rozpraszającą. Dzięki temu w zaworach znajduje się tylko jednego rodzaju cieczy. Pozwala to na wykorzystanie tego samego systemu zaworowego do dozowania różnych substancji, w różnych chipach, bez konieczności rozbierania i mycia zaworów.

W układzie newralgicznym okazało się miejsce zwężania się kanału magazynującego do szerokości i wysokości kanału fazy rozpraszającej. Jeśli zwężanie i wypływanie następowało na zbyt krótkiej długości, to pojawiające się napięcie powierzchniowe na kropli w miejscu zwężenia rozrywało ją na dwie mniejsze. Stąd zwężanie powinno następować na możliwie długim odcinku. Nie tylko z powyższego powodu, ale także dlatego, że ciśnienie Laplace'a działające na kroplę w zwężającym się kanale zasysa ją w stronę rezerwuaru, w

rezultacie odciągając jej czoło od miejsca łączenia się kanałów w złączu. Od ustawienia czoła fazy rozpraszanej w złączu zależy objętość pierwszej bądź kilku pierwszych wygenerowanych kropeł. Odsuwanie się czoła od miejsca łączenia się kanałów będzie wpływać na wcześniej wyznaczoną charakterystykę tworzenia się kropeł (zależność objętości kropli od czasu otwarcia zaworu). W skonstruowanym układzie kanał zwęża się i wypłyca na długości 4 cm, co daje średni stosunek zmiany wymiaru liniowego kanału na długości równy 0,01. Jest on wystarczający do redukcji wpływu ciśnienia Laplace'a na pozycję czoła zdeponowanej próbki.



Rys. 23 Zależności objętości tworzonych kropeł od czasu otwarcia zaworu dla cieczy o pięciu różnych lepkościach i kapilar oporowych o dwóch różnych długościach uzyskane przy użyciu schematycznie przedstawionego modułu do deponowania próbek na chipie.

4.3.2.2. Tworzenie kropeł z cieczy o różnych lepkościach

Charakterystyka tworzenia kropeł bardzo silnie zależy od lepkości cieczy rozpraszanej. Praktycznie niemożliwe jest zautomatyzowanie pracy układu, do którego próbki o znacząco różnych lepkościach dostarczane są z pojemników ciśnieniowych. W takim przypadku chcąc generować krople z cieczy różniących się np. 100-krotnie lepkością należałoby przykładać do nich 100-krotnie różniące się ciśnienia. Opisany wyżej moduł do

deponowania próbek na chipie umożliwia tworzenie kropelek z cieczy różniących się nawet 100-krotnie lepkością generując ich ruch tym samym ciśnieniem (Rys. 23).

Opór układu z rezerwuarem do deponowania próbek $R_{układu}$ można przybliżyć, jako

$$R_{układu} \sim \frac{\delta\mu_{próbkki} L_{rezerwuaru}}{\pi r_{rezerwuaru}^4} + \frac{\delta\mu_{oleju} L_{oleju}}{\pi r_{oleju}^4}$$

gdzie

$\mu_{próbkki}$ – dynamiczna lepkość próbki,

$L_{rezerwuaru}$ – długość rezerwuaru do deponowania próbek,

$r_{rezerwuaru}$ – wymiar liniowy rezerwuaru.

Opór kapilary $R_{kapilary}$ wypełnionej olejem można przybliżyć, jako

$$R_{kapilary} \sim \frac{\delta\mu_{oleju} L_{kapilary}}{\pi r_{kapilary}^4}$$

gdzie

μ_{oleju} – dynamiczna lepkość oleju,

$L_{kapilary}$ – długość kapilary,

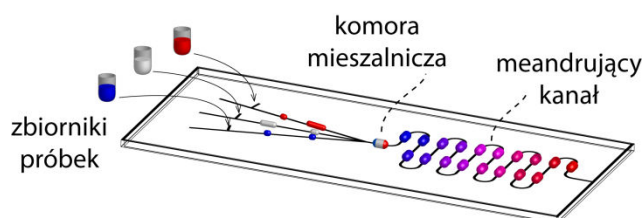
$r_{kapilary}$ – promień wewnętrzny kapilary.

Opór kapilary o średnicy wewnętrznej 205 μm oraz długości 5 m (10 m) wypełnionej heksadekanem ($\mu_{oleju} = 3,0 \pm 0,1 \text{ mPa s}$) wynosi $R_{kapilary} = 3,45 \cdot 10^{14}$ ($6,9 \cdot 10^{14}$) Pa s m^{-1} . Opór układu równy jest $R_{układu} = 4,0 \cdot 10^{11} \text{ Pa s m}^{-3}$ dla $\mu_{próbkki} = 1 \text{ mPa s}$, $R_{układu} = 7,15 \cdot 10^{11} \text{ Pa s m}^{-3}$ dla $\mu_{próbkki} = 3 \text{ mPa s}$ oraz $R_{układu} = 1,6 \cdot 10^{13} \text{ Pa s m}^{-3}$ dla $\mu_{próbkki} = 100 \text{ mPa s}$. Wartości te są znacząco mniejsze od wartości oporu kapilary, stąd szybkość przesuwania zdeponowanej na chipie próbki w znikomym stopniu zależy od jej lepkości.

Jako że małe różnice lepkości (1-3 mPa s) nie mają wpływu na objętość tworzonych kropeł (Rys. 23), szczególnie atrakcyjne może być stosowanie tej techniki w mikrobiologii czy biochemii, w których wykorzystywane próbki mają lepkości właśnie z przedziału 1-3 mPa s. Większe różnice lepkości powodują już zauważalne przesunięcie liniowych zależności objętości tworzonych kropli od czasu otwarcia zaworu. Jednakże zmiana objętości kropli dla danego czasu otwarcia, nawet dla cieczy różniących się 100-krotnie lepkością, jest średnio tylko o rząd wielkości mniejsza niż średnia objętość tworzonych kropeł.

4.4. Układ mikroprzepływowy do wysokowydajnych badań przesiewowych

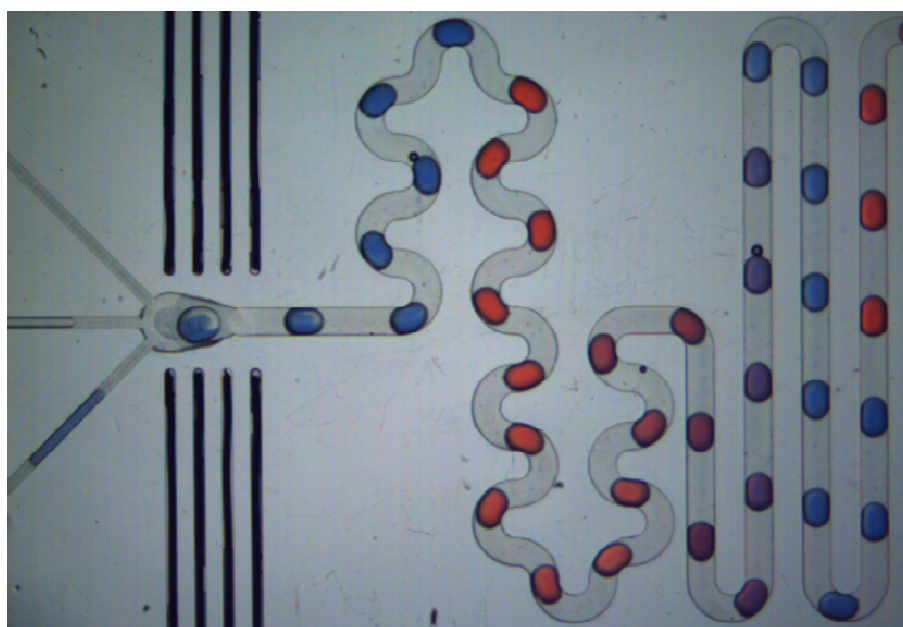
4.4.1. Układ prototypowy



Rys. 24 Schemat prototypowego układu mikroprzepływowego do wysokowydajnych badań przesiewowych.

Prototyp układu mikroprzepływowego do wysokowydajnych badań przesiewowych składa się z trzech równolegle połączonych złączy "T" o przekroju poprzecznym $400\ \mu\text{m} \times 400\ \mu\text{m}$, których kanały wylotowe schodzą się promieniście do komory mieszalniczej. Za nią znajduje się meandrujący kanał o przekroju $1\ \text{mm} \times 1\ \text{mm}$ intensyfikujący mieszanie zawartości kropli. (Rys. 24). W złączach z roztworów trzech różnych substancji tworzyliśmy krople 'na żądanie' z kontrolą przepływu obydwu faz przy

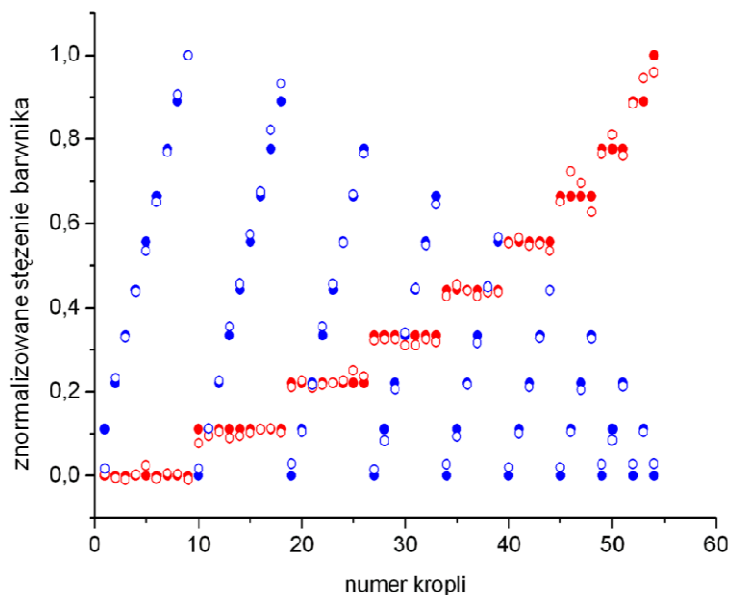
użyciu zmodyfikowanych przez nas kapilarowych zaworów solenoidowych. Suma objętości kropli tworzonych jednocześnie w trzech złączach była stała. Dzięki temu objętość kropli-matki była zawsze stała, co zapobiegało doganianiu i łączeniu się kropeł, jako że szybkość przepływu kropli w mikrokanalach zależy od jej objętości. Tworzenie kropeł rozpoczynaliśmy się w tym samym momencie we wszystkich złączach, dlatego w każdym z nich końce utworzonych kropeł były w takiej samej odległości od komory mieszalniczej. Łączenie kropeł w kroplę-matkę indukowaliśmy zmiennym polem elektrycznym (1 kHz, 500 V) ⁵⁷⁻⁶⁰ przykładanym do 8 elektrod otaczających komorę mieszalniczą.



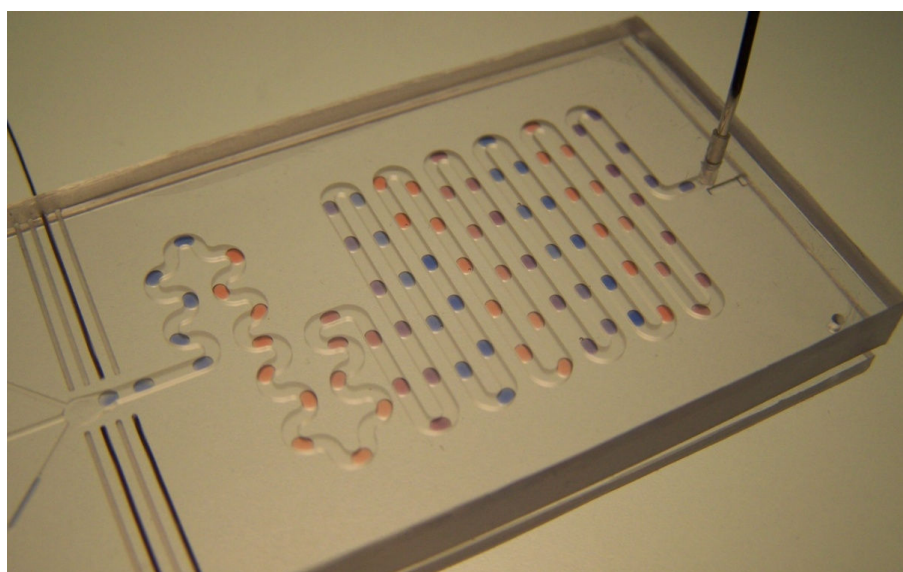
Rys. 25 Zdjęcie wygenerowanej sekwencji wielokolorowych kropeł w mikrokanale zrobione szybką kamerą.

Działanie układu przetestowaliśmy generując sekwencję kropeł z wodnych roztworów atramentów (niebieskiego i czerwonego) oraz czystej wody (Rys. 25, Rys. 27). Tłoczone były one ciśnieniowo z rezerwuarów znajdujących się poza układem mikroprzepływowym przepływając również przez zawór. W pierwszym eksperymencie w 41 sekund wygenerowaliśmy sekwencję 110 kropeł przemiatającą wszystkie możliwe stężenia dwóch użytych atramentów – zakres stężenia 0-100% każdego z nich w 9 równych krokach. Krople tworzone z czystej wody dopełniały objętość kropli-matki do stałej wartości

równej 1,5 μL . Rys. 26 pokazuje otrzymaną przez nas wysoką korelację pomiędzy predefiniowanymi (oczekiwanymi) oraz otrzymanymi stężeniami atramentów w wytworzonych kropkach. Stężenia były wyznaczone analizując sygnał RGB zarejestrowany szybką kamerą (Photron, FastCam 100k, USA).

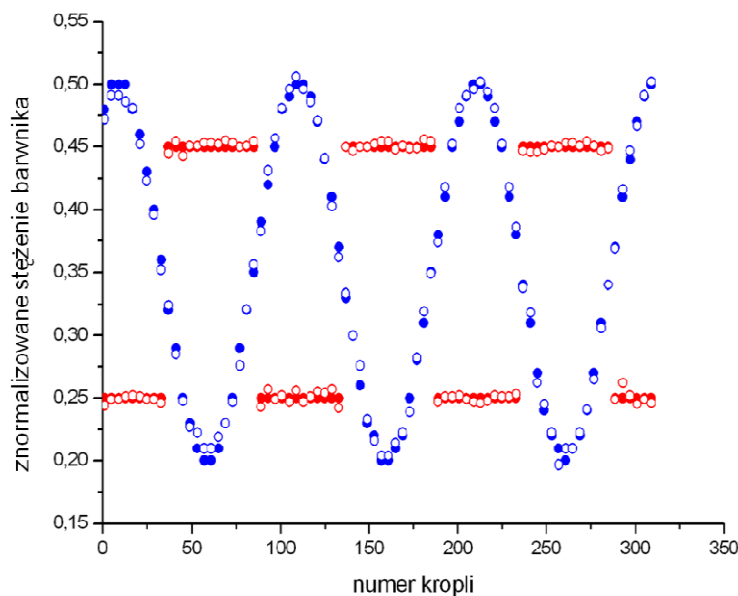


Rys. 26 Znormalizowane stężenie barwników w kropkach wygenerowanych w układzie prototypowym – kropki pełne oznaczają wartości predefiniowane w protokole, kropki puste wartości otrzymane. Kolory kropek odpowiadają barwie użytych atramentów.



Rys. 27 Zdjęcie prototypowego układu mikroprzepływowego z sekwencją wielokolorowych kropek w jego kanale.

Układ prototypowy użyliśmy następnie do wygenerowania sekwencji, w której stężenie jednego z atramentów zmieniało się w sposób ciągły, a drugiego skokowo (Rys. 28). Zademonstrowaliśmy w ten sposób, że w kolejnych kroplach sekwencji tworzonych w skonstruowanym przez nas układzie stężenia substancji mogą zmieniać się w dowolny, niezależny od siebie sposób.

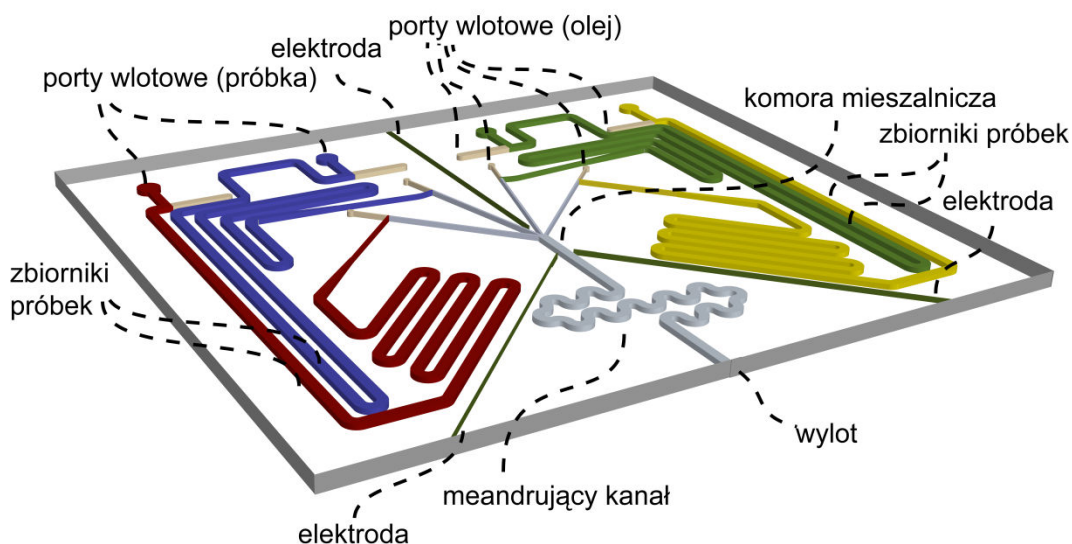


Rys. 28 Znormalizowane stężenie barwników w kroplach – kropki pełne oznaczają wartości predefiniowane w protokole, a kropki puste wartości otrzymane. Kolory kropek odpowiadają barwie użytych atramentów.

4.4.2. Układ do badań przesiewowych

Do wysokowydajnych mikrobiologicznych badań przesiewowych wykorzystaliśmy rozbudowany układ mikroprzepływowy, który posiadał cztery równoległe połączone złącza 'T' o przekroju poprzecznym kanałów $400\ \mu\text{m} \times 400\ \mu\text{m}$ (Rys. 29). Próbkę, z których tworzone były krople, deponowaliśmy w rezerwuarach będących kanałami o przekroju poprzecznym $1\ \text{mm} \times 1\ \text{mm}$ zwężających się na dystansie $4\ \text{cm}$ do wymiarów $400\ \mu\text{m} \times 400\ \mu\text{m}$ osiągając je w odległości $1\ \text{cm}$ od złącza. Port wlotowy każdego rezerwuaru miał średnicę równą $1\ \text{mm}$ i był zakończony kołowym wyżłobieniem dopasowanym do uszczelki

typu *o-ring* (średnica wewnętrzna 0,78 mm, średnica zewnętrzna 2,78 mm). Wlot uszczelnialiśmy dociskając uszczelkę cienką płytką poliwęglanową przy użyciu elementu mechanicznego w systemie ThorLabs. Fazę olejową dostarczaliśmy do układu stalowymi kapilarami (średnica wewnętrzna 205 μm , średnica zewnętrzna 400 μm , Mifam, Polska) z pojemników ciśnieniowych. Przepływ kontrolowaliśmy zmodyfikowanymi przez nas kapilarowymi zaworami solenoidowymi. Ciśnienie w zbiornikach regulowaliśmy dwoma szeregowo połączonymi reduktorami (PR1-RGP, G $\frac{1}{4}$, Bosch Rexroth AG, Niemcy). Zawory kontrolujące przepływ fazy rozpraszającej były podłączone do zbiorników ciśnieniowych o ciśnieniu 600 mbar, a kontrolujące przepływ fazy rozpraszanej o ciśnieniu 280 mbar.



Rys. 29 Schemat układu mikroprzepływowego wykorzystanego do wysokowydajnych badań przesiewowych.

Wyloty czterech złączy "T" łączyły się w kanał o wysokości 1,0 mm i szerokości 1,2 mm. Kanał był otoczony trzema elektrodami podłączonymi do generatora prądu zmiennego (2 kV, 100 Hz, Trek Model 609E-6, USA). Oscylacje pola elektrycznego indukowały łączenie się kropeł⁵⁷⁻⁶⁰.

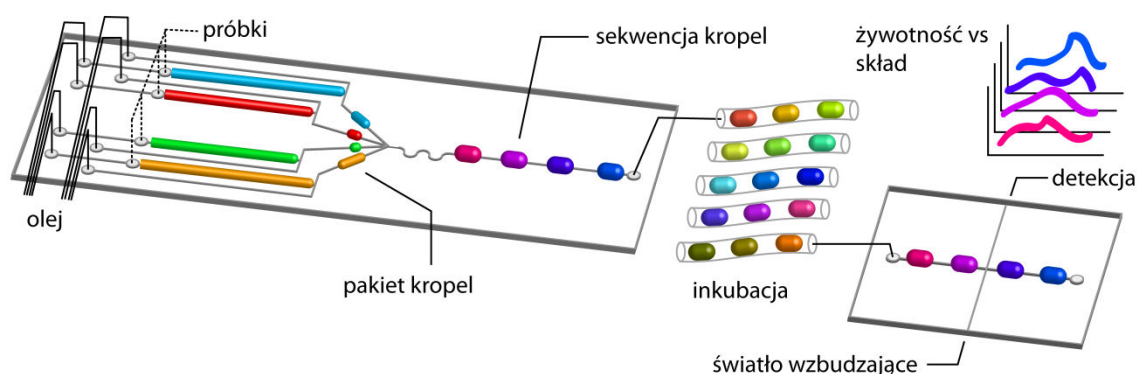
Utworzone krople płynęły do portu wylotowego przez meandrujący kanał ułatwiający mieszanie się ich zawartości. Port wylotowy połączony był z krótkim (10 cm) odcinkiem wężyka polietylenowego PE60 (średnica wewnętrzna 0,76 mm, średnica

zewnętrzna 1,22 mm, Becton Dickinson, USA) z nasuniętym na jego koniec wężkiem polietylenowym PE160 (średnica wewnętrzna 1,2 mm, średnica zewnętrzna 1,58 mm, Becton Dickinson, USA) o długości około 2 cm. Taki kołnierz pozwalał na dołączanie długiego (około 2 m) wężyka polietylenowego PE60, który służył do magazynowania utworzonych kropeł. Z praktycznego punktu widzenia w wężyku można było zmagazynować do 70 kropeł. Opór hydrodynamiczny dłuższych sekwencji zaczynał w zauważalnym stopniu wpływać na proces tworzenia kropeł z złączach układu.

4.4.3. Działanie układu

Rys. 30 przedstawia schemat całego układu. Po zdeponowaniu próbek na chipie, system automatycznie (zgodnie z protokołem) przesuwiał je do złączy "T". Po wpłynięciu małej objętości języka próbki do złącza, system sterujący zatrzymywał jej przepływ i otwierał na kilka sekund przepływ fazy rozpraszającej. Urywana w ten sposób objętość próbki znajdującą się w złączu była następnie wypychana z układu. W efekcie próbka zdeponowana na chipie miała czoło dokładnie w miejscu łączenia się kanałów złącza i była gotowa do tworzenia z niej kropeł 'na żądanie'.

Krople tworzyliśmy korzystając z opisanego wcześniej protokołu opartego na kontroli przepływu obydwu faz. Krople byłyby generowane tak, aby odległość ich końców od komory mieszalniczej, niezależnie od ich objętości, była we wszystkich złączach taka sama. Ponadto, krople były urywane i wypychane do komory mieszalniczej we wszystkich złączach jednocześnie. Miało to wyeliminować prześciganie większych kropeł przez mniejsze skutkujące niełączeniem się ich w jedną kroplę w komorze mieszalniczej. Komora mieszalnicza otoczona była trzema promieniście ułożonymi elektrodami. Przykładane do nich zmienne napięcie elektryczne indukowało łączenie się kropeł⁵⁷⁻⁶⁰.



Rys. 30 Schemat układu do wysokowydajnych badań przesiewowych składającego się z układu mikroprzepływowego, wężyków do inkubacji oraz celki mikroprzepływowej połączonej światłowodami ze źródłem światła i detektorem.

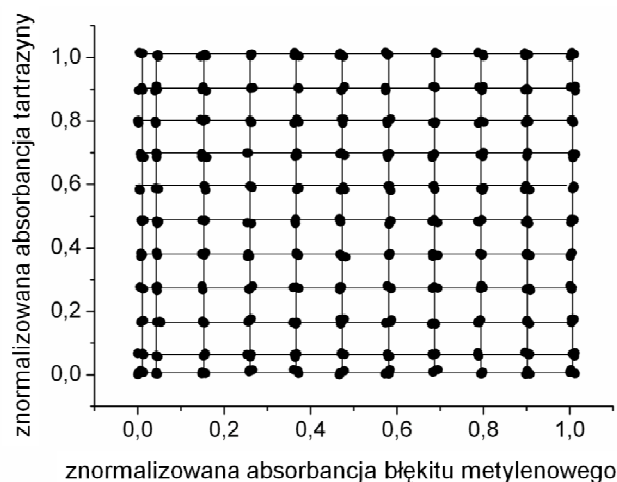
Aby przetestować dokładność odmierzania objętości tworzonych kropeł o predefiniowanym składzie, napełniliśmy rezerwuary trzech złączy "T" wodnym roztworem błękitu metylenowego (10^{-5} M), wodnym roztworem tartrazyny (10^{-5} M) oraz wodą destylowaną. W trzech niezależnych powtórzeniach wygenerowaliśmy sekwencję 121 kropeł, których zawartości w każdej serii tworzyły macierz (11×11) punktów w przestrzeni stężeń tych dwóch barwników. Mierzyliśmy absorbancję błękitu metylenowego ($\lambda = 665$ nm) oraz tartrazyny ($\lambda = 425$ nm) i na podstawie prawa Lamberta-Beera wyznaczaliśmy stężenie barwników w kroplach. Maksymalny względny błąd pomiędzy wartością zmierzoną a zaprogramowaną był mniejszy niż 1 % (Rys. 31). Błąd ten (S) został wyznaczony z zależności

$$S[\%] = \frac{100 \text{ Max} (|c_i^{\text{średnie}} - c_i^{\text{zadane}}|)}{c_i^{\text{zadane}}}$$

gdzie

$c_i^{\text{średnie}}$ – stężenie barwnika w i-tej kropli,

c_i^{zadane} – predefiniowane stężenie barwnika w i-tej kropli.



Rys. 31 Zadane w protokole (węzły siatki) oraz otrzymane wartości stężeń (znormalizowanej absorbcji) tartrazyny oraz błękitu metylenowego w poszczególnych kroplach sekwencji.

4.5. Badanie oddziaływań pomiędzy parami antybiotyków

System przedstawiony na Rys. 30 wykorzystaliśmy do badań toksyczności antybiotyków tworząc sekwencje kropeł przez łączenie krople zawierających komórki bakteryjne *E. coli* ATCC 25992, antybiotyki oraz indykator metabolizmu, a przez to marker żywotności bakterii – rezazurynę.

Rezazuryna, występująca pod nazwą handlową *amalarBlue* (Invitrogen, USA) jest nietoksycznym, niefluoryzującym, związkim niebieskiego koloru przenikającym przez ścianę komórkową bakterii. Żywe komórki redukują znajdującą się w ich komórkach rezazurynę do rezorufiny. Rezorufina jest związkim fluoryzującym silnym jasnym czerwonym światłem. Pomiar jego intensywności pozwala na ilościowe określenie żywotności komórek, przez co również cytotoksyczności badanych związków wobec danej bakterii.

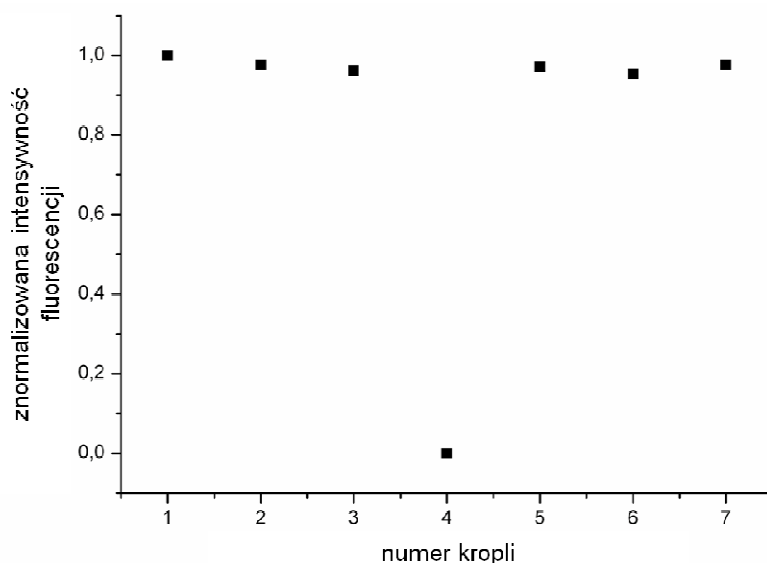
Sposób tworzenia kropeł oraz ich magazynowanie zostało opisane w rozdziale wyżej. Zmagazynowane w wężykach krople inkubowane były w temperaturze 37 °C w inkubatorze powietrznym (Binder BD 23, Niemcy).

Po inkubacji podłączaliśmy jeden z końców wężyka do pompy strzykawkowej (Harvard Apparatus PHD 2000, USA), a drugi do celki mikroprzepływowej połączonej światłowodami ze źródłem światła oraz spektrofotometrem (Ocean Optics, USB 2000+) (Rys. 30). Krople były naświetlane zielonym laserem ($\lambda = 532 \text{ nm}$, 50 mW) na drodze optycznej równej 0,76 nm i mierzona była ich fluorescencja. Natężenie przepływu kropeł przez celkę pomiarowa było równe standardowo 10 mL h^{-1} stąd czas przebywania kropli w świetle lasera był równy 0,8 s. Spektrofotometr mierzył widma fluorescencji z częstotliwością 100 Hz, co umożliwiało nam zbieranie około 80 widm dla każdej kropli, a dzięki temu wiarygodną analizę intensywności fluorescencji rezorufiny w każdej kropli. Intensywność fluorescencji rezorufiny w każdej kropli wyznaczaliśmy uśredniając intensywność fluorescencji 50 środkowych widm dla $\lambda = 580 \text{ nm}$. Odrzucaliśmy widma pochodzące z początków i końców kropli, jako obarczone dużym błędem związanym z rozpraszaniem światła na powierzchniach nieprostopadłych do kierunku wiązki wzbudzającej.

4.5.1. Test intensywności dyfuzji antybiotyków między kroplami

Sprawdziliśmy czy substancje, które miały być wykorzystywane w badaniach oddziaływań między parami antybiotyków, zarówno rezazuryna (lub rezorufina), jak i antybiotyki, nie dyfundują między kroplami sekwencji. Wygenerowaliśmy sekwencję siedmiu kropeł, w której trzy pierwsze i trzy ostatnie zawierały rezazurynę ($44 \mu\text{M}$) i bakterie (ok. $5 \times 10^5 \text{ CFU mL}^{-1}$), a środkowa chloramfenikol oraz tetracyklinę w wysokim stężeniu (odpowiednio 2 mg L^{-1} oraz $0,5 \text{ mg L}^{-1}$) i inkubowaliśmy ją przez 3 godziny w temperaturze $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Następnie zmierzaliśmy intensywność fluorescencji ($\lambda = 580 \text{ nm}$) rezorufiny w kroplach. Zaobserwowaliśmy brak różnic między intensywnością fluorescencji trzech pierwszych i trzech ostatnich kropeł sekwencji (Rys. 32), co oznacza, że nawet jeśli

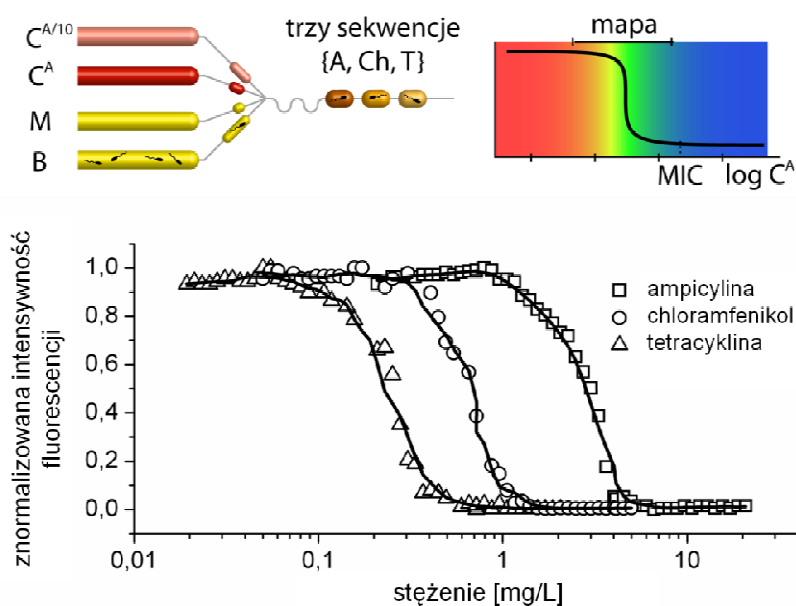
występuje transport używanych substancji chemicznych pomiędzy kroplami, to nie ma on zauważalnego wpływu na odczytywane przez nas wyniki.



Rys. 32 Znormalizowana intensywność fluorescencji rezorufiny w siedmiu kolejno wygenerowanych kroplach – trzech pierwszych i trzech ostatnich zawierających zawiesinę bakterii i środkowej zawierającej mieszaninę antybiotyków o wysokim stężeniu.

4.5.2. Wyznaczanie minimalnego stężenia hamującego

Mikroprzepływowy układ do wysokowydajnych badań przesiewowych użyliśmy do wyznaczenia minimalnego stężenia hamującego (z ang. *Minimal Inhibitory Concentration* – *MIC*) ampicyliny, chloramfenikolu oraz tetracykliny na bakterie *Escherichia coli* ATCC 25992. Rozmieszczenie substancji w rezerwuarach na chipie pokazuje Rys. 33. Zawiesinę bakterii *E. coli* (ok. 7×10^6 CFU mL⁻¹) umieszczaliśmy w kanale B, w kanałach C^{A/10} i C^A roztwory antybiotyków o stężeniach 2,8 i 28 mg L⁻¹ (ampicylina), 0,7 i 7 mg L⁻¹ (chloramfenikol) oraz 0,28 i 2,8 mg L⁻¹ (tetracyklina), natomiast w kanale M medium hodowlane zawierające marker metabolizmu bakterii – roztwór rezazuryny o stężeniu 44 μM.



Rys. 33 Schemat napełnienia zbiorników próbek w eksperymencie, graficzna interpretacja minimalnego stężenia hamującego oraz otrzymane w eksperymencie zależności znormalizowanych wartości intensywności fluorescencji rezorufiny od stężenia trzech antybiotyków.

W układzie tworzyliśmy sekwencje kropeł zawierające: i) stałą objętość zawiesiny bakterii (100 nL), ii) różną objętość (z zakresu 0 – 1,3 μL) roztworów antybiotyków o stężeniu $C^{A/10}$ i C^A oraz iii) różną objętość medium hodowlanego (z zakresu 0 – 1,3 μL) dopełniającą tworzone krople do stałej finalnej objętości równej 1,4 μL (Rys. 33). Sekwencja składała się z 49 kropeł. Stężenie w kolejnych kroplach wzrastało w postępie geometrycznym o ilorazie 1,1. Otrzymaliśmy sekwencje kropeł o stężeniu z przedziału pomiędzy 0,2 - 20 mg L^{-1} dla ampicyliny, 0,05 - 5,0 mg L^{-1} dla chloramfenikolu oraz 0,02 - 2,0 mg L^{-1} dla tetracykliny. Pierwsza kropla sekwencji składała się z zawiesiny bakterii (100 nL) oraz 1,3 μL medium hodowlanego. Aby otrzymać żądaną geometryczną zmianę stężenia w sekwencji najpierw krople tworzone w kanale $C^{A/10}$ zwiększały swoją objętość od 0 μL do 1,3 μL , a w kanale M zmniejszały od 1,3 μL do 0 μL przy wyłączonym kanale C^A . Następnie przy wyłączonym kanale $C^{A/10}$ krople w kanale C^A zwiększały swoją objętość od 0 μL do 1,3 μL przy ponownie malejącej od 1,3 μL do 0 μL objętości kropeł medium hodowlanego.

Zdeponowanie próbek na płytce oraz przygotowanie ich do generowania z nich kropeł zajmowało około 5 minut. Sekwencja była tworzona w czasie około 100 s. Po

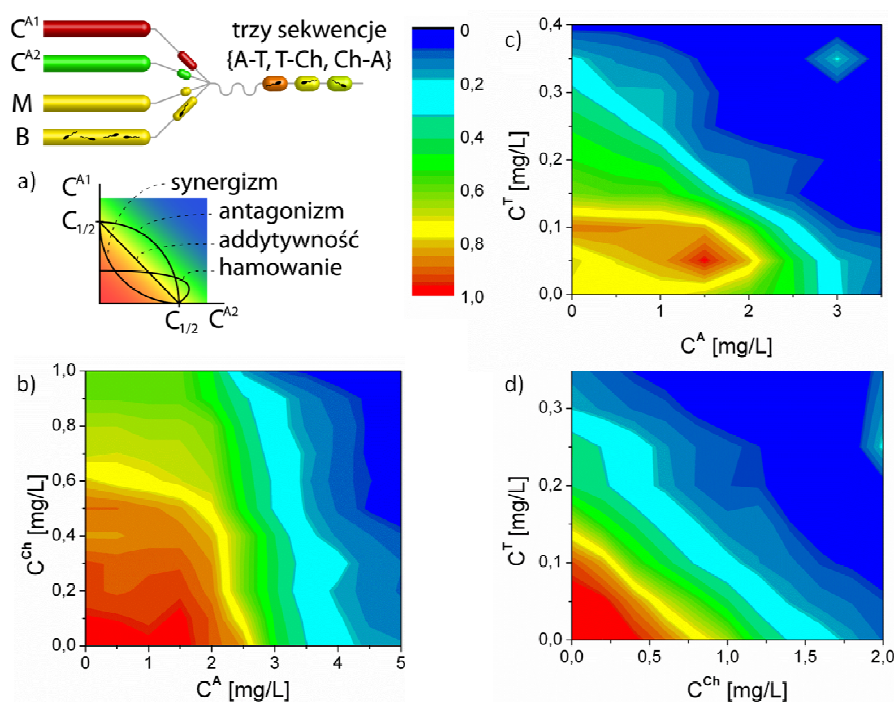
3 godzinach inkubacji mierzyliśmy w każdej kropli intensywność fluorescencji rezorufiny, a następnie normalizowaliśmy ją do najwyższej zmierzonej wartości. Rys. 33 pokazuje znormalizowaną intensywność fluorescencji w funkcji stężenia oraz rodzaju antybiotyku. Z tych danych wyznaczyliśmy wartości minimalnego stężenia hamującego dla ampicyliny – 5,0 mg L⁻¹, chloramfenikolu – 1,8 mg L⁻¹ oraz tetracykliny – 0,6 mg L⁻¹.

W celu uwiarygodnienia uzyskanych wyników zmierzaliśmy cytotoksyczność ampicyliny, chloramfenikolu oraz tetracykliny (w przedziale stężeń od 0,006 do 32 mg L⁻¹) wobec bakterii *E. coli* ATCC 25992 używając klasycznej metody mikrobiologicznej (metody seryjnych rozcieńczeń⁴⁾). Każdy pomiar wykonaliśmy w dwóch powtórzeniach i otrzymaliśmy następujące wartości minimalnego stężenia hamującego: 4,0 mg L⁻¹ dla ampicyliny, 4,0 mg L⁻¹ dla chloramfenikolu oraz 0,5 mg L⁻¹ dla tetracykliny. Wartości wyznaczone w systemie mikroprzepływowym doskonale zgadzają się z tymi wartościami oraz z wartościami literaturowymi (odpowiednio: 4,0 mg L⁻¹⁶¹, 4,0 mg L⁻¹⁶¹, 0,5 mg L⁻¹⁶²).

4.5.3. Wyznaczanie typów oddziaływań między parami antybiotyków

Wyznaczone w poprzednim eksperymencie wartości minimalnego stężenia hamującego wykorzystaliśmy do wybrania zakresów stężeń, w których badaliśmy oddziaływania pomiędzy parami trzech antybiotyków. Zakresy te wynosiły odpowiednio: 0 – 5,0 mg L⁻¹ z krokiem 0,5 mg L⁻¹ dla ampicyliny, 0 – 2,0 mg L⁻¹ z krokiem 0,2 mg L⁻¹ dla chloramfenikolu oraz 0 – 0,5 mg L⁻¹ z krokiem 0,05 mg L⁻¹ dla tetracykliny. Kanał B wykorzystaliśmy do generowania kropeł bakterii (100 nL), kanał C^{A1} i C^{A2} do tworzenia kropeł (100 nL – 1 µL) roztworów dwóch antybiotyków, a kanał M do generowania kropeł medium hodowlanego (Rys. 34). Krople te łączone były w krople o objętości 2,1 µL, przetłaczane do wężyków polietylenowych i inkubowane. System zaprogramowaliśmy do

tworzenia sekwencji 121 kropeł pokrywających macierz (11 x 11) rozpiętą w przestrzeni stężeń dwóch antybiotyków. Układ tworzył krople z częstością 0,5 Hz. Czas potrzebny na wygenerowanie sekwencji kropeł i przetransportowanie jej do wężyków polietylenowych wynosił 4 min. Po 3 godzinach inkubacji mierzyliśmy intensywność fluorescencji rezorufiny w kroplach w celce mikroprzepływowej połączonej światłowodami ze spektrofotometrem oraz źródłem światła.



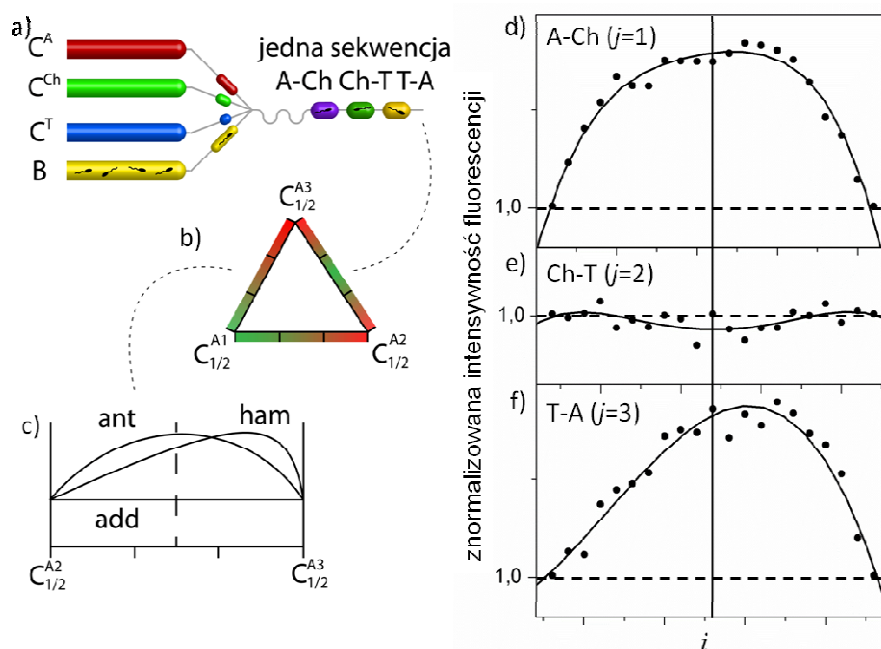
Rys. 34 (a) Schemat napełnienia zbiorników próbek w eksperymencie oraz mapy intensywności fluorescencji rezorufiny w przestrzeni stężeń mieszaniny dwóch antybiotyków dla różnych rodzajów oddziaływań, (b) mapa oddziaływań wyznaczona dla mieszaniny ampicylina – chloramfenikol, (c) mapa oddziaływań wyznaczona dla mieszaniny tetracyklina – ampicylina, (d) mapa oddziaływań wyznaczona dla mieszaniny tetracyklina – chloramfenikol.

Zidentyfikowaliśmy trzy rodzaje interakcji między badanymi antybiotykami (Rys. 34) określając je na podstawie definicji addytywności Loewe'go^{3, 63, 64}. Mówi ona, że jeśli aktywności dwóch antybiotyków są addytywne, to aktywność ich mieszaniny jest sumą ich aktywności mnożonych przez wagę odpowiadającą udziałowi każdego z nich w mieszaninie. Dwuwymiarowe macierze żywotności komórek składają się z izoboli – linii łączących punkty, dla których mieszaniny badanych antybiotyków wykazywały tę samą aktywność

antybakteryjną. Kształt izoboli wskazuje na typ oddziaływania pomiędzy antybiotykami. Liniowe (proste) izobole występują dla addytywnych (nie oddziałujących ze sobą) substancji. Izobole wklęsłe sugerują synergistyczną zależność – niższe stężenie mieszaniny dwóch antybiotyków ma taką samą toksyczność, jak wyższe stężenia pojedynczych antybiotyków. Pary antagonistyczne tworzą wypukłe izobole. Wypukłe izobole, których maksimum jest silnie przesunięte w kierunku jednego z antybiotyków świadczą o oddziaływaniu hamującym, w których hamowanie jest dominowane przez stężenie jednego z antybiotyków. Na podstawie powyższych zależności kształtu izoboli od aktywności mieszanin antybiotyków zidentyfikowaliśmy następujące typy oddziaływań wobec *E. coli* ATCC 25992: antagonistyczne (dla ampicyliny i chloramfenikolu), hamujące (dla ampicyliny i tetracykliny) oraz addytywne (dla chloramfenikolu i tetracykliny). Wynik dla pary ampicylina – chloramfenikol zgadza się z wynikiem otrzymanym ostatnio w układzie mikroprzepływowym przez Cao *i in.* ⁴⁰.

W kolejnym eksperymencie zademonstrowaliśmy możliwość zidentyfikowania rodzajów oddziaływań pomiędzy parami trzech antybiotyków w jednej sekwencji kropeł. W rezerwuarach zdeponowaliśmy ampicylinę o stężeniu 3,15 mg L⁻¹, chloramfenikol o stężeniu 0,735 mg L⁻¹ oraz tetracyklinę o stężeniu 0,231 mg L⁻¹ (Rys. 35). Tworzyliśmy sekwencje 63 kropeł (o objętości 2,1 µL) każda zawierająca 100 nL zawiesiny bakteryjnej (ok. 7 x 10⁶ CFU mL⁻¹). Sekwencje składały się z trzech podsekwencji 21 kropeł. W każdej podsekwencji stężenie antybiotyku zmieniało się od 0 do $C_{1/2}$, gdzie $C_{1/2}$ jest stężeniem antybiotyku, dla którego mierzona wartość intensywności fluorescencji rezorufiny była równa połowie maksymalnej mierzonej wartości (Rys. 35) – $C_{1/2} = 3,0$ mg L⁻¹ dla ampicyliny, 0,7 mg L⁻¹ dla chloramfenikolu oraz 0,22 mg L⁻¹ dla tetracykliny. W każdej podsekwencji stężenie jednego antybiotyku było równe $C_i^{A1} = (i-1) \left(\frac{C_{1/2}^{A1}}{20} \right)$, gdzie indeks i zmienia się od 1 do 21. Stężenie drugiego antybiotyku zmieniało się również liniowo pomiędzy kolejnymi kroplami w podsekwencji, ale w przeciwnym kierunku: $C_i^{A2} = (20-i) \left(\frac{C_{1/2}^{A2}}{20} \right)$. Numer kropli w całej

sekwencji był równy $n = (j-1)21+i$, gdzie indeks i oznacza parę antybiotyków: $j = 1$ ampicylina – chloramfenikol, $j = 2$ chloramfenikol – tetracyklina, $j = 3$ ampicylina – chloramfenikol.



Rys. 35 (a) Schemat napełnienia zbiorników próbek w eksperymencie, (b) badana mapa stężeń antybiotyków, (c) przebieg zależności intensywności fluorescencji rezorufiny od składu mieszaniny antybiotyków dla różnych rodzajów oddziaływań, (d) zmierzone zależności intensywności fluorescencji rezorufiny dla mieszanin trzech par antybiotyków.

Po 3 godzinach inkubacji mierzyliśmy intensywność fluorescencji rezorufiny w kroplach. Ponieważ kształty otrzymanych krzywych ilustrowały zależności między żywotnością bakterii a składem antybiotykowym kropeł, mogły one zostać bezpośrednio powiązane z kształtem izoboli na mapach żywotności (Rys. 35). Addytywne składniki powinny generować linię prostą pomiędzy punktami, w których krople zawierają tylko jeden antybiotyk. Synergistyczne oddziaływanie powinno odzwierciedlać się krzywą żywotności, która będzie usytuowana poniżej tej prostej. Antagonistyczne oddziaływanie powinno skutkować wyższą żywotnością, niż dla oddziaływania addytywnego. Oddziaływanie supresywne powinno mieć maksimum przesunięte w kierunku jednego z antybiotyków. Wyniki naszego eksperymentu pozwoliły nam wyróżnić trzy rodzaje oddziaływań, takich samych, jak z wygenerowanych wcześniej map żywotności bakterii:

antagonistyczne dla ampicyliny i chloramfenikolu, addytywne dla chloramfenikolu i tetracykliny oraz hamujące dla ampicyliny i chloramfenikolu (Rys. 35).

5. Podsumowanie i wnioski

Opracowany układ mikroprzepływowy do badań przesiewowych i) wykorzystuje małe objętości cieczy (roztworów bądź zawiesin), ii) bardzo precyzyjnie dozjuje objętości substancji (odchylenie standardowe objętości poniżej 1 %), iii) umożliwia łatwą wymianę badanych próbek, iv) tworzy sekwencje kropeł o ściśle określonym składzie, m.in. próbujących dwuwymiarowe lub trójwymiarowe przestrzenie reagentów, v) pozwala tworzyć krople z substancji różniących się znacząco lepkością (bądź o nieznannej lepkości) oraz vi) zapewnia wysoką wiarygodność wyników mikrobiologicznych otrzymywanych przy jego użyciu. W porównaniu z technologiami wykorzystującymi płytki wielodołkowe, które są obecnie stosowane w badaniach przesiewowych, nasza technologia z podobną wydajnością (ok. 0,5 - 1 Hz) oraz konsumpcyjnością reagentów, i) tworzy mieszaniny reakcyjnie ze znacznie większą precyzją oraz ii) eliminuje potencjalne niebezpieczeństwo parowania oraz adhezji badanych próbek na ściankach.

Aby zwiększyć konkurencyjność opracowanej technologii dla technologii opartych na płytkach wielodołkowych, w kolejnym etapie badań powinniśmy stworzyć układ mikroprzepływowy oraz protokół generowania w nim kropeł pozwalające na tworzenie sekwencji przemiatających co najmniej o jeden rząd wielkości większy zakres stężeń badanych substancji przy zachowaniu podobnej precyzji dozowania, wydajności oraz konsumpcyjności urządzenia.

Mamy nadzieję, że w najbliższym czasie zastosujemy stworzoną technologię mikroprzepływową w istniejących systemach analitycznych, co umożliwi wykorzystywanie zalet laboratoriów kropelkowych m.in. w analizach diagnostycznych, farmakologicznych czy w mikrobiologii klinicznej.

6. Metody

6.1. Wytwarzanie układów mikroprzepływowych

Mikrokanaly wytwarzaliśmy w cienkich płytkach poliwęglanowych o grubości od 0,25 mm do 5 mm (Macroclear, Bayer, Niemcy) używając frezarki sterowanej komputerowo (MSG4025, Ergwind, Polska). Płytki poliwęglanowe z wyfrezowanymi strukturami łączyliśmy ze sobą wystawiając je na działanie plazmy tlenowej, a następnie ściskając je w podwyższonej temperaturze (45 min, 130 °C, 0,4 MPa). W układach do zastosowań biologicznych zwiększaliśmy hydrofobowość powierzchni mikrokanalów roztworem dodecyloaminy⁶⁵. Wloty do układu były wykonane z krótkich (4 cm) stalowych kapilar (średnica zewnętrzna 0,8 mm, średnica wewnętrzna 0,65 mm, Mifam, Polska). Łączyliśmy je z kapilarami zaworów używając jako kołnierzy uszczelniających krótkich odcinków (2 cm) wężyków z materiału Tygon® (średnica zewnętrzna 2,07 mm, średnica wewnętrzna 0,25 mm, Ismatec, USA).

6.2. Używane płyny

We wszystkich eksperymentach, jeśli nie podaliśmy inaczej, fazami określanymi przez nas, jako rozpraszająca i olejowa, był heksadekan z 2% (w/w) dodatkiem surfaktantu Span 80 (Sigma), a fazą rozpraszaną woda dejonizowana o przewodności równej $1 \cdot 10^{-4} \text{ S m}^{-1}$ bądź azot techniczny (Linde Gas).

6.3. Techniki mikrobiologiczne

We wszystkich eksperymentach jako medium hodowlanego używaliśmy pożywki MH (Mueller-Hinton) (BD Biosciences, USA), która jest standardowo wykorzystywana w testach toksyczności antybiotyków. Kulturę bakterii przechowywaliśmy w temperaturze - 80 °C w pożywce LB (Luria-Bertani) (BD Biosciences, USA) zawierającej 30% (w/w) glicerolu (Chempur, Polska). Przed przystąpieniem do badań, komórki przenosiliśmy na płytki ze stałym podłożem agarowym z pożywką MH i inkubowaliśmy przez całą noc. Inokulum zaszczepialiśmy pobraną z płytki pojedynczą kolonią i inkubowaliśmy je następnie w temperaturze 37 °C wytrząsając z szybkością 200 rpm. Następnie komórki były pasażowane do nowej pożywki i wzrastały do osiągnięcia przez zawiesinę absorbancji równej 0,1 ($\lambda = 600 \text{ nm}$). Zawiesinę przed zdeponowaniem na chipie rozcieńczaliśmy 7,14-krotnie. W tworzonych kroplach była ona jeszcze 14-krotnie (21-krotnie) rozcieńczana, co w dawało finalne stężenie bakterii równe ok. $5 \times 10^5 \text{ CFU mL}^{-1}$.

6.4. Przygotowanie roztworów antybiotyków

Roztwory ampicyliny oraz wodorochlorku tetracykliny przygotowywaliśmy w wodzie dejonizowanej, a chloramfenikolu w 50% (w/w) wodnym roztworze etanolu w stężeniach 1000-krotnie większych, niż finalnie używane. Wszystkie antybiotyki były dostarczone przez Roth (Niemcy). Roztwory sterylizowaliśmy filtracyjnie. Z powodu niestabilności roztworu ampicyliny w niskich temperaturach (chłodzenie w lodowce) ⁶¹, wszystkie roztwory przygotowywaliśmy i rozcieńczaliśmy w pożywce MH do zadanego stężenia bezpośrednio przed eksperymentem.

Rezazuryna (Sigma-Aldrich, Polska) rozcieńczona w pożywce MH w stężeniu 44 μM posłużyła nam jako indykator żywotności i metabolizmu komórek. Aby otrzymywać stałe stężenie rezazuryny w tworzonych kroplach jej roztwór dodawaliśmy do wszystkich roztworów wszystkich używanych substancji z wyjątkiem zawiesiny bakteryjnej.

6.5. Wyznaczanie minimalnego stężenia hamującego metodą klasyczną

Do wyznaczenia minimalnego stężenia hamującego metodą klasyczną użyliśmy dziesięciu próbek: dziewięciu (ponumerowanych) zawierających 2 ml pożywki MH z zawiesiną bakteryjną (ok. 5×10^5 CFU mL⁻¹) i jednej zawierającej 4 ml pożywki MH z bakteriami w tym samym stężeniu, co w pozostałych oraz antybiotyku o stężeniu 32 mg L⁻¹. Z niej przetransferowaliśmy 2 mL do próbki dziewiątej, następnie 2 mL z dziewiątej do ósmej. Powtarzając tę procedurę siedmiokrotnie otrzymaliśmy w dziesięciu próbkach roztwory antybiotyku o geometrycznie malejącym stężeniu w zakresie dwóch rzędów wielkości. Minimalne stężenie inhibujące było najniższym stężeniem antybiotyku, w którym niezauważalny był wzrost bakterii po 20 godzinach inkubacji.

7. Podziękowania

Dziękuję swojemu opiekunowi naukowemu i promotorowi Piotrowi Garsteckiemu za zafascynowanie mnie światem mikrofluidyki kropelkowej, za inspirujące rozmowy oraz za nieocenioną pomoc w planowaniu oraz prowadzeniu badań.

Dziękuję swoim kolegom z grupy badawczej Tomkowi Kamińskiemu, Sławkowi Jakiele oraz Piotrkowi Korczykowi za nieocenioną pomoc, która w znaczącym stopniu przyczyniła się do powstania przedstawionych w rozprawie wyników.

Dziękuję Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej, która finansowała moją pracę badawczą w ramach programu TEAM.

Dziękuję Ministerstwu Nauki i Szkolnictwa Wyższego, które finansowało moją pracę badawczą w ramach programu Iuventus Plus 2010.

Dziękuję Human Frontiers Science Program, które finansowało moją pracę badawczą.



Lista publikacji oraz zgłoszeń patentowych

7.1. Publikacje

1. **K. Churski**, T. Kamiński, S. Jakiela, W. Kamysz, W. Barańska-Rybak, D. Weibel, P. Garstecki „*Rapid screening of antibiotic toxicity in an automated microdroplet system*” *Lab Chip*, 2012, 12, 9, 1629-1637 (**w 2011 r. IF = 6.26**);
2. T. Kamiński, **K. Churski**, P. Garstecki, **rozdział** “*Automated droplet microfluidic chips for biochemical assays*” **w monografii** “*Microfluidics: Principles, Components, and Emerging Applications*”. Edited by P. Day, A. Manz and Y. Zhang. **Springer** (w druku);
3. **K. Churski**, P. Korczyk, P. Garstecki, “*High-throughput automated droplet microfluidic system for screening of reaction conditions*”, *Lab Chip*, 2010, 7, 816-818 (**w 2009 r. IF = 6.342**);
4. **K. Churski**, J. Michalski, P. Garstecki, “*Droplet on demand system utilizing a computer controlled microvalve integrated into a stiff polymeric microfluidic device*”, *Lab Chip*, 2010, 4, 512-518 (**w 2009 r. IF = 6.342**).

7.2. Zgłoszenia patentowe

1. S. Jakiela, T. Kamiński, **K. Churski**, P. Garstecki, „*Sposób dzielenia kropeł na żądanie w złączu mikroprzepływowym*” wynalazek zgłoszony w trybie krajowym **P-395778** (2011 r.);
2. **K. Churski**, P. Korczyk, T. Kamiński, S. Jakiela, M. Izydorzak, S. Makulska, P. Garstecki, “*System and Method for Automated Generation and Handling of Liquid Mixtures*”, wynalazek zgłoszony w trybie PCT (**PCT/PL2011/050002**) (2011 r.);

3. **K. Churski**, S. Jakięła, T. Kamiński, S. Makulska, M. Izidorzak, P. Garstecki, "*Układ do zasilania podukładu mikroprzepływowego płynami i odpowiedni podukład mikroprzepływowy*", wynalazek zgłoszony w trybie krajowym **P-393619** (2011 r.);
4. **K. Churski**, P. Korczyk, P. Garstecki, "*Method and apparatus for formation of droplets on demand in a microfluidic system and for formation of sequences of droplets of arbitrarily predefined concentrations of input reagents*", wynalazek zgłoszony w trybie krajowym **P-390251** (2010 r.);
5. **K. Churski**, P. Garstecki, "*A valve and a method of modification thereof*", wynalazek zgłoszony w trybie krajowym **P-390250** (2010 r.);
6. **K. Churski**, J. Michalski, P. Garstecki, "*Microvalve and system for microfluidic formation of droplets and bubbles on demand with defined volume and at defined times of emission*", wynalazek zgłoszony w trybie krajowym **P-388565** (2009 r.).

8. Literatura

1. S. B. Levy and B. Marshall, *Nature Medicine*, 2004, **10**, S122-S129.
2. H. Goossens, M. Ferech, R. V. Stichele, M. Elseviers and E. P. Grp, *Lancet*, 2005, **365**, 579-587.
3. C. T. Keith, A. A. Borisy and B. R. Stockwell, *Nature Reviews Drug Discovery*, 2005, **4**, 71-U10.
4. A. W. Bauer, W. M. M. Kirby, J. C. Sherris and M. Turck, *American Journal of Clinical Pathology*, 1966, **45**, 493-&.
5. D. R. Stalons and C. Thornsberry, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1975, **7**, 15-21.
6. A. Dove, *Nature Biotechnology*, 1999, **17**, 859-863.
7. A. Manz, D. J. Harrison, E. M. J. Verpoorte, J. C. Fettingner, H. Ludi and H. M. Widmer, *Chimia*, 1991, **45**, 103-105.
8. D. J. Harrison, K. Fluri, K. Seiler, Z. H. Fan, C. S. Effenhauser and A. Manz, *Science*, 1993, **261**, 895-897.
9. P. J. A. Kenis, R. F. Ismagilov and G. M. Whitesides, *Science*, 1999, **285**, 83-85.
10. T. Thorsen, R. W. Roberts, F. H. Arnold and S. R. Quake, *Physical Review Letters*, 2001, **86**, 4163-4166.
11. M. G. Pollack, R. B. Fair and A. D. Shenderov, *Applied Physics Letters*, 2000, **77**, 1725-1726.
12. H. Song, D. L. Chen and R. F. Ismagilov, *Angewandte Chemie-International Edition*, 2006, **45**, 7336-7356.
13. P. Garstecki, M. J. Fuerstman, H. A. Stone and G. M. Whitesides, *Lab on a Chip*, 2006, **6**, 437-446.
14. P. Guillot and A. Colin, *Physical Review E*, 2005, **72**, 066301.
15. M. De Menech, P. Garstecki, F. Jousse and H. A. Stone, *Journal of Fluid Mechanics*, 2008, **595**, 141-161.
16. G. F. Christopher, N. N. Noharuddin, J. A. Taylor and S. L. Anna, *Physical Review E*, 2008, **78**, 036317.
17. A. M. Ganan-Calvo, *Physical Review Letters*, 1998, **80**, 285-288.
18. S. L. Anna, N. Bontoux and H. A. Stone, *Applied Physics Letters*, 2003, **82**, 364-366.
19. P. Garstecki, H. A. Stone and G. M. Whitesides, *Physical Review Letters*, 2005, **94**, 164501.
20. B. Dollet, W. van Hoeve, J.-P. Raven, P. Marmottant and M. Versluis, *Physical Review Letters*, 2008, **100**.
21. Z. Nie, M. Seo, S. Xu, P. C. Lewis, M. Mok, E. Kumacheva, G. M. Whitesides, P. Garstecki and H. A. Stone, *Microfluidics and Nanofluidics*, 2008, **5**, 585-594.
22. W. Lee, L. M. Walker and S. L. Anna, *Physics of Fluids*, 2009, **21**, 032103.
23. M. Y. He, J. S. Kuo and D. T. Chiu, *Applied Physics Letters*, 2005, **87**, 031916.
24. A. M. Ganan-Calvo, *Physical Review Letters*, 2007, **98**, 134503.

25. D. R. Link, E. Grasland-Mongrain, A. Duri, F. Sarrazin, Z. D. Cheng, G. Cristobal, M. Marquez and D. A. Weitz, *Angewandte Chemie-International Edition*, 2006, **45**, 2556-2560.
26. T. B. Jones, *Journal of Electrostatics*, 2001, **51**, 290-299.
27. T. B. Jones, M. Gunji, M. Washizu and M. J. Feldman, *Journal of Applied Physics*, 2001, **89**, 1441-1448.
28. M. G. Pollack, A. D. Shenderov and R. B. Fair, *Lab on a Chip*, 2002, **2**, 96-101.
29. P. Paik, V. K. Pamula, M. G. Pollack and R. B. Fair, *Lab on a Chip*, 2003, **3**, 28-33.
30. V. Srinivasan, V. K. Pamula and R. B. Fair, *Lab on a Chip*, 2004, **4**, 310-315.
31. F. Malloggi, H. Gu, A. G. Banpurkar, S. A. Vanapalli and F. Mugele, *European Physical Journal E*, 2008, **26**, 91-96.
32. M. Prakash and N. Gershenfeld, *Science*, 2007, **315**, 832-835.
33. T. S. Sammarco and M. A. Burns, *Aiche Journal*, 1999, **45**, 350-366.
34. C. N. Baroud, J.-P. Delville, F. Gallaire and R. Wunenburger, *Physical Review E*, 2007, **75**, 046302.
35. J. Xu and D. Attinger, *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 2008, **18**, 065020.
36. A. Bransky, N. Korin, M. Khoury and S. Levenberg, *Lab on a Chip*, 2009, **9**, 516-520.
37. M. A. Unger, H. P. Chou, T. Thorsen, A. Scherer and S. R. Quake, *Science*, 2000, **288**, 113-116.
38. W. H. Grover, A. M. Skelley, C. N. Liu, E. T. Lagally and R. A. Mathies, *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2003, **89**, 315-323.
39. H. Song and R. F. Ismagilov, *Journal of the American Chemical Society*, 2003, **125**, 14613-14619.
40. J. Cao, D. Kuersten, S. Schneider, A. Knauer, P. M. Guenther and J. M. Koehler, *Lab on a Chip*, 2012, **12**, 474-484.
41. X. Niu, F. Gielen, J. B. Edel and A. J. deMello, *Nature Chemistry*, 2011, **3**, 437-442.
42. N. Damean, L. F. Olguin, F. Hollfelder, C. Abell and W. T. S. Huck, *Lab on a Chip*, 2009, **9**, 1707-1713.
43. A. B. Theberge, E. Mayot, A. El Harrak, F. Kleinschmidt, W. T. S. Huck and A. D. Griffiths, *Lab on a chip*, 2012, **12**, 1320-1326.
44. E. Brouzes, M. Medkova, N. Savenelli, D. Marran, M. Twardowski, J. B. Hutchison, J. M. Rothberg, D. R. Link, N. Perrimon and M. L. Samuels, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, **106**, 14195-14200.
45. H. N. Joensson, M. L. Samuels, E. R. Brouzes, M. Medkova, M. Uhlen, D. R. Link and H. Andersson-Svahn, *Angewandte Chemie-International Edition*, 2009, **48**, 2518-2521.
46. A. Fallah-Araghi, J.-C. Baret, M. Ryckelynck and A. D. Griffiths, *Lab on a Chip*, 2012, **12**, 882-891.
47. J. Clausell-Tormos, A. D. Griffiths and C. A. Merten, *Lab on a Chip*, 2010, **10**, 1302-1307.
48. V. Trivedi, A. Doshi, G. K. Kurup, E. Ereifej, P. J. Vandevord and A. S. Basu, *Lab on a Chip*, 2010, **10**, 2433-2442.
49. J. Y. Wu, L. E. Purton, S. J. Rodda, M. Chen, L. S. Weinstein, A. P. McMahon, D. T. Scadden and H. M. Kronenberg, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, **105**, 16976-16981.
50. W. Liu, H. J. Kim, E. M. Lucchetta, W. Du and R. F. Ismagilov, *Lab on a Chip*, 2009, **9**, 2153-2162.

51. M. Sun and Q. Fang, *Lab on a Chip*, 2010, **10**, 2864-2868.
52. W.-B. Du, M. Sun, S.-Q. Gu, Y. Zhu and Q. Fang, *Analytical Chemistry*, 2010, **82**, 9941-9947.
53. W. H. Grover, R. H. C. Ivester, E. C. Jensen and R. A. Mathies, *Lab on a Chip*, 2006, **6**, 623-631.
54. P. M. Korczyk, O. Cybulski, S. Makulska and P. Garstecki, *Lab on a Chip*, 2011, **11**, 173-175.
55. S. Zeng, B. Li, X. o. Su, J. Qin and B. Lin, *Lab on a Chip*, 2009, **9**, 1340-1343.
56. J.-C. Galas, D. Bartolo and V. Studer, *New Journal of Physics*, 2009, **11**, 075027.
57. M. Chabert, K. D. Dorfman and J. L. Viovy, *Electrophoresis*, 2005, **26**, 3706-3715.
58. M. Zagnoni and J. M. Cooper, *Lab on a Chip*, 2009, **9**, 2652-2658.
59. K. Ahn, J. Agresti, H. Chong, M. Marquez and D. A. Weitz, *Applied Physics Letters*, 2006, **88**, 264105.
60. T. Szymborski, P. M. Korczyk, R. Hołyst and P. Garstecki, *Applied Physics Letters*, 2011, **99**, 094101.
61. J. M. Andrews, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2001, **48**, 5-16.
62. M. Wikler, F. Cockerill, W. Craig, M. Dudley, G. Eliopoulos, D. Hecht, J. Hindler, D. Low, D. Sheehan, F. Tenover, J. Turnidge, M. Weinstein, B. Zimmer, M. Ferraro and J. Sewnson, *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement., Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania*, 2007.
63. P. J. Yeh, M. J. Hegreness, A. P. Aiden and R. Kishony, *Nature Reviews Microbiology*, 2009, **7**, 460-466.
64. S. Loewe, *Ergebn Phisol*, 1928, **27**, 47-187.
65. P. Jankowski, D. Ogonczyk, A. Kosinski, W. Lisowski and P. Garstecki, *Lab on a Chip*, 2011, **11**, 748-752.

B. 439/12



Biblioteka Instytutu Chemii Fizycznej PAN

F-B.439/12



90000000184840