

УДК 543.545+004.94

© К. И. Белоусов, А. А. Евстапов, А. Л. Буляница

МОДЕЛИРОВАНИЕ КОНЦЕНТРАЦИОННЫХ ЗАВИСИМОСТЕЙ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОБЫ В КАНАЛАХ МИКРОФЛЮИДНОГО ЧИПА ПРИ ЭЛЕКТРОКИНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕКЦИИ

Задачей работы являлось проведение моделирования электрокинетического ввода пробы в сепарационный канал микрофлюидного чипа с инжектором топологии двойной крест, позволяющей осуществлять загрузку по разным схемам (простой "крест", "Z-ввода", "П-ввода" [1]). При моделировании использовались модифицированное уравнение Навье—Стокса (массоперенос буфера и пробы), законы Кирхгофа и Ома для расчета распределения электрического поля в каналах, которые решались методом конечных элементов. При этом рассматривалось упрощенное двумерное пространственное распределение аналита. Сама проба представлялась как сплошная среда. После моделирования были проведены анализ полученных временных и пространственных распределений аналита, оценка влияния управляющих потенциалов и ширины каналов на дисперсию и неоднородность пробы. По результатам анализа были выбраны режимы инъекции, обеспечивающие минимальную дисперсию анализируемого вещества.

Кл. сл.: инжектор, электрокинетический ввод пробы, массоперенос, управляющий потенциал, дисперсия пробы, неоднородность пробы, метод конечных элементов

ВВЕДЕНИЕ

Одними из наиболее используемых методов анализа многокомпонентных проб на микрофлюидной платформе являются электрофоретические методы. Достижимое пространственное и временное разрешение при разделении компонентов связано с рядом факторов и явлений, вносящих существенный вклад в дисперсию аналита, например форма скоростного профиля потока, температура, напряженность электрического поля. В частности, электрофоретическое разделение в значительной мере определяют размеры зоны пробы и начальное ее размытие [2]. Поскольку ввод аналита осуществляется под действием электрического поля в каналах то, варьируя величину потенциалов, можно получить условия загрузки и ввода, обеспечивающие минимальную дисперсию и наилучшее разрешение компонентов пробы. Моделирование концентрационных зависимостей распределения аналита в микрофлюидном чипе позволяет сравнить различные режимы ввода и выбрать те, которые обеспечивают лучшие аналитические характеристики.

Целью работы являлось нахождение оптимальных условий ввода пробы, обеспечивающих наименьшую дисперсию. При этом решаются следующие задачи:

- получение концентрационных зависимостей распределения аналита в инжекторе микрофлюид-

ного чипа топологии двойной крест при разных условиях ввода пробы по схемам простой "крест", "Z-ввода" и «П-ввода» и при различной ширине микроканалов;

- анализ влияния условий инъекции пробы (запирающие потенциалы, потенциалы загрузки, времена ввода) на продольную дисперсию и размытие аналита;

- выбор условий и режимов ввода, обеспечивающих минимальную дисперсию.

МЕТОД МОДЕЛИРОВАНИЯ И БАЗОВЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ

При выполнении работы использовался пакет программ COMSOL Multiphysics, которые позволяют осуществлять численное моделирование физических процессов, описываемых дифференциальными уравнениями в частных производных, решаемыми методом конечных элементов. Расчеты проводились на основании модифицированных уравнений Навье—Стокса для моделирования массопереноса буфера и пробы, законов Кирхгофа и Ома для расчета распределения электрического поля в каналах. Характерное поперечное значение числа Рейнольдса при моделировании выбрано $Re \sim 0.001$ [3]. Распределение концентрации рассматривалось на примере компонента пробы [4], соответствующего фрагменту ДНК с длиной 100 пар оснований, коэффициентом диффузии

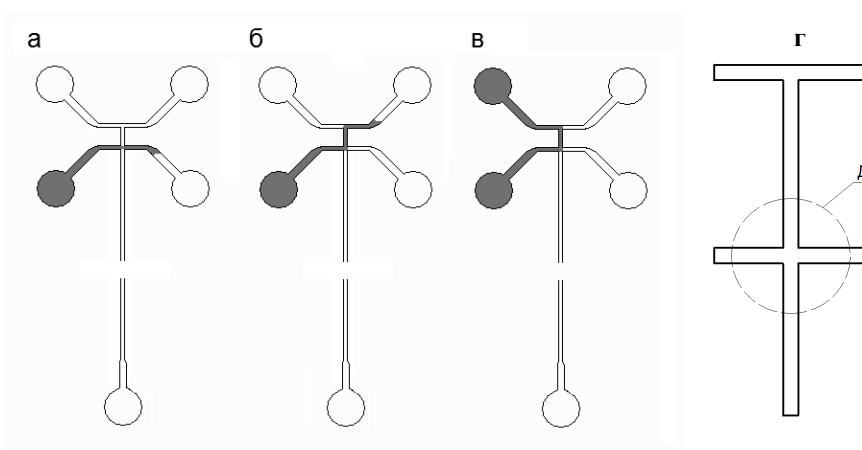


Рис. 1. Схемы ввода пробы.

а — простой "крест", б — "Z-ввод", в — "Π-ввод", г — инжектор двойной "крест", д — инжектор простой "крест". Кругами изображены резервуары для ввода пробы и буфера и их слива

$1.5 \cdot 10^{-11} \text{ м}^2/\text{с}$ и электрофоретической подвижностью $1.24 \cdot 10^{-8} \text{ м}^2/(\text{В} \cdot \text{с})$. Компоненты пробы участвуют и в диффузионном, и в конвективном переносах.

При моделировании делался ряд допущений:

- каналы микрофлюидного чипа представлялись как совокупность плоских щелей равной ширины, при этом не учитывался массоперенос между слоями в вертикальном направлении (возможность такого приближения рассматривается в [5, 6]);

- стенки каналов считались непроницаемыми для вещества и гладкими;

- для пробы применялась модель сплошной среды;

- не учитывалось изменение сопротивления буфера при вводе пробы в канал;

- не учитывались тепловые эффекты от действия электрического поля.

Для исследования была выбрана одноканальная топология микрофлюидного чипа с инжектором двойной "крест" (рис. 1). Преимущества этой топологии заключаются в простоте конструирования

и расчета, в возможности осуществить загрузку по разным схемам: простой "крест", "Z-ввод" и "Π-ввод", обеспечивая ввод различных объемов аналита в сепарационный канал (50 и 800 пл [1]), что позволяет увеличить диапазон определяемых концентраций.

При моделировании задавались значения потенциалов на электродах, расположенных в середине резервуаров. Под их действием проба перемещалась по каналам, а также регулировалось проникновение пробы в боковые каналы.

Степень неоднородности распределения вещества традиционно характеризуется числом Пекле, определяемым отношением конвективной и диффузионной составляющих скорости пробы:

$$Pe = \frac{vl}{D}, \text{ где } v \text{ — средняя конвективная скорость,}$$

l — характерный размер сечения, D — коэффициент диффузии. Таким образом, при уменьшении ширины каналов должно наблюдаться ускорение процессов диффузии и рост однородности.

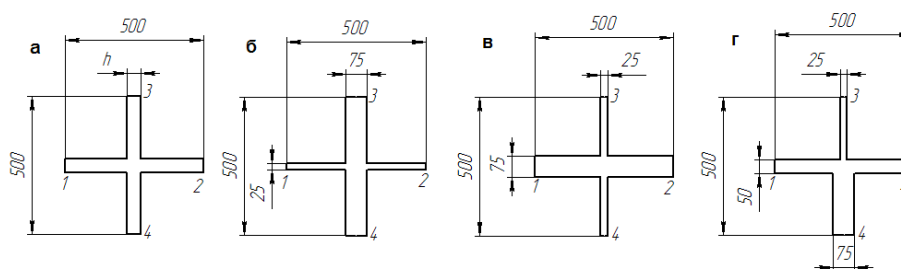


Рис. 2. Схема инжектора простой "крест" с различной шириной загрузочного (вертикальный) и сепарационного (горизонтальный) каналов. Размеры указаны в микрометрах

Табл. 1. Значения потенциалов φ_{zi} при загрузке пробы в инжектор и φ_{Bi} при вводе в сепарационный канал (В)

Потенциалы	Схема ввода		
	Простой "крест"	"Z-ввод"	"П-ввод"
При загрузке пробы в инжектор			
φ_{31}	1.3–2.5	5	5
φ_{32}	1.3–2.5	1.2–2	0
φ_{33}	2.5	0	1.2–2
φ_{34}	0	3.9–4.5	3.9–4.5
φ_{35}	—	3.9–4.5	3.9–4.5
При вводе пробы в сепарационный канал			
φ_{B1}	2.5	0.5–1	0.5–1
φ_{B2}	0	5	0
φ_{B3}	0.5–1.25	0	5
φ_{B4}	0.5–1.25	0.5–1	0.5–1
φ_{B5}	—	0	0

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Моделирование по схеме простой "крест" осуществлялось на инжекторе, представленном на рис. 2, а. Буквой h обозначена варьируемая ширина каналов от 12.5 до 50 мкм.

Кроме симметричных вариантов топологии инжектора были рассмотрены варианты с различной шириной загрузочного и сепарационного канала (рис. 2, б, в, г). При моделировании инжектора для схемы "Z-ввода" рассматривались варианты ширины каналов, равные 50 и 12.5 мкм.

На первом этапе осуществлялась загрузка пробы в инжектор микрофлюидного чипа. Для каждого варианта загрузки моделировалось изменение концентрационного профиля во времени при вводе пробы в сепарационный канал. При моделировании использовались значения потенциалов из диапазонов, указанных в табл. 1.

В Приложении на рис. П1 и П2 представлены результаты моделирования концентрационных зависимостей распределения аналита. Дисперсия σ^2 рассчитывалась методом моментов по аналогии с теорией вероятностей для различных времен t после начала ввода пробы в сепарационный канал. Для оценки неоднородности I распределения концентрации по сечению канала, соответствующему центру пробки, использовалось выражение:

$$\frac{|c_{\max} - c_{\min}|}{c_{\text{среднее}}}, \text{ где } c_{\max} \text{ и } c_{\min} \text{ — максимальное и минимальное значения концентрации.}$$

Количество введенной в сепарационный канал пробы S , находящейся в любом осевом разрезе, оценивалось как произведение c_0 на ширину канала, где $c_0 = \int c(x)dx$, x — осевая (маршевая) координата.

Для расчета дисперсии, концентрации и неоднородности пробы выбраны крайние значения из диапазонов, представленных в табл. 1, результаты расчета сведены в табл. 2.

Из данных табл. 2 следует, что варьируя значения запирающих потенциалов, можно менять величину дисперсии в несколько раз. При максимальных запирающих потенциалах равных потенциалу в перекрестии каналов, происходит "втягивание" пробы из боковых каналов в сепарационный, что увеличивает дисперсию. К тому же данный процесс приводит к увеличению скорости ее роста. Применение пониженных запирающих потенциалов предотвращает дополнительное проникновение пробы и снижает дисперсию. Так, расчет дисперсии для схемы простой "крест" с $h = 50$ мкм и $\varphi_{31} = \varphi_{32} = 1.3$ В показал, что через 6 с после начала ввода дисперсия пробы при $\varphi_{B3} = \varphi_{B4} = 1.25$ В в 1.7 раз больше, чем у варианта с $\varphi_{B3} = \varphi_{B4} = 0.5$ В, а через 10 с их разница увеличивается до 3.5 раз. Количество введенного вещества уменьшается в среднем на треть по сравнению с вводом при больших потенциалах.

Повышенные запирающие потенциалы при загрузке пробы в инжектор по схеме простой "крест", формируют более узкую зону пробы с более

Табл. 2. Параметры пробки пробы для различных вариантов ввода

Ширина каналов, мкм	Запирающие потенциалы загрузки, В	Запирающие потенциалы ввода, В	Дисперсия $\sigma^2 \cdot 10^{10}$, м ²	Момент измерения t , с	$C \cdot 10^9$, моль/м	I
Простой "крест"						
$h = 12.5$	$\varphi_{31} = \varphi_{32} = 1.3$	$\varphi_{B3} = \varphi_{B4} = 1.25$	95.9	6	0.96	
—	—	0.5	14.7	6	0.58	< 0.01
—	$\varphi_{31} = \varphi_{32} = 2.5$	0.5	3.0	6	0.15	0.05
—	—	0.5	4.1	10	—	—
$h = 50$	$\varphi_{31} = \varphi_{32} = 1.3$	1.25	33.0	6	8.63	—
—	—	1.25	88.4	10	—	—
—	—	0.5	19.2	6	6.76	0.01
—	—	0.5	25.4	10	—	—
—	$\varphi_{31} = \varphi_{32} = 2.5$	1.25	16.9	6	2.93	—
—	—	0.5	6.3	6	2.08	0.49
—	—	0.5	13.4	10	—	—
$h_1 = h_2 = 75$, $h_3 = h_4 = 25$	$\varphi_{31} = \varphi_{32} = 1.3$	0.5	31.8	6	12.3	0.02
$h_1 = h_2 = 25$, $h_3 = h_4 = 75$	—	1.25	103	6	7.16	—
—	—	0.5	53.6	6	4.98	< 0.01
$h_1 = h_2 = 50$, $h_3 = 25$, $h_4 = 75$	—	0.5	10.0	6	4.15	0.16
"Z-ВВОД"						
$h = 50$	$\varphi_{32} = 1.2$, $\varphi_{34} = \varphi_{35} = 3.9$	$\varphi_{B3} = 0$, $\varphi_{B1} = \varphi_{34} = 1$	358	20	30.7	0.07
—	$\varphi_{32} = 2$, $\varphi_{34} = \varphi_{35} = 4.5$	$\varphi_{B3} = 0$, $\varphi_{B1} = \varphi_{34} = 1$	328	20	20.9	0.91
$h = 12.5$	$\varphi_{32} = 2$, $\varphi_{34} = \varphi_{35} = 4.5$	$\varphi_{B3} = 0$, $\varphi_{B1} = \varphi_{34} = 1$	269	20	4.64	< 0.01

крутыми краями (Приложение, рис. П1, б, $\varphi_{31} = \varphi_{32} = 2.5$ В) в отличие от варианта с пониженными запирающими потенциалами (рис. П1, а, $\varphi_{31} = \varphi_{32} = 1.3$ В), что обеспечивает уменьшение дисперсии по сравнению с ним в 3 раза при вводе с $\varphi_{B3} = \varphi_{B4} = 0.5$ В. Однако данный режим также приводит к уменьшению количества вводимой пробы (в 3.25 раза), к ее неравномерному распределению по сечению канала.

Более узкие каналы (с шириной $h = 12.5$ мкм) позволяют минимизировать как величину дисперсии, так и количество вводящейся пробы. Благодаря усилению влияния процессов диффузии в поперечном направлении достигается значительное уменьшение неоднородности пробки пробы, что уменьшает скорость роста дисперсии. Так, ее значение для 10 с после начала ввода по сравнению с величиной для 6 с возросло лишь на треть, тогда

как у неоднородного варианта при $h = 50$ мкм — более чем в 2 раза.

При использовании варианта топологии, представленного на рис. 2, б, наблюдается сильное размытие пробы по краям, вследствие более длительного ее движения через перпендикулярный канал, что увеличивает дисперсию. Другой вариант топологии (рис. 2, в; Приложение, рис. П1, в) обеспечивает более крутые края пробы, однако, из-за широких боковых каналов активнее идет "втягивание" пробы при вводе.

Хорошие результаты показывает вариант с различной шириной каналов загрузки (рис. 2, г; Приложение, рис. П1, г), где наблюдается достаточная крутизна фронтов пробки и проникновение излишков пробы из боковых каналов уже не столь значительно. Он сочетает в себе относительно низкую дисперсию и большое количество вводящейся пробы.

При загрузке пробы по схеме "Z-ввода" с повышенными запирающими потенциалами (Приложение, рис. П2, б; $\varphi_{32} = 2$ В, $\varphi_{31} = \varphi_{34} = 4.5$ В) количество и дисперсия вводимой пробы изменяются не столь значительно, как при загрузке по схеме простой "крест", но ее размытие достаточно существенно. При условиях загрузки пробы, соответствующих минимальным запирающим потенциалам, удается получить режим, при котором не происходит существенного разбавления пробы буферным раствором (Приложение, рис. П2, а; $\varphi_{32} = 1.2$ В, $\varphi_{31} = \varphi_{34} = 3.9$ В). С другой стороны, уменьшение зоны вводимой пробы позволяет более экономно расходовать пробу, но, чтобы скорректировать неоднородность вводимой в сепарационный канал пробы, необходимо предпринять ряд дополнительных мер, например, стэкинг, процедуру сжатия пробы сразу после ее ввода в сепарационный канал или использовать каналы меньшей ширины. При применении узких каналов (Приложение, рис. П2, в; $h = 12.5$ мкм) уменьшается не только неоднородность, но и дисперсия, и количество вводимой пробы.

Дисперсия из-за достаточно большой длины пробки пробы при "Z-вводе" достигает максимальных значений. К тому же данная схема ввода требует большего времени загрузки, чем схема простой "крест". Однако использование процедуры стэкинга может дать преимущество схеме "Z-ввода" за счет роста интенсивности детектируемого сигнала благодаря созданию зоны с высокой концентрацией анализатора.

Результаты моделирования по схеме "П-ввода" не показали значительных отличий от схемы "Z-ввода".

Для проверки адекватности применяемого подхода и метода моделирования был произведен расчет распределения флуоресцеина в каналах

микрофлюидного чипа при загрузке и вводе пробы и сравнение его с экспериментальными данными. Для получения экспериментальных данных использовался конфокальный лазерный сканирующий микроскоп Leica TCS-SL (Leica, Германия). Управление загрузкой и вводом пробы осуществлялось при помощи прецизионного источника напряжений. Сравнение проводилось путем вычисления выборочного коэффициента корреляции между экспериментальными изображениями и изображениями, соответствующими расчетным концентрациям. Для этого они представлялись в виде матрицы размерностью 512 на 512, значения элементов которой соответствовали яркости и лежали в диапазоне от 0 до 255. При этом считалось, что яркость изображения пропорциональна концентрации анализатора. Изображения, полученные при экспериментальных исследованиях и моделировании, допускающие визуальное сопоставление, приведены на рис. 3.

Полученные значения оценок выборочного коэффициента корреляции, превышающие 0.8, говорят о высокой степени совпадения. Таким образом, результаты расчета вполне соответствуют экспериментальным данным, что указывает на адекватность проведенного моделирования. Среди причин уменьшающих корреляцию можно назвать шумы на экспериментальных изображениях, несовпадение позиции каналов на сравниваемых изображениях.

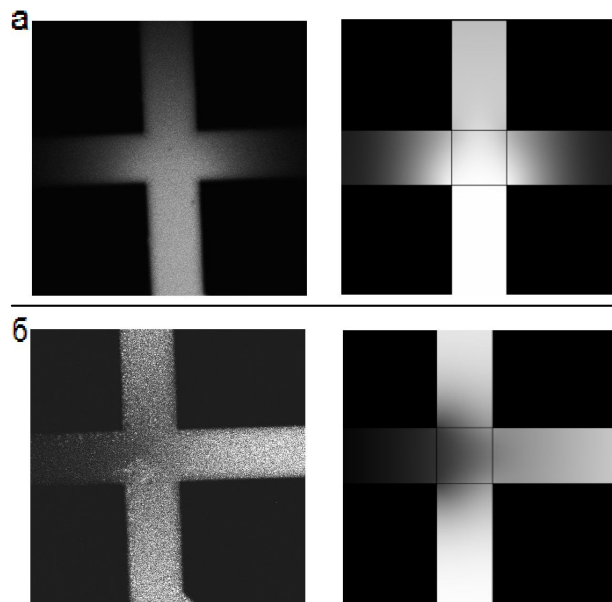


Рис. 3. Распределения флуоресцеина при загрузке (а) и вводе в сепарационный канал (б) пробы, полученные экспериментально (слева) и при моделировании (справа)

Табл. 3. Точечные и интервальные оценки величины выборочного коэффициента корреляции между сравниваемыми строками и столбцами экспериментального и модельного изображений

Сравниваемые строки и столбцы	Точечная оценка	Интервальная оценка
256-я строка	0.974	[0.969; 0.978]
256-й столбец	0.948	[0.939; 0.956]
231-й столбец	0.898	[0.879; 0.913]
281-й столбец	0.939	[0.927; 0.948]

Чтобы оценить влияние неинформативной области изображений (область вне микроканалов, недоступная для попадания аналита) на значение коэффициента корреляции, были взяты сечения на изображениях, представленных на рис. 3, а. Из матриц изображений были выбраны строки и столбцы посередине изображений и еще по два столбца, соответствующих середине левой половины канала и середине правой половины. Из строк и столбцов были изъяты пиксели, соответствующие линиям, ограничивающим перекрестие каналов на изображении результата моделирования. Результаты расчетов представлены в табл. 3. Интервальная оценка коэффициента корреляции строилась при доверительной вероятности 95 % и базировалась на нормализующем преобразовании Фишера (см., например, [7]).

Меньшее по сравнению с остальными значение коэффициента корреляции между 231-ми столбцами связано с тем, что это сечение на экспериментальном изображении из-за его поворота приближается внизу рисунка к краю канала, у которого идет спад интенсивности. Остальные же значения, соответствующие сечениям, находящимся ближе к центру канала, превышают коэффициент корреляции между целыми изображениями. Таким образом, различие позиций каналов, влияние чего незначительно у центра каналов и возрастает к их краям, дает большую долю в общем уменьшении значения коэффициента корреляции, а неинформативная часть изображения не приводит к необоснованному его росту.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате моделирования были получены концентрационные зависимости распределения аналита в инжекторе микрофлюидного чипа, по которым была произведена оценка дисперсии с помощью метода моментов, а также неоднород-

ности и количества вводящейся пробы. Из данных оценок следует, что использование повышенных запирающих потенциалов при загрузке пробы в инжектор и пониженных при дальнейшем ее вводе в сепарационный канал уменьшает дисперсию, однако также приводит к уменьшению ее количества. К тому же "поджимание" пробки пробы при инъекции существенно увеличивает ее неоднородность. Более узкие каналы уменьшают неоднородность, дисперсию и скорость ее роста на начальном этапе ввода в сепарационный канал. Но, опять-таки, уменьшается и количество введенной пробы.

Топология простой "крест" с различной шириной сепарационного и загрузочного каналов (вариант несимметричного канала загрузки) обеспечивает относительно низкую дисперсию и большое количество вводящейся пробы, однако другие варианты с каналами разной ширины не показали каких-либо преимуществ по сравнению со стандартной топологией.

Максимальное количество аналита можно ввести при помощи схем "Z-" и "П-ввода", однако при этом проба обладает наибольшей дисперсией. Различий между этими двумя схемами не наблюдается. Минимизацию дисперсии с одновременной минимизацией количества пробы можно обеспечить, используя топологию простой "крест" с узкими каналами. В дальнейшем следует продолжить эту работу с учетом дополнительных факторов: трехмерных пространственных профилей, изменения сопротивления буфера при закачивании пробы в канал, тепловых эффектов от действия электрического поля и т. д.

Работа выполнена при поддержке Программы фундаментальных исследований Президиума РАН № 9 «Создание и совершенствование методов химического анализа и исследования структуры веществ и материалов», проект «Микрофлюидные чипы для анализа биомолекул методами электрофореза».

ПРИЛОЖЕНИЕ

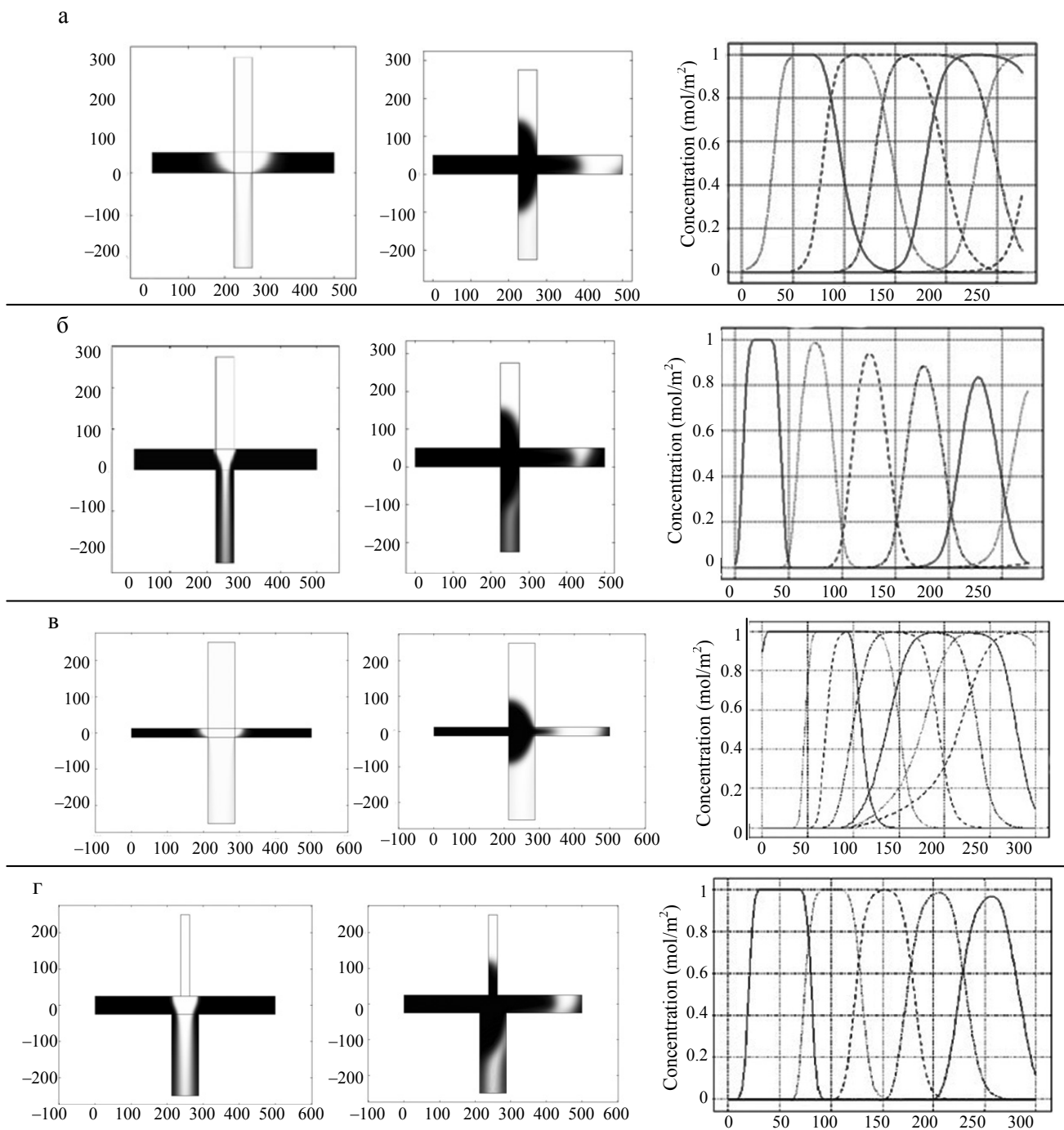


Рис. П1. Распределение концентрационных профилей при загрузке и вводе пробы по схеме простой "крест" с различной шириной загрузочных и сепарационных каналов. Первый столбец — загрузка пробы; второй столбец — ввод пробы в сепарационный канал; третий столбец — концентрационные профили в центре сепарационного канала в различные моменты времени.

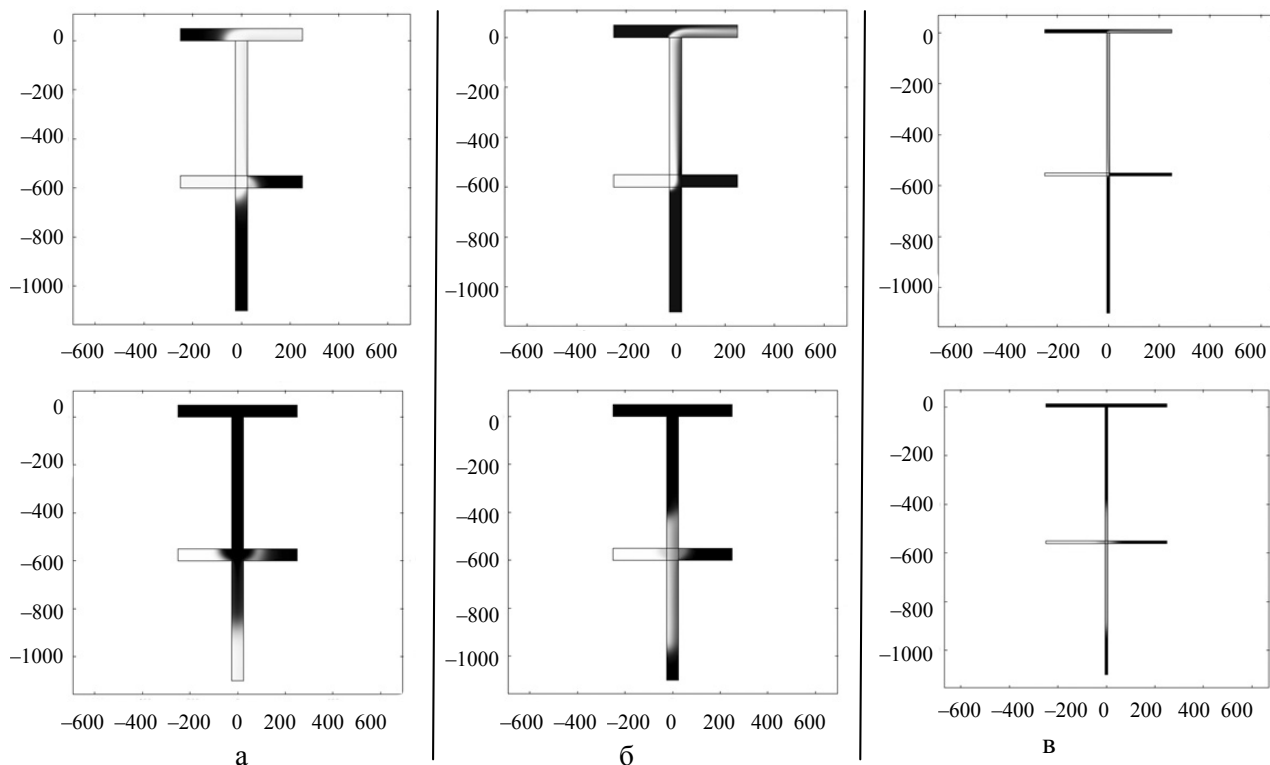


Рис. П2. Распределение концентрационных профилей при загрузке и вводе пробы по схеме "Z-ввода".

Верхний ряд — загрузка пробы; нижний ряд — ввод пробы в сепарационный канал; значения запирающих потенциалов ввода равны по 1 В

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Евстапов А.А., Буляница А.Л., Курочкин В.Е. и др. Экспресс-анализ олигонуклеотидов на планарном микрофлюидном чипе // Журнал аналитической химии. 2004. Т. 59, № 6. С. 587–594.
2. Handbook of capillary and microchip electrophoresis and associated microtechniques / Ed. J.P. Landers. Boca Raton: CRC Press: Taylor & Francis Group, 2008. 1598 p.
3. Encyclopedia of Microfluidics and Nanofluidics / Ed. L. Dongqing. Springer Science+Business Media, LLC, 2008. 2242 p.
4. Heller C. Influence of electric field strength and capillary dimensions on the separation of DNA // Electrophoresis. 2000. V. 21. P. 593–602.
5. Ren L., Sinton D., Li D. Numerical simulation of microfluidic injection processes in crossing microchannels // J. Micromech. Microeng. 2003. V. 13. P. 739–747.
6. Patankar N.A., Hu H. Numerical simulation of electroosmotic flow // Anal. Chem. 1998. V. 70. P. 1870–1881.
7. Большев Л.Н., Смирнов Н.В. Таблицы математической статистики. М: Наука, 1983. С. 50–51.

Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики (Белосов К.И., Евстапов А.А.)

Институт аналитического приборостроения РАН, г. Санкт-Петербург (Евстапов А.А., Буляница А.Л.)

Санкт-Петербургский академический университет — научно-образовательный центр нанотехнологий РАН (Евстапов А.А.)

Санкт-Петербургский государственный политехнический университет (Буляница А.Л.)

Контакты: Буляница Антон Леонидович,
antbulyan@yandex.ru

Материал поступил в редакцию 9.07.2013

SIMULATION OF SAMPLE'S CONCENTRATION DEPENDENCES OF DISTRIBUTION IN CHANNELS OF THE MICROFLUIDIC CHIP WITH ELECTROKINETIC INJECTION

K. I. Belousov¹, A. A. Evstrapov^{1,2,3}, A. L. Bulyanitsa^{2,4}

¹*St. Petersburg National Research University of Information Technologies, Mechanics and Optics*

²*Institute for Analytical Instrumentation of RAS, Saint-Petersburg*

³*St. Petersburg Academic University — Nanotechnology Research and Education Center RAS*

⁴*St. Petersburg State Polytechnical University*

The article deals with simulation of sample's electrokinetic injection in separation channel of the microfluidic chip with the double cross injector's topology, allowing to load the sample in different ways (called as simple "cross", "Z-input", "P-input" [1]). There were used modified Navier—Stokes equation for simulation mass-transfer of buffers and sample, Kirchhoff and Ohms laws for calculation of an electric field's distribution in channels which were solved by finite element method. Herewith the simplified two-dimensional spatial analyte distribution was considered. Analyte was represented as the continuous medium. After modeling there were analyzed the received time and spatial sample's distributions and estimated the influence of control potentials and width of channels on sample's dispersion and heterogeneity. By results of the analysis the modes of injection providing the minimal dispersion of analyzed substance were chose.

Keywords: injector, electrokinetic injection of sample, mass-transfer, control potential, sample's dispersion, sample's heterogeneity, finite element method