

УДК. 57.083

Высокопроизводительная сепарация клеток методом диэлектрофореза в свободном потоке

© 2017 С.Н. ПОДОЙНИЦЫН, О.Н. СОРОКИНА*, М.А. КЛИМОВ, П.Г. ПРОНКИН, О.А. БОЖКОВА, В.А. ЛЕОНОВИЧ, А.Л. КОВАРСКИЙ

ФГБУН «Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля» Российской академии наук, Москва, 119334

e-mail: alsiona@gmail.com*

Поступила 31.01.2017 г.

Принята в печать 06.06.2017 г.

Предложена конструкция сепарационного устройства и метод разделения микробиологических образцов на основе диэлектрофореза в свободном потоке. Принцип работы устройства базируется на формировании диэлектрофоретических барьеров в объеме сепарационной камеры, благодаря чему процесс сепарации отличается высокой производительностью и простотой использования по сравнению с традиционными планарными системами диэлектрофореза. Проведено компьютерное моделирование распределения напряженностей электрических полей и определены области формирования диэлектрофоретических барьеров. На основании данных компьютерного моделирования оценены силы, действующие на частицу (клетку дрожжей диаметром 7 мкм) в сепарационной камере. Экспериментально подтверждены теоретические оценки эффективности сепарации клеток дрожжевых грибов *Saccharomyces cerevisiae* (более 99%) и производительности сепарационного устройства ($2 \cdot 10^5$ кл/с).

Ключевые слова: диэлектрофорез в свободном потоке, дрожжи, сепарация.

doi: 10.21519/0234-2758-2017-33-5-73-82

Возможность манипуляций с биологическими частицами (клетками, вирусами, белками, молекулами ДНК) имеет важное значение для развития биомедицины [1–3], биотехнологии [4] и других областей науки, тесно связанных с биологическими микро- и нанообъектами.

В последние десятилетия для захвата, фокусировки и характеристики микро- и наночастиц наряду с оптическими [5], механическими [6] и магнитными [7] методами все чаще используются методы пространственного управления частицами с помощью электрических полей [8, 9]. Воздействие электрического поля не приводит к серьезному повреждению исследуемых клеток и позволяет эффективно управлять их движением в потоке. Наиболее перспективными электрокинетическими методами манипуляции с биологическими частицами можно назвать электрофорез (ЭФ) [9] и диэлектрофорез (ДЭФ) [8].

Метод диэлектрофореза основан на перемещении микрочастицы в переменном или постоянном неоднородном электрическом поле, вызванном взаимодействием между индуцируемым диполем в микрочастице и внешним электрическим полем. Практически все частицы могут проявлять диэлектрофоретическую активность в присутствии градиентных электрических полей. Метод диэлектрофореза находит применение в таких областях, как клиническая диагностика, лечение различных заболеваний, фармакология, иммунология, биотехнология, разделение клеточных культур и многих других [4, 10, 11].

В настоящее время для сепарации микробиологических объектов методом диэлектрофореза используется ряд подходов, таких как применение ловушек, фракционирование в потоке в присутствии внешнего поля, разделение в бегущей волне, захват на изолирующих структурах,

Список сокращений: ДЭФ – диэлектрофорез, ПО – программное обеспечение; ЭФ – электрофорез.

бесконтактный ДЭФ и ДЭФ барьерного типа [12–17]. Методы диэлектрофореза применяются преимущественно для разделения частиц в свободном потоке. Многочисленные работы посвящены сепарации этими методами эритроцитов, лейкоцитов, клеток раковых новообразований (циркулирующие опухолевые клетки, клетки лейкоза и рака груди), субмикронных биологических частиц (бактерии, дрожжи), стволовых клеток, а также белков и ДНК [18]. Однако существенным недостатком большинства методик ДЭФ-сепарации является их сравнительно невысокая производительность, составляющая около $1 \cdot 10^3$ кл/с (например, для коммерческого сепарационного устройства Aposream® (Arocell, США) и других сепарационных устройств планарного типа) [19]. Низкая производительность обусловлена тем, что конструкция устройств предполагает планарное расположение электродов и электрического поля, и как следствие, малый сепарируемый объем, приходящийся на единицу площади сепарирующих элементов электрода.

В последнее время активно развивается высокопроизводительное направление трехмерного диэлектрофореза, когда структура электродов формируется таким образом, чтобы электрическое поле распространялось по всему объему среды, а не только вдоль плоскости, в которой расположены электроды. Трехмерный ДЭФ позволяет резко увеличить производительность диэлектрофоретических сепараторов и может быть реализован в ДЭФ-устройствах с изолирующими структурами [15] и в аппаратах барьерного типа [17]. Объем сепарируемой жидкости, проходящей через единичный сепарирующий электрод, увеличивается при этом в несколько раз.

Основной принцип работы сепарационного устройства барьерного типа основан на формировании узких (шириной в несколько десятков мкм) барьеров градиентного электрического поля, непроницаемых для частиц, подверженных сильному диэлектрофоретическому воздействию [17, 20].

Цель настоящей работы состояла в конструировании сепарационного устройства барьерного типа повышенной производительности, в котором узкие барьеры градиентного электрического поля формировались бы в объеме сепарационной камеры за счет взаимной ориентации электродов в пространстве, когда один электрод располагается над другим. Ставилась задача дать оценку работоспособности предложенного сепарационного устройства на основе его теоретического и экспериментального исследования.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ДИЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОГО РАЗДЕЛЕНИЯ

На частицу, обладающую диэлектрическим моментом в потоке, проходящем через сепарационную камеру, действуют разнонаправленные силы – диэлектрофоретическая (F_{DEP}) и гидродинамическая сила (влекущая сила потока) (F_{drag}):

$$F_{\text{drag}} = 6\pi R\eta V, \quad (1)$$

где R – радиус частицы, η – динамическая вязкость среды, V – линейная скорость потока.

В переменном неоднородном электрическом поле частицы проявляют разные диэлектрические свойства в зависимости от характеристик этого поля. Величина и направление электрофоретического воздействия находятся в сложной функциональной зависимости от соотношения диэлектрических свойств среды и частицы, формы и размера частицы, а также от частоты внешнего электрического поля. При этом различают «положительный» диэлектрофорез (**п**-ДЭФ), при котором диэлектрофоретическая сила направлена в сторону увеличения напряженности электрического поля и «отрицательный» (**о**-ДЭФ), при котором эта сила направлена в сторону уменьшения напряженности поля. Выбирая соответствующую частоту поля для образца, можно разделить различные типы частиц и сосредоточить их в различных зонах сепарационного устройства. Усредненная во времени диэлектрическая сила, действующая на сферическую частицу, может быть определена из выражения:

$$F_{\text{DEP}} = 2\pi R^3 \varepsilon_0 \varepsilon_m \operatorname{Re} \left[C M_f(\omega) \nabla \right] |E^2|, \quad (2)$$

где R – радиус частицы, ε_0 – диэлектрическая проницаемость вакуума, ε_m – диэлектрическая проницаемость среды, $\nabla |E^2|$ – градиент квадрата напряженности электрического поля, $\operatorname{Re} [C M_f(\omega)]$ – действительная часть константы Клаузиуса–Моссотти ($C M_f$), которая характеризует соотношение диэлектрических свойств среды (ε_m^*) и частицы (ε_p^*):

$$C M_f = \frac{\varepsilon_p^* - \varepsilon_m^*}{\varepsilon_p^* + 2\varepsilon_m^*}. \quad (3)$$

Значение константы $C M_f$ для сферических частиц может варьировать в пределах от 1 до $-0,5$. Для частиц несферической формы этот диапазон

может быть намного шире. Знак перед константой CM_f определяет направление действия диэлектрфоретической силы. Положительные значения константы соответствуют **п**-ДЭФ, отрицательные **о**-ДЭФ.

Значения комплексной диэлектрической проницаемости ϵ_p^* , ϵ_m^* в константе CM_f зависят от электропроводности и частоты приложенного электрического поля следующим образом:

$$\epsilon^* = \epsilon_0 \epsilon - j \frac{\sigma}{\omega}, \quad (4)$$

где ϵ – диэлектрическая проницаемость, σ – электропроводность, ω – угловая частота приложенного электрического поля, $\epsilon\epsilon_0$ – действительная часть диэлектрической проницаемости ϵ^* , $j(\sigma/\omega)$ – мнимая часть ($\sqrt{j} = -1$).

Выражения (3) и (4) пригодны для расчета величины диэлектрфоретического воздействия на частицу с однородными диэлектрическими свойствами по всему объему. Клетки микроорганизмов имеют более сложную структуру и представляют собой многослойную систему, каждый слой которой имеет свои диэлектрические свойства (рис. 1).

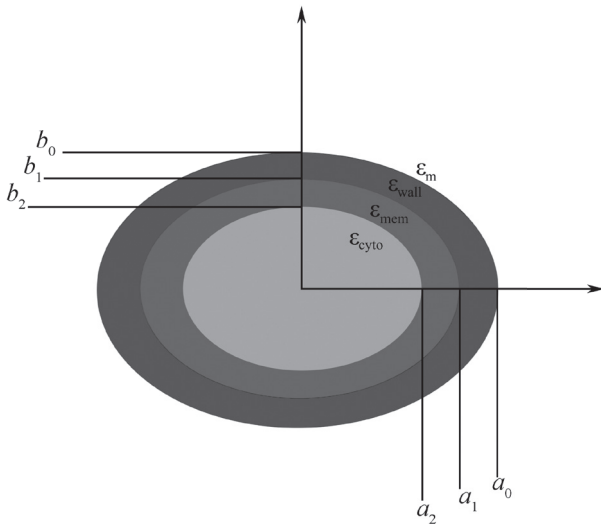


Рис. 1. Модель многослойной клетки эллиптической формы: $a_0, b_0, c_0, a_1, b_1, c_1, a_2, b_2, c_2$ – размеры клеточных оболочек по разным осям координат. $\epsilon_m, \epsilon_{wall}, \epsilon_{mem}$ и ϵ_{cyto} – диэлектрическая проницаемость среды, клеточной стенки, клеточной мембраны и цитоплазмы клетки, соответственно

Fig. 1. A model of multilayer elliptic-shaped cell: $a_0, b_0, c_0, a_1, b_1, c_1, a_2, b_2, c_2$, cell cover sizes along the coordinate axes. $\epsilon_m, \epsilon_{wall}, \epsilon_{mem}, \epsilon_{cyto}$ is dielectric constant of medium, cell wall, cell membrane and cell cytoplasm, respectively

В этом случае для расчета величины ДЭФ-воздействия на модельную многослойную эллиптическую клетку используют модифицированные выражения для константы CM_f [21]:

$$CM_f = \frac{1}{3} \sum_{k=x,y,z} \frac{1}{3} \left(\frac{\epsilon_{1k}^* - \epsilon_m^*}{\epsilon_m^* + (\epsilon_{1k}^* - \epsilon_m^*) A_{0k}} \right), \quad (5)$$

где ϵ_{1k}^* , и ϵ_{2k}^* определяются следующими выражениями:

$$\epsilon_{1k}^* = \epsilon_{wall}^* \frac{\epsilon_{wall}^* + (\epsilon_{2k}^* - \epsilon_{wall}^*) A_{1k} + \lambda_1 (\epsilon_{2k}^* - \epsilon_{wall}^*)}{\epsilon_{wall}^* + (\epsilon_{2k}^* - \epsilon_{wall}^*) A_{1k} - \lambda_1 (\epsilon_{2k}^* - \epsilon_{wall}^*)} \times \frac{(1 - A_{1k})}{(1 - A_{0k})}, \quad (6)$$

$$\epsilon_{2k}^* = \epsilon_{mem}^* \frac{\epsilon_{mem}^* + (\epsilon_{cyto}^* - \epsilon_{mem}^*) A_{2k} + \lambda_2 (\epsilon_{cyto}^* - \epsilon_{mem}^*)}{\epsilon_{mem}^* + (\epsilon_{cyto}^* - \epsilon_{mem}^*) A_{2k} - \lambda_2 (\epsilon_{cyto}^* - \epsilon_{mem}^*)} \times \frac{(1 - A_{1k})}{A_{1k}}. \quad (7)$$

Расшифровку обозначений $\epsilon_m, \epsilon_{mem}, \epsilon_{wall}$ и ϵ_{cyto} см. в подписи к рис. 1. Коэффициенты λ_1 и λ_2 вводятся для учета размерных параметров оболочек клетки по разным осям (как показано на рис. 1) и определяются как:

$$\lambda_1 = \frac{a_1 b_1 c_1}{a_0 b_0 c_0} \quad \lambda_2 = \frac{a_2 b_2 c_2}{a_1 b_1 c_1}. \quad (8)$$

A_{ik} ($i=0, 1, 2$) – фактор деполяризации вдоль каждой координатной оси, который учитывает влияние отклонения формы частицы от сферической на константу CM_f . Для вытянутого сфероида справедливо допущение, что $a_0 > b_0 = c_0$. Тогда фактор может быть вычислен по следующей формуле:

$$A_{ix} = \frac{q_i}{(q_i^2 - 1)^{\frac{3}{2}}} \ln \left\{ q_i + (q_i^2 - 1)^{\frac{1}{2}} \right\} - \frac{1}{q_i^2 - 1}, \quad (9)$$

$$A_{iy} = A_{iz} = \frac{1}{2} (1 - A_{ix}), \quad (10)$$

где q_i – соотношение размерных параметров оболочек клетки равное a_i/b_i .

Эффективное удерживание частиц и управление их движением возможно в случае, когда проекции на направление потока $F_{DEP} \geq F_{drag}$.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Структура и основы функционирования предлагаемого сепарационного устройства

Конструкция разрабатываемого сепарационного устройства состоит из двух пластин с электродами, формирующими сепарационную камеру (100 мм × 30 мм), между которыми расположена тонкая (0,15 мм) диэлектрическая прокладка (рис. 2а). Electrodes имеют структуру мелкой штриховки – чередующихся параллельных токопроводящих линий шириной 100 мкм и диэлектрических промежутков шириной 100 мкм, ориентированных под углом 30° к потоку вводимой суспензии (см. рис. 2а, 2). Рисунок электродов на пластинах получали по технологии печатных плат на фольгированном медью стеклотекстолите.

В объеме сепарационной камеры неоднородности поля, обусловленные парной ориентацией токопроводящих дорожек пластин электродов, формируют множество барьеров высокоградиентного электрического поля (ДЭФ-барьеров).

Разрабатываемое сепарационное устройство имеет одно вводное отверстие для подачи суспензии разделяемых частиц в сепарационную камеру (3) и два выводных отверстия для забора фракций образцов со слабым (4) и сильным (5) ДЭФ-эффектом. Переменный электрический сигнал подается на вводные электроды (2) сепарационного устройства, расположенные на корпусе сепаратора (1).

При работе сепарационного устройства частицы движутся в потоке жидкости, встречая на своем пути ДЭФ-барьеры. Частицы, обладающие сильным ДЭФ-эффектом задерживаются на барьере и смещаются вдоль него под действием суммарного вектора сил F_{DEP} и F_{drag} (рис. 2б). Частицы со слабой или нулевой ДЭФ-активностью, могут свободно преодолевать эти барьеры вместе

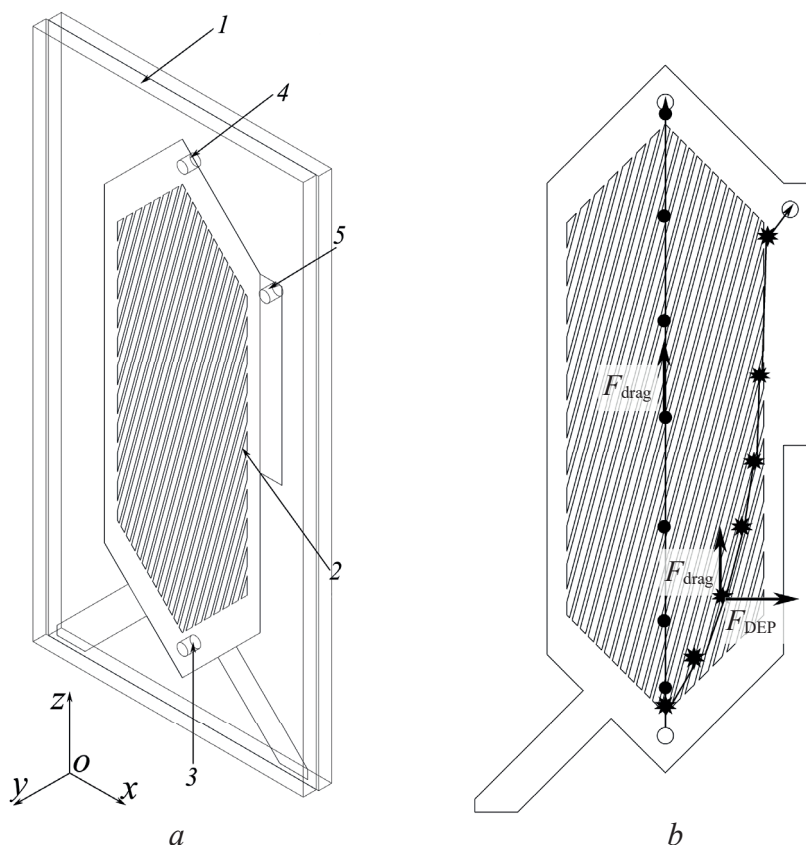


Рис. 2. Общий вид устройства для ДЭФ-сепарации в свободном потоке (а) и схема распределения векторов сил, действующих на частицу со слабым (кружок) и сильным (звездочка) ДЭФ-эффектом в потоке сепарационной камеры (б). 1 – корпус устройства, 2 – электроды, 3 – входное отверстие, 4 и 5 – выходные отверстия для фракции со слабым и сильным ДЭФ-эффектом, соответственно

Fig. 2. (a), General view of device for DEP separation in free flow: (1) device body; (2), electrodes; (3), inlet; (4) and (5), outlets for fraction with weak and strong DEP effect, respectively. (b), Scheme for distribution of vectors of forces acting on a particle with weak (circle) and strong (asterisk) DEP effect in separation chamber flow

с потоком, не отклоняясь от исходного направления. Таким образом, происходит пространственное разделение потоков частиц с различными диэлектрофоретическими свойствами.

Направление гидродинамического потока и ДЭФ-барьер образуют малый угол θ , что позволяет увеличить эффективность сепарационного устройства за счет ослабления действия влекущей силы потока на частицу в соответствии с выражением:

$$F_{\text{drag}} = 6\pi R\eta V \sin(\theta). \quad (11)$$

Преимуществом предложенной конфигурации проводников является то, что ДЭФ-активные частицы, преодолевшие один ДЭФ-барьер, могут быть захвачены на последующих. Это позволяет увеличить расстояние между пластинами с проводниками и соответственно повысить производительность сепаратора. Предлагаемая конструкция также делает возможным расширение круга потенциальных объектов разделения за счет изменения геометрических параметров электродов и самой камеры: уменьшая зазор между пластинами сепаратора и, следовательно электродами, можно снижать размер потенциально разделяемых объектов.

Конструкция и условия функционирования сепарационной установки

Установка для ДЭФ-сепарации включает описанное выше сепарационное устройство, подключенное к системе подачи образца и электрического сигнала.

Входное отверстие сепарационной камеры с помощью трубок соединяется с системой подачи образца, которая состоит из шприца, установленного в инфузионный насос (ДШ-1, Россия). Последний используется для регулирования скорости подачи пробы в диапазоне 1–40 мл/ч. Для тестовых экспериментов была выбрана максимальная скорость подачи.

Напряжение в системе создается при помощи генератора переменного напряжения UNI-T (UTG9010C, Uni-Trend Technology Ltd, Китай), клеммы которого подключают к электродам сепаратора (рис. 2а, 2). Генератор позволяет устанавливать частоту напряжения от 1 Гц до $1 \cdot 10^8$ Гц и амплитуду – в интервале 0,01–20 В. В настоящей работе устанавливали частоту, равную 100 кГц, амплитуду – 20 В, а форму импульса использовали прямоугольную (меандр). Контроль амплитуды и частоты осуществляли при помощи цифрового осциллографа OWON HDS2062-MN (OWON Technology Inc., Китай).

Подготовка и анализ проб

Клетки дрожжевых грибов *Saccharomyces cerevisiae* («САФ-НЕВА»-LESAFFRE, Россия) были выбраны в качестве объекта для тестирования возможностей высокопроизводительного метода ДЭФ-сепарации в свободном потоке, так как они представляют собой удобную и хорошо охарактеризованную модель для тестирования новых ДЭФ-устройств. Навеску 10 мг замороженных дрожжевых клеток нагревали до комнатной температуры и растворяли в 20 мл деионизованной воды (Milli-Q). Концентрация клеток дрожжей в исходном образце составляла $1,56 \cdot 10^7$ кл/мл, по данным спектра поглощения (см. ниже). Средний диаметр дрожжевых клеток был равен 7 мкм.

Изменение относительной концентрации клеток в суспензии в процессе сепарации определяли спектрофотометрически по методу, предложенному в работе [22]. Ранее было показано, что спектрофотометрический метод демонстрирует хорошую корреляцию ($r = 0,980$) с методом прямого подсчета окрашенных клеток под микроскопом [23]. Спектр поглощения образцов измеряли на спектрофотометре СФ-2000 (Россия) в стандартных (1 см) кварцевых кюветах; концентрацию клеток оценивали при длине волны 655 нм, согласно [22].

В соответствии с паспортными данными, предел допустимого значения погрешности спектрофотометра СФ-2000 при измерении спектральных коэффициентов направленного пропускания не превышает 1%. Относительная погрешность измерений спектра поглощения образцов, рассчитанная с учетом коэффициента Стьюдента для восьми измерений с доверительным интервалом 0,98 ($t_{0,98;8} = 3$), не превышала 2%.

Компьютерное моделирование сепарационного процесса

Эффективность работы сепарационного устройства зависит от величины и пространственного распределения электрического поля в сепарационной камере, соотношения диэлектрических свойств среды и объекта, а также от гидродинамических условий разделения.

Было проведено компьютерное моделирование сепарационного процесса, включающее расчеты пространственного распределения напряженности электрического поля в зазоре сепарационной камеры, константы Клаузиуса–Моссотти для определения диэлектрофоретических свойств объекта сепарации, а также расчеты

пространственного распределения диэлектростатической и гидродинамической сил, действующих на объект сепарации, с целью их последующего сравнения, позволяющего качественно оценить эффективность сепарации.

Распределение электрического поля в камере зависит от геометрических параметров сепарирующего элемента, таких как расстояние между пластинами, ширина токопроводящих дорожек электрода, расстояние между соседними дорожками на пластине и их взаимное расположение, а также от диэлектрических свойств материала. С использованием средств компьютерного моделирования (ПО EICut, ООО «ТОР» Россия) были получены численные значения и визуальные изображения пространственного распределения напряженности электрического поля между электродами в зазоре сепарационной камеры рабочего образца сепарационного устройства при ориентации токопроводящих дорожек друг напротив друга. Для расчета распределения была создана двумерная модель поперечного сечения сепарационной камеры с токопроводящими дорожками шириной 100 мкм, расположенными на расстоянии 100 мкм друг от друга; расстояние между электродами составляло 150 мкм. Материалом пластин служил стеклотекстолит, материалом электродов – медь, средой между пластинами – вода. Расчет проводили методом конечных элементов в двумерном приближении в рамках электростатической модели при разности потенциалов между электродами противоположных пластин 20 В. Сетка конечных элементов (5163 узлов) строилась автоматически без адаптивного уточнения. На рис. 3 приведены изолинии напряженности электрического поля в сечении сепарационной камеры.

По мере приближения к углам дорожек градиент электрического поля резко увеличивается и достигает максимальных значений в углу дорожки (см. рис. 3). Таким образом, основной градиент электрического поля формируется на углах токопроводящих дорожек и убывает по направлению к центру канала. В результате при взаимной ориентации дорожек друг напротив друга формируются коридоры с резко убывающей или резко возрастающей напряженностью электрического поля. Границы этих коридоров представляют собой барьеры градиентного электрического поля (см. рис. 3). Следовательно, каждая пара токопроводящих дорожек создает по два барьера, в зоне которых напряженность электрического поля резко возрастает.

Частицы, отличающиеся по диэлектрическим свойствам от среды, задерживаются на барьере градиентного электрического поля. Частицы с отрицательными диэлектростатическими свойствами (σ -ДЭФ) не проникают в область барьера, а двигаются снаружи вдоль него. Частицы с положительными диэлектростатическими свойствами (π -ДЭФ) наоборот, втягиваются в область максимально градиентного электрического поля (градиентный барьер) и перемещаются внутри нее. Поскольку π -ДЭФ частицы двигаются в сторону увеличения напряженности электрического поля, при перемещении с внутренней стороны барьера такие частицы демонстрируют тенденцию к притяжению к тем стенкам сепарационной камеры, в области которых, согласно компьютерной модели, электрическое поле максимально. Частицы с σ -ДЭФ при движении вдоль барьера, наоборот, выталкиваются за градиентный барьер в объем жидкости и к другим

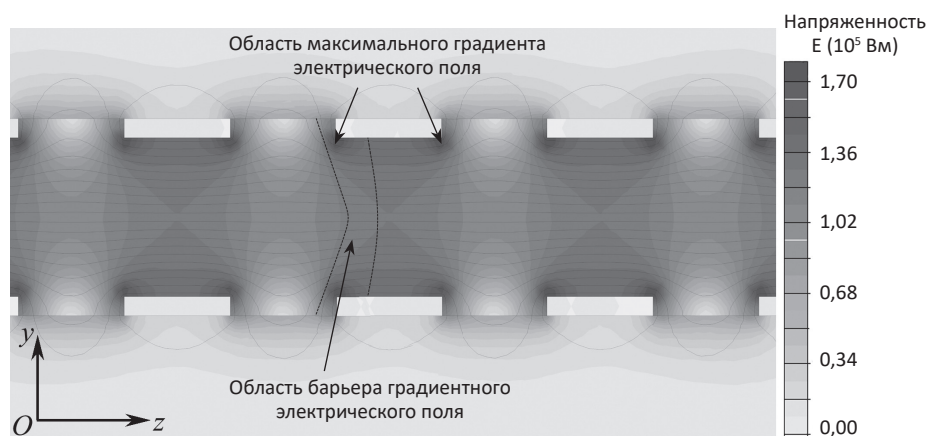


Рис. 3. Распределение напряженности электрического поля в зазоре сепарационной камеры рабочего образца сепарационного устройства.

Fig. 3. Distribution of electric field strength in clearance of separation chamber of separation device working sample

Диэлектрические характеристики оболочек клетки *Saccharomyces cerevisiae* [24]

Dielectric characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* cell covers [24]

Свойства	Клеточная стенка	Плазматическая мембрана	Цитоплазма
Диэлектрическая проницаемость (ϵ)	60	6	50
Электропроводность (σ), (Ом м) ⁻¹	0,014	$3 \cdot 10^{-6}$	0,45
Толщина, нм	100	7	3400

областям на стенках сепарационной камеры, где, согласно компьютерной модели, электрическое поле минимально.

Клетки дрожжевых грибов *Saccharomyces cerevisiae* можно рассматривать как сферу диаметром 7 мкм, состоящую из нескольких оболочек с разными диэлектрическими свойствами (см. рис. 1). Диэлектрические свойства отдельных оболочек клетки *Saccharomyces cerevisiae* описаны в табл. 1.

Расчетный параметр константы Клаузиуса–Моссотти (уравнения (4)–(10)), полученный в рамках модели многослойной клетки [21] для *Saccharomyces cerevisiae* в деионизованной воде

($\epsilon_m = 78$, $\sigma_m = 0,0001$ (Ом м)⁻¹) при частоте 100 кГц, составляет $CM_f = 0,86$. Это свидетельствует о том, что клетки дрожжей в условиях эксперимента обладают положительным ДЭФ-эффектом, а значит, будут втягиваться в область увеличения напряженности поля с тенденцией к осаждению на стенках сепарационной камеры.

Оценку параметров сил, действующих на клетку *Saccharomyces cerevisiae* в сепарационном устройстве (F_{DEP} и F_{drag}), проводили согласно уравнениям (2) и (11), соответственно, исходя из значений градиента напряженности электрического поля, рассчитанных по данным компьютерного моделирования (см. рис. 3). Для расчетов был выбран участок размером 100 мкм × 150 мкм по оси Y и Z, соответственно, включающий в себя область проводящей дорожки электрода (50 мкм) и пространства без проводника (50 мкм), с целью более наглядной визуализации барьера градиентного электрического поля, формирующегося между электродами. Градиент электрического поля рассчитывали в направлении движения основного потока жидкости вдоль оси Z. Расчет влекущей гидродинамической силы (F_{drag}) производился в приближении к ламинарному течению со средней линейной скоростью потока 250 мкм/с. Ламинарный поток между двумя пластинами можно рассматривать в рамках модели течения Пуазейля, когда профиль линейных скоростей потока представляет собой параболу с максимумом в центральной части канала, при этом $V_{max} \approx 2V_{cp}$. На рис. 4 показаны профили силы ДЭФ и влекущей силы потока, действующих на частицу в канале сепарационной камеры.

Из рис. 4 видно, что при заданных условиях моделирования практически по всему профилю канала сила ДЭФ-воздействия превалирует над гидродинамической силой потока, действующей на частицу радиусом 3,5 мкм. Лишь небольшое число клеток может преодолеть барьер ДЭФ-сил. Кроме того, наличие множества барьеров должно

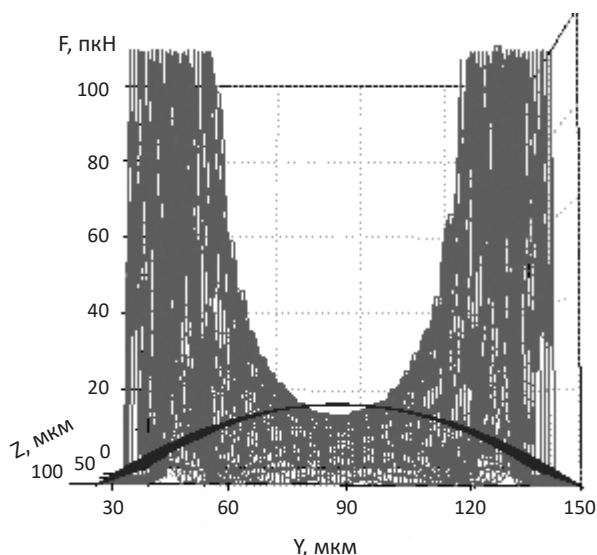


Рис. 4. Трехмерное изображение профилей сил, действующих в потоке на клетку дрожжей радиусом 3,5 мкм в процессе диэлектрфоретической сепарации. Черная поверхность – гидродинамическая сила потока, влекущая частицу; серая поверхность – сила диэлектрфоретического воздействия

Fig. 4. 3D depiction of profiles acting in flow on yeast cell with radius of 3.5 μ during dielectrophoretic separation. Black area, hydrodynamic flow force that drags a particle; grey area, dielectric force

Содержание клеток *Saccharomyces cerevisiae* в исходном образце и фракциях, полученных в результате ДЭФ-сепарации

Saccharomyces cerevisiae cell content in starting sample and fractions after DEP-separation

Фракция	Концентрация клеток	
	мл ⁻¹	% (от исходной)
Исходная	1,562(31) · 10 ⁷	100 ± 2
Фильтрат 1	1,101(55) · 10 ⁵	0,70 ± 2
Фильтрат 2	1,105(55) · 10 ⁵	0,71 ± 2
Смыв 1	1,953(23) · 10 ⁷	125 ± 3
Смыв 2	2,281(27) · 10 ⁷	146 ± 3
К	1,382(28) · 10 ⁷	88 ± 3

Примечание: К – проба, полученная от ДЭФ-сепарации в отсутствие электрического поля (sample obtained during DEP separation in the absence of electric field).

повышать эффективность сепарации, так как частицы, преодолевшие один барьер, могут перераспределяться в пространстве и удерживаться на следующем барьере, попав в область, где ДЭФ-воздействие вновь превышает эффект гидродинамической силы потока. Таким образом, результаты теоретического моделирования демонстрируют возможность эффективного задерживания дрожжевых клеток данным сепарационным устройством при заданных условиях.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Подготовленную суспензию дрожжевых клеток объемом 10 мл подавали в камеру сепарационного устройства со скоростью 40 мл/ч. Было проведено два независимых эксперимента по ДЭФ-концентрированию клеток. В каждом эксперименте отбирали по одной фракции фильтрата, и по одной фракции концентрата (смыва), при этом 1-я фракция и 1-й смыв соответствуют эксперименту 1, 2-я фракция и 2-й смыв – эксперименту 2 (см. ниже).

1-ю и 2-ю фракции объемом по 2,5 мл отбирали из выходного отверстия для частиц со слабым ДЭФ-эффектом (рис. 2а, 4) после прокачки суспензии клеток через сепаратор при включенном электрическом поле (фракции фильтрата 1 и 2). Частицы, подвергавшиеся значительному ДЭФ-воздействию, концентрировались в сепарационной камере в специальном «депо» и выводились через предназначенное для них выходное отверстие (рис. 2а, 5) уже после отключения электрического поля путем вымывания из сепарационной камеры остатками сепарируемой суспензии. Таким образом были получены две фракции концентрата по 2,5 мл каждая (смывы 1 и 2). Смыв 1 получали при прокачке суспензии со скоростью, соответствующей скорости сепарации – 40 мл/ч, смыв 2 – при прокачке с большой скоростью – до 1800 мл/ч. Результаты сепарации сведены в табл. 2.

По данным спектрофотометрических измерений, во фракциях фильтрата 1 и 2 оставалось менее 1% клеток, т.е. в сепарационной камере задерживалось более 99% биомассы. Концентрация клеток, содержащихся во фракциях концентрата (смыв 1 и 2), при этом увеличилась по сравнению с исходной суспензией клеток до 125% и 146%, соответственно. Потеря части клеток, вероятно, являлась следствием их осаждения на электродах сепарационной установки. Характерно, что в контроле (при сепарации без электрического поля)

наблюдали потерю 12% клеток за счет их седиментации и осаждения на стенках сепарационного устройства.

Высокие показатели эффективности задерживания клеточной суспензии в сепарационной камере, полученные в эксперименте, качественно соответствуют теоретическому анализу, предсказавшему превалирование диэлектрофоретических сил, удерживающих частицу в камере, над влекущей силой потока. Производительность метода (количество сепарируемых клеток, деленное на время сепарации для испытанного устройства) составила $2 \cdot 10^5$ кл/с.

Таким образом, клетки *Saccharomyces cerevisiae* были выделены из среды методом диэлектрофореза в свободном потоке с использованием сепарационного устройства барьерного типа. Эффективность задерживания клеток сепарационным устройством составила ~ 99%; предложенный метод сепарации отличается высокой производительностью и простотой использования. Разработанный способ ДЭФ-сепарации в свободном потоке может оказаться перспективным для разделения биологических объектов различного типа.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант № 16-08-00704.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hsiung L.-C., Chiang C.-L., Wang C.-H., et al. Dielectrophoresis-based cellular microarray chip for anticancer drug screening in perfusion microenvironments. *Lab. Chip.*, 2011, 11, 2333–2342. doi: 10.1039/C1LC20147F.
2. Laux E.M., Kaletta U.C., Bier F.F., et al. Functionality of dielectrophoretically immobilized enzyme molecules. *Electrophoresis*, 2014, 35, 459–466. doi: 10.1002/elps.201300447
3. Ivanoff C.S., Hottel T.L., Garcia-Godoy F. Dielectrophoresis: A model to transport drugs directly into teeth. *Electrophoresis*, 2012, 33, 1311–1321. doi: 10.1002/elps.201100505
4. Pethig R., Markx G.H. Applications of dielectrophoresis in biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 1997, 15, 426–432. doi: 10.1016/S0167-7799(97)01096-2
5. Huang S.-B., Wu M.-H., Lin Y.-H., et al. High-purity and label-free isolation of circulating tumor cells (CTCs) in a microfluidic platform by using optically-induced-dielectrophoretic (ODEP) force. *Lab. Chip.*, 2013, 13, 1371–1383. doi: 10.1039/C3LC41256C
6. Shenoy A., Tanyeri M., and Schroeder C.M. Characterizing the performance of the hydrodynamic trap using a control-based approach. *Microfluid Nanofluid.*, 2015, 18, 1055–1066. doi: 10.1007/s10404-014-1495-7
7. Podoyntsyn S.N., Sorokina O.N., Kovarski A.L. High-gradient magnetic separation using ferromagnetic membrane. *J. Magn. Magn. Mater.*, 2016, 397, 51–56. doi: 10.1016/j.jmmm.2015.08.075
8. Gupta V., Jafferji I., Garza M., et al. ApoFlow™, a new dielectrophoretic device for antibody independent isolation and recovery of viable cancer cells from blood. *Biomicrofluidics*, 2012, 6(2), 024133. doi: 10.1063/1.4731647
9. Turgeon R.T., Bowser M.T. Micro free-flow electrophoresis: theory and applications. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2009, 394 (1), 187–198. doi: 10.1007/s00216-009-2656-5
10. Yahya W.N., Kadri N.A., and Ibrahim F. Cell patterning for liver tissue engineering via dielectrophoretic mechanisms. *Sensors (Basel)*. 2014, 14(7), 11714–11734. doi: 10.3390/s140711714
11. Braff W.A., Willner D., Hugenholtz P., et al. Dielectrophoresis-based discrimination of bacteria at the strain level based on their surface properties. *PLoS One*, 2013, 8, e76751. doi: 10.1371/journal.pone.0076751.
12. Markx G.H., Huang Y., Zhou X-F., et al. Dielectrophoretic characterization and separation of micro-organisms. *Microbiology*, 1994, 140, 585–591. doi: 10.1099/00221287-140-3-585
13. Vykoukal J., Vykoukal D.M., Freyberg S., et al. Enrichment of putative stem cells from adipose tissue using dielectrophoretic field-flow fractionation. *Lab. Chip.* 2008, 8, 1386–1393. doi: 10.1039/B717043B
14. Liu D., Garimella S.V. Microfluidic pumping based on traveling-wave dielectrophoresis. *CTRC Res. Publ.*, 2009, Paper 120, 1–43. <http://dx.doi.org/10.1080/15567260902892713>
15. Lapizco-Encinas B.H., Cummings B.A., Simmons E.B., et al. Dielectrophoretic concentration and separation of live and dead bacteria in an array of insulators. *Anal. Chem.* 2004, 76 (6), 1571–1579. doi: 10.1021/ac034804j
16. Čemažar J., Douglas T.A., Schmelz E.M., et al. Enhanced contactless dielectrophoresis enrichment and isolation platform via cell-scale microstructures. *Biomicrofluidics*, 2016, 10, 014109. doi: 10.1063/1.4939947
17. Dürr M., Kentsch J., Müller T., et al. Microdevices for manipulation and accumulation of micro- and nanoparticles by dielectrophoresis. *Electrophoresis*, 2003, 24, 722–731. doi: 10.1002/elps.200390087
18. Qian Ch., Huang H., Chen L., et al. Dielectrophoresis for Bioparticle Manipulation. *Int. J. Mol. Sci.* 2014, 15, 18281–18309. doi:10.3390/ijms151018281
19. Pethig R., Dielectrophoresis: Status of the theory, technology, and applications, *Biomicrofluidics*, 2010, 4, 022811-1 – 022811-35. doi:10.1063/1.3456626
20. Lee D., Hwang B., Choi Y., et al. Negative dielectrophoretic force based cell sorter with simplified structure for high reliability. *Int. J. Precision Eng. Manufact.*, 2016, 17 (2), 247–251. doi: 10.1007/s12541-016-0032-x
21. Park S., Zhang Y., Wang T.-H., et al. Continuous dielectrophoretic bacterial separation and concentration from physiological media of high conductivity. *Electronic Suppl. Material (ESI) Lab. Chip.* 2011, 11, 2893–2900. doi: 10.1039/c1lc20307j
22. Price J.A.R., Butt J.P.H., and Pethig R. Applications of a new optical technique for measuring the dielectrophoretic behaviour of micro-organisms. *Biochim. Biophys. Acta*, 1988, 964, 221–230. doi: 10.1016/0304-4165(88)90170-5
23. Markx G.H., Talary M.S., Pethig R. Separation of viable and nonviable yeast using dielectrophoresis. *J. Biotechnol.*, 1994. V. 32. P. 29–37. doi: 10.1016/0168-1656(94)90117-1
24. Fikar P., Babuska V., Georgiev V., et al. Dependence of dielectrophoretic forces on membrane proteins. Poster presented at The Sixth International Meeting on Synthetic Biology, London, Great Britain 2013.

High-Productive Cell Separation by Dielectrophoresis in Free Flow

S.N. PODOYNITSYN, O.N. SOROKINA*, M.A. KLIMOV, P.G. PRONKIN, O.A. BOZHKOVA, V.A. LEONOVICH, and A.L. KOVARSKI

The Emanuel Institute for Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, 119334, Moscow Russia

*e.mail: alsiona@gmail.com**

Received January 31, 2017

Accepted June 06, 2017

Abstract—A construction of a stationary device and method for separation of microbiological samples on the basis of dielectrophoresis in the free flow have been suggested. The principle underlying the method is the formation of dielectrophoretic barriers in the volume of separation chamber which enhances the productivity of the process and makes it simpler as compared to the existing conventional systems of planar dielectrophoresis. The computer modeling of distribution of electric fields intensities was performed, and the areas of dielectric barrier formation were determined. The effect of forces on a particle (yeast cell 7 μ in diameter) in the separation chamber was assessed using the data of the computer modeling. The high efficiency of *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells separation by the device (> 99%) and its high productivity (2.5 cell/s) were theoretically predicted and experimentally confirmed.

Key words: dielectrophoresis in the free flow, yeast, separation.

Acknowledgements—The work was financially supported by the Russian Foundation for Basic Research, Grant 16-08-00704.

doi: 10.21519/0234-2758-2017-33-5-73-82