

LABORATORIJ NA ČIPU

TADEJ MEŽNARŠIČ

Fakulteta za matematiko in fiziko
Univerza v Ljubljani

V članku je predstavljena tehnologija laboratorija na čipu. Najprej povem nekaj o zgodovinskem razvoju tega področja raziskovanja. Nato se omejim na čipe, ki temeljijo na kapljični mikrofluidiki, in bolj poglobljeno opišem fizikalne koncepte, na katerih temelji ta tehnologija, npr. površinsko napetost, viskoznost, dielektroforezo, Marangonijev efekt, itd. Na koncu sledi opis uporabe teh čipov pri izdelavi posebnih materialov ter raziskavah celic, biomolekularnih procesov in elastičnih lastnosti vlaken.

LAB ON A CHIP

In this paper I present lab-on-a-chip technology, starting with short history overview of the subject. Then I limit the discussion to droplet based microfluidics, focusing on in depth explanation of physical phenomena on which the technology is based, e.g. surface tension, viscosity, dielectrophoresis, Marangoni effect etc. I conclude the paper with examples of useful applications of droplet based microfluidics in material science and research of biomolecular processes, cells and elastic properties of fibres.

1. Uvod

Laboratorij na čipu je nekaž kvadratnih centimetrov velika ploščica, s katero si znanstveniki pomagajo pri analizi kemijske sestave tekočin, raziskavah celic, spoznavanju fizikalnih lastnosti polimernih molekul itd. [1] Osnovna ideja je miniaturizacija zapletenega laboratorijskega procesa na čip, da bi proces pospešili in zmanjšali potrebno količino vzorca ter porabo reagentov. Takšen čip procesira zelo majhne volumne tekočine (10^{-9} do 10^{-18} L). Tehnologija laboratorija na čipu temelji na mikrofluidiki, vedi o obnašanju tekočin v ozkih kanalih premera nekaž deset do nekaž sto mikrometrov [1]. V tako ozkih ceveh ne pride do turbulence in konvekcije, zato imamo le laminarne tokove in posledično se tekočine mešajo le zaradi difuzije, kar pomeni zelo počasi.

Mikrofluidika se je začela razvijati že v petdesetih letih prejšnjega stoletja s tehnologijo pršenja pikolitrov tekočine, kar se je kasneje razvilo v tehnologijo inkjet tiskanja [2]. V osemdesetih letih so razvili razne teste, ki so temeljili na kapilarnih silah. Po tankih cevčicah pripeljejo vzorec do reagenta, ki se potem odzove, glede na vsebino vzorca. Primeri takšnih testov so test nosečnosti, testi za droge, biološko orožje itd. To je vodilo v razvoj vedno boljših metod za upravljanje s tekočinami, ki omogočajo izvajanje zapletenih biomolekularnih procesov, kot je DNK sekvenčenje in celo proučevanje živih celic.

Sprva so čipe izdelovali, po zgledu elektronike, iz silicija in stekla, dandanes pa se večinoma uporablja elastomere, kot je PDMS (polidimetilsiloksan) [1]. Tega najpogosteje uporabljajo, ker je prozoren tako za vidno, kot tudi za ultravijolično svetlobo in ker je porozen za pline, kar je še posebej uporabno pri proučevanju živih celic.

Mikrofluidika obsega širok razpon metod za upravljanje s tekočinami za različne namene uporabe. Omejil se bom na kapljično mikrofluidiko, kjer so kapljice ene snovi razpršene v drugi snovi (emulzija). Najprej bom opisal, kako ustvarimo kapljice, nato nekaj o manipulaciji kapljic v mikrofluidnem vezju in na koncu še o uporabnih aplikacijah kapljične mikrofluidike v znanosti.

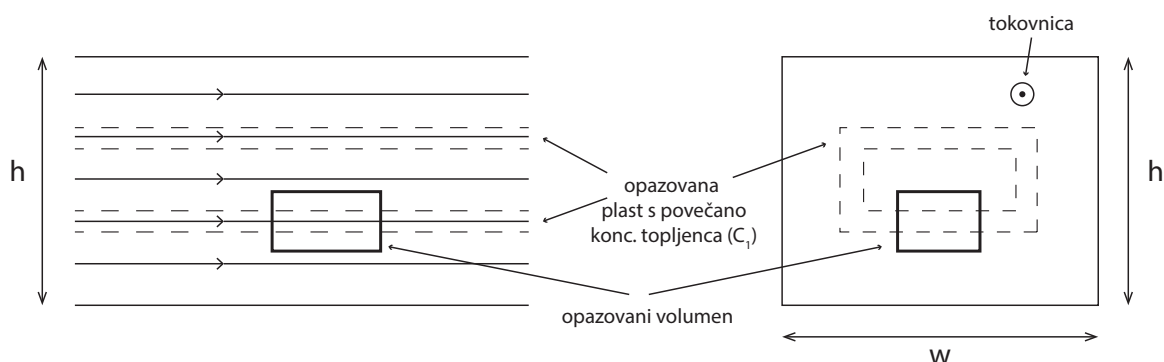
2. Kapljična mikrofluidika

Reynoldsovo število je brezdimenzijska količina v dinamiki tekočin, ki pove ali je tok tekočine laminaren ali turbulenten [3]. Definirano je kot

$$Re = \frac{\rho v_0 L_0}{\eta}, \quad (1)$$

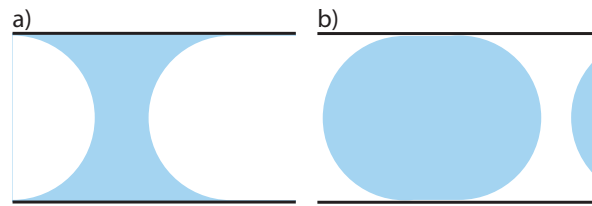
kjer je ρ gostota tekočine, v_0 hitrost toka, L_0 karakteristična dolžina in η viskoznost tekočine. Če je $Re < 1$ je tok laminaren, če je $Re > 1000$ pa je tok turbulenten. V mikrofluidnih vezjih imajo kanali največkrat pravokoten presek (slika 1) in za L_0 izberemo najmanjšo dimenzijo kanala (na sliki 1 je to h) [3].

Če imamo tok tekočine v mikrofluidnem vezju, je zaradi majhnih prečnih dimenzij kanalov (do nekaj $100 \mu\text{m}$) in majhnih hitrosti (običajno okoli 10 mm s^{-1}) Reynoldsovo število majhno (< 1 za vodo), kar pomeni, da je tok laminaren [4]. To pomeni, da so tokovnice vzporedne stenam kanala in tok lahko razdelimo na tanke vzporedne plasti. Molekule tekočine (ali snovi raztopljeni v tekočini) lahko med plastmi prehajajo edino z difuzijo. Predpostavimo, da imamo v eni plasti večjo koncentracijo topljenca (C_1) kot v okoliških plasteh (slika 1). Če spremljamo majhen volumen tekočine v okolici te plasti, ko se giblje vzdolž kanala, bomo opazili, da se koncentracija topljenca v opazovani plasti zmanjšuje po difuzijski enačbi ($\partial C_1 / \partial t = D \nabla^2 C_1$, D je difuzijska konstanta). Ker je molekularna difuzija počasen proces, se bo topljenec šele po dolgotrajnem potovanju po mikrofluidnem kanalu enakomerno razporedil preko celotnega preseka kanala - tekočina se bo počasi zmešala.



Slika 1. Na levi je stranski pogled na kanal, kjer so s puščicami označene tokovnice in s črtkano plast, ki jo opazujemo. Na desni je prečni presek, kjer je w širina, h višina kanala. S črnim pravokotnikom je označen volumen, ki ga opazujemo, ko se premikamo vzdolž kanala.

Ker običajno želimo imeti že od začetka dobro zmešano tekočino, je bolje tok razdeliti na krajše segmente. To storimo s kapljicami tekočine, ki se ne meša z našo tekočino (npr. kapljice olja v vodi) ali pa z mehurčki plina (slika 2a, naša tekočina je prikazana z modro barvo). V tako razdeljenem toku se tekočina v posameznih segmentih dobro premeša zaradi konvekcijskih sil, ki povzročijo krožne tokove, med segmenti pa skorajda ni mešanja, saj so povezani le prek ozke plasti ob stenah kanala. Če pa želimo izvajati kemijske reakcije, pri kateri nastajajo geli (zanje je značilno, da se prilepijo se na stene kanalov) in se želimo izogniti še mešanju med segmenti preko obstenske plasti, moramo uporabiti obraten pristop. Našo tekočino moramo v obliki kapljic razpršiti v nosilno tekočino, ki se z našo ne meša (slika 2b). Na ta način se izognemo stikanju kapljic s stenami kanala in drugimi kapljicami. Temu pristopu pravimo kapljična mikrofluidika. [4] Seveda moramo tudi tukaj paziti, da nimamo v naši tekočini raztopljenih molekul, ki so topne tudi v nosilni tekočini, saj bi drugače z difuzijo prehajale med kapljicami.



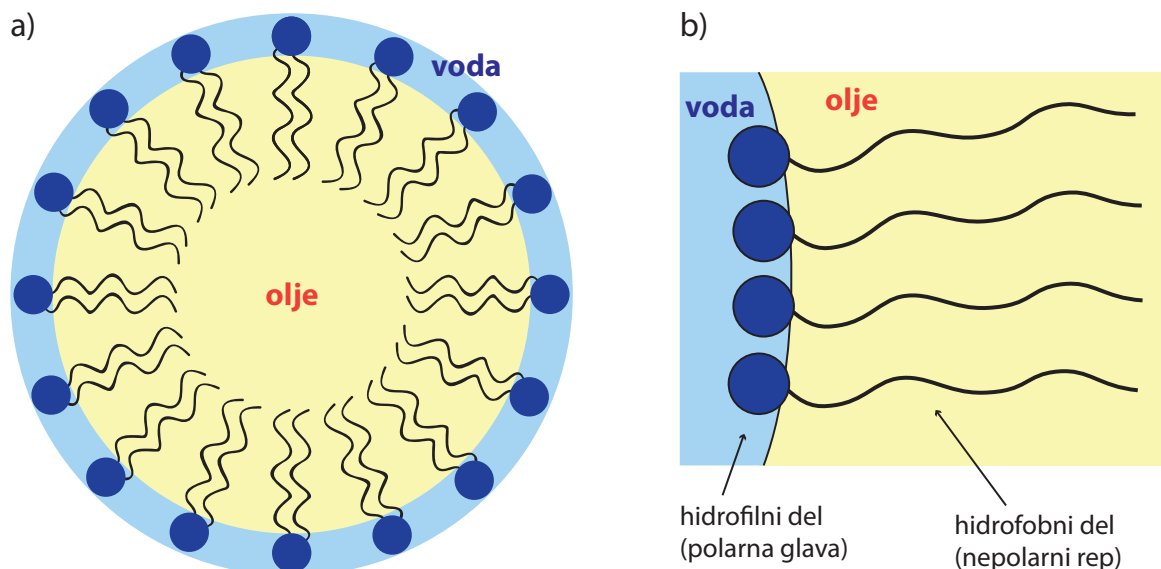
Slika 2. a) Tok razdeljen z mehurčki oziroma kapljicami druge tekočine, b) kapljična mikrofluidika. Vir: [4].

2.1 Ustvarjanje kapljic

Kapljična mikrofluidika temelji na visokofrekvenčni proizvodnji kapljic točno določenih velikosti. Kapljice nastajajo predvsem zaradi površinskih nestabilnosti, ki nastanejo kot posledica oblike kanalov. Da bi preprečili neželeno združevanje kapljic, in da bi bile vse kapljice enako velike, v nosilno tekočino pogosto dodajo površinsko aktivno snov, t. j. snov, ki vpliva na površinsko napetost (npr. emulgatorji).

Molekule takšnih snovi so sestavljene iz dveh delov: polarne glave in nepolarnega repa. Polarni del je hidrofilen, kar pomeni, da se bo na meji vode in olja obrnil proti vodi. Nepolarni del pa je hidrofoben in se obnaša ravno obratno (slika 3a). Površinsko aktivne snovi zmanjšajo površinsko napetost, ko se adsorbirajo na površino (slika 3b), in s tem olajšajo nastanek kapljic in jih stabilizirajo.

Glavna zahteva pri produkciji kapljic je homogenost njihove velikosti (monodisperznost).



Slika 3. a) Mehurček olja v vodni raztopini stabiliziran z emulgatorjem. Modre pike so polarne glave molekul emulgatorja, črne vijuge pa so nepolarni repi. Vir: [5]. b) Še en primer površinsko aktivne snovi. Tu je vodna kapljica v olju stabilizirana ravno obratno kot na levi sliki. Vir: [4]

2.1.1 Energija pri ustvarjanju kapljic

Definirajmo površinsko energijo kot $E = \gamma S$, kjer je γ površinska napetost med dvema snovema in S velikost stične površine. Površinsko energijo imajo tako površine med dvema tekočinama, kot tudi stiki tekočine in trdne stene kanala.

Želimo narediti tako napravo, da bo iz dveh neprekinjenih tokov dveh različnih tekočin ustvarila emulzijo kapljic ene tekočine (dispergirana faza) v drugi (zvezna faza ali nosilna tekočina), kot je prikazano na sliki 4a. To zahteva vložek energije, saj ima vsaka kapljica v končnem stanju zaradi površinske napetosti večjo energijo, kot jo je imel isti volumen tekočine pred procesom.

Površinske energije posameznih korakov procesa oblikovanja kapljic so prikazane na sliki 4b, kjer je E_i površinska energija začetnega stanja (dva neprekinjena tokova) in E_f površinska energija končnega stanja (kapljice tekočine 1 razpršene v tekočini 2). Energiji se nanašata na isto enoto volumna pred in po oblikovanju kapljice. Med nastajanjem kapljice dosežemo energijo E_d , višjo od energije obeh stanj. Ker se bo energija tekom procesa spremenila samo na račun izoblikovanja površine kapljice, bom zapisal le površinske energije začetnega in končnega stanja, čeprav ima tekočina tudi notranjo in kinetično energijo.

Razdelimo tokova na levi na majhne volumne, ki so enaki volumnu kapljic in njene okoliške tekočine v emulziji (slika 4a). V_1 za tok dispergirane faze (tekočina 1) in V_2 za tok zvezne faze (tekočina 2).

Vzemimo za ničlo energije stanje, kjer so vsi kanali zapolnjeni z tekočino 2. Energijo končnega stanja, ko imamo okrogle kapljice tekočine 1 z radijem R razpršene v tekočini 2, zapišemo kot

$$E_f = 4\pi R^2 \gamma = \gamma (4\pi)^{1/3} (3V_1)^{2/3} \quad (2)$$

kjer je γ površinska napetost med tekočinama. K začetni energiji bo prispevala le energija tekočine 1, saj smo ničlo postavili na stanje, kjer je kanal zapolnjen s tekočino 2. Izračunati je torej treba razliko energij, če v zgornjem kanalu na levi zamenjamo tekočino 1 s tekočino 2.

Pred tem si oglejmo Youngovo enačbo [6]. Če imamo kapljico tekočine na gladki trdni površini kot je prikazano na sliki 4c, velja Youngova enačba za kontaktni kot θ_C

$$\gamma_{SG} = \gamma_{SL} + \gamma_{LG} \cos \theta_C \quad (3)$$

kjer indeksi površinskih napetosti predstavljajo različne faze: trdno površino (S), kapljevino (L) in plin (G). γ_{LG} je torej površinska napetost med kapljevino in plinom itd.

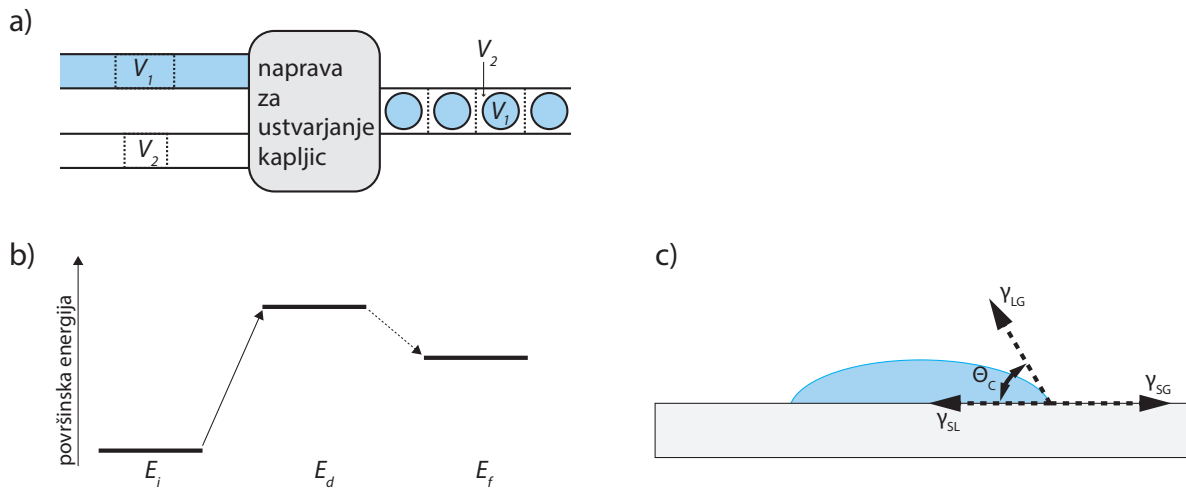
Računamo torej spremembo energije volumna V_1 , ko iz kanala izrinemo tekočino 2, in jo nadomestimo s tekočino 1. Naj bo γ_1 oz. γ_2 površinska napetost med tekočino 1 oz. 2 in steno kanala. Sprememba površinske energije bo sorazmerna $\gamma_1 - \gamma_2$. Za začetno energijo z uporabo Youngove enačbe, če γ_{SG} nadomestimo z γ_1 , γ_{SL} z γ_2 in γ_{LG} z γ , dobimo

$$E_i = (\gamma_1 - \gamma_2) \frac{S_1 V_1}{A_1} = \gamma \cos \theta \frac{S_1 V_1}{A_1} \quad (4)$$

kjer je θ kot med tekočino 2 in steno kanala v prisotnosti tekočine 1. Če imata obe tekočini isti kontaktni kot s površino kanala, je $\theta = \pi/2$ in $E_i = 0$, kar je prav, saj se tekočini ne razlikujeta glede na površinsko napetost v kontaktu s steno. S_1 in A_1 sta površina in volumen na enoto dolžine dotočnega kanala tekočine 1. Izraz A/S je karakteristična širina kanala in je 1/4 širine kanala w za okroglo in kvadratno cev. $S_1 V_1 / A_1$ torej predstavlja površino stika med volumnom tekočine V_1 in steno kanala.

2.1.2 Oblikovanje kapljic

Pri oblikovanju kapljic imamo tri glavne korake (slika 5a). Najprej se mora izoblikovati mejna površina med obema tekočinama, to površino je treba nato deformirati do točke, ko bo zaradi težnje po znižanju energije samodejno oblikovala sferično kapljico. Za takšno deformacijo je treba sistemu dodati energijo. Da bo deformirana tekočina spontano razpadla v kapljice, mora imeti vmesno stanje višjo energijo kot končno stanje ($E_d > E_f$) za isti volumen. S tem dokončno pojasnimo



Slika 4. a) shematski prikaz naprave za ustvarjanje kapljic - iz leve pritekata dva neprekinjena tokova tekočin, ki se ne mešata, iz naprave pa odteka emulzija. b) prikaz površinskih energij korakov zgornjega procesa. Vir: [4]. c) Ilustracija kontaktnega kota θ_C med tekočino (L) in trdno površino (S) v plinu (G). Vir: [6].

sliko 4b. Polna puščica predstavlja vloženo energijo za deformacijo stične površine, črtkana puščica pa predstavlja spontan razcep tekočine.

Poglejmo si to na primeru kapljanja iz pipe (slika 5b). Sila površinske napetosti, ki kapljici preprečuje, da bi padla, je sorazmerna z obsegom ustja cevi ($F_c \propto 2\pi r$, r je radij ustja). Nasprotno tej sili deluje sila teže, ki je sorazmerna z volumnom kapljice ($F_g \propto R^3$, R je radij kapljice). Ko gravitacijska sila preseže silo površinske napetosti ($F_g > F_c$), se kapljica odcepi in pade. Vidimo, da za končni radij kapljice R velja sorazmerje

$$R^3 \propto r \quad (5)$$

To nam ne omogoča produkcije zelo majhnih kapljic, zato se v mikrofluidiki poslužujejo sil močnejših od gravitacije, največkrat sile linearnega upora v viskozni tekočini ($F_u \propto \eta R v_2$, η in v_2 sta viskoznost in hitrost tekočine 2). Pipeto skozi katero priteka tekočina 1 postavijo v tok tekočine 2 tako, da obe tekočini tečeta v isto smer. S tem dobijo kapljice z radijem sorazmernim radiju ustja pipete

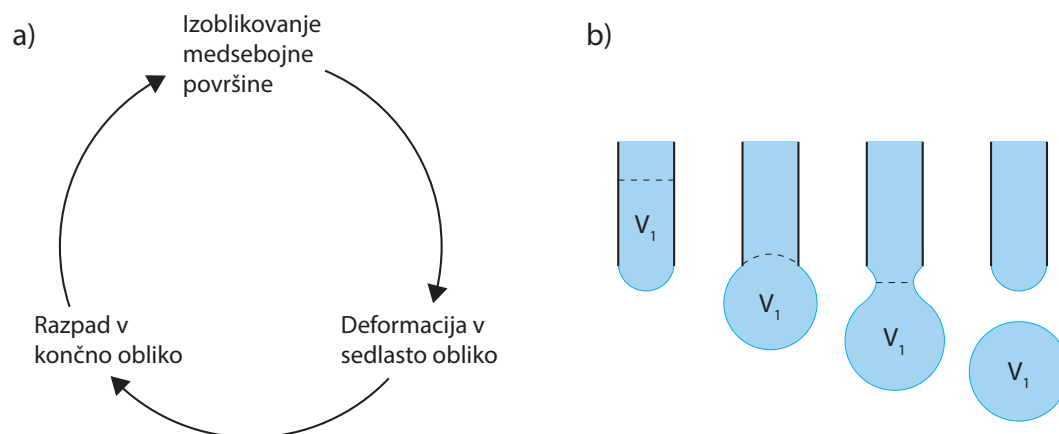
$$R \propto r, \quad (6)$$

kar omogoča proizvodnjo zelo majhnih kapljic.

Poglejmo si, kako se pri tem procesu spreminja oblika mejne površine med tekočinama, kar je prikazano na sliki 5b. Na prvi sliki z leve je s črtkano črto označen volumen V_1 tekočine 1, ki se bo tekom procesa odcepil v kapljico. V drugem koraku kapljica polzi iz pipete in mejna površina se poveča, a ohranja približno krogelno obliko. Ko se velikost kapljice približuje kritičnemu radiju R , se izoblikuje tekočinski vrat. Ta se nato podaljšuje in oži, dokler končno ne izgine in kapljica se odcepi.

Spreminjanje hitrosti v_1 tekočine 1 prav tako vpliva na proces oblikovanja kapljic. Samo če je hitrost v_1 majhna, imamo zagotovljeno popolnoma enotno velikost kapljic, saj se bodo vedno odcepile v isti točki [4]. Če hitrost povečamo, dobimo večji razpon točk nestabilnih energijskih stanj in s tem več različnih možnosti odcepa kapljice. Kljub temu običajno en način formacije kapljic prevlada in nam določi povprečno velikost kapljic.

Če pa večamo hitrost v_2 zvezne faze (tekočine 2), medtem ko je hitrost v_1 konstantna, se velikost kapljic zmanjšuje, saj je sila upora sorazmerna s hitrostjo. S tem lahko dosežemo velikost kapljic

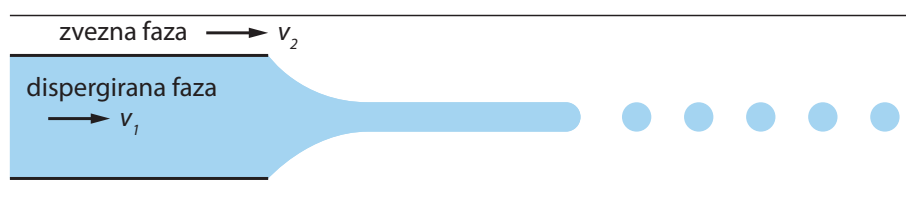


Slika 5. a) Diagram treh korakov procesa formiranja kapljic. b) Kapljanje. Vir: [4].

enako velikosti ustja pipete. Če še bolj povečamo hitrost zvezne faze, se kapljice ne formirajo več, ampak tekočina iz pipete teče v obliki tankega curka (slika 6). Temu pravimo fokusiranje toka. Prednost tega, da tekočini nekaj časa tečeta druga ob drugi, je dovolj časa za molekule emulgatorja, ki je običajno raztopljen v zvezni fazi, da se razporedijo po površini med tekočinama in s tem zmanjšajo površinsko napetost. To zmanjša energijo potrebno za dosego nestabilnosti in s tem povzroči nastanek kapljic.

V takem primeru je vmesna energija E_d za curek z radijem r enaka

$$E_d = 2\gamma V_1/r \quad (7)$$



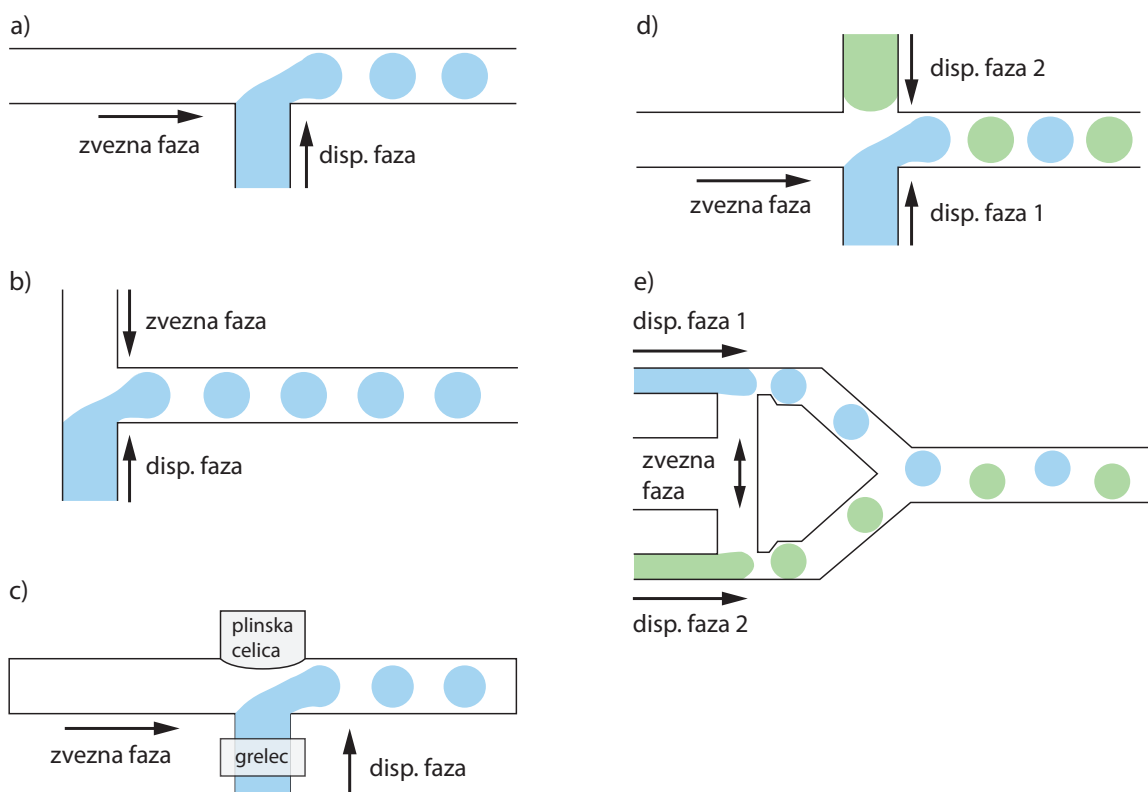
Slika 6. Curek, ki se oblikuje, ko zelo povečamo hitrost zvezne faze v_2 . Vir: [4].

Curek razpade zaradi Rayleigh-jeve nestabilnosti in se bo vedno razcepil tako, da bo veljalo $E_f < E_d$.

2.1.3 T-spoj

Imamo dva tokova, ki se srečata v pravokotnem spoju cevi. Strig med tokovima dveh tekočin, ki se ne mešata, povzroči, da se tok ene od tekočin razbije na kapljice. Imamo več možnosti, kar je prikazano na sliki 7 (primeri a,b in c). Na sestavo kapljic lahko vplivamo tako, da združimo dva tokova pred T-spojem in šele nato oblikujemo kapljice. Da povečamo frekvenco proizvodnje kapljic, lahko postavimo več takšnih T-spojev zapored.

Če želimo bolj prilagodljivo proizvodnjo kapljic, lahko v T-spoj dodamo napihljivo steno (slika 7 c). Na velikost kapljic lahko vplivamo s prilagajanjem širine kanala, pa tudi s spreminjanjem fizikalnih lastnosti tekočin, npr. s segrevanjem enega od kanalov v spoju vplivamo na površinsko napetost ali viskoznost ene od tekočin.



Slika 7. Prikaz različnih T-spojev: a) "običajen T-spoj", kjer dispergirano fazo vbrizgamo pravokotno na zvezno fazo, b) obe fazi prideta iz nasprotnih smeri, c) "aktivni T-spoj", kjer lahko s spreminjanjem oblike plinske celice in gretjem vplivamo na dispergirano fazo. d) in e): dva primera sinhronizirane proizvodnje kapljic dveh različnih tekočin. Vir: [4].

Včasih si želimo združiti dve kapljici različnih spojin. S pametno postavitvijo dveh T-spojev lahko dosežemo sinhrono proizvodnjo kapljic enega in drugega reaktanta, kot je prikazano na sliki 7 (primera d in e).

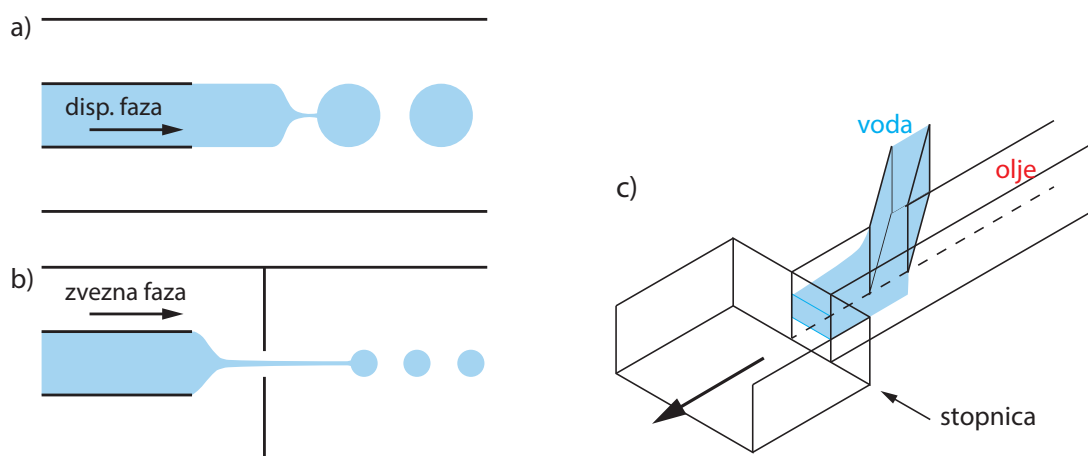
Ker so T-spoji enostavni za uporabo in omogočajo sinhrono visokofrekvenčno proizvodnjo kapljic, jih pogosto uporabljajo, čeprav ne zagotavljajo optimalne homogenosti velikosti kapljic [4].

2.1.4 Fokusiranje toka

Druga pogosto uporabljena metoda ustvarjanja majhnih kapljic v mikrofluidiki je fokusiranje toka. Kot sem zapisal v poglavju 2.1.2, curek dispergirane faze, obdan z zvezno fazo, zaradi Rayleigh-jeve nestabilnosti razpade na kapljice. Tak curek lahko še zožimo, če ga pošljemo skozi ozko odprtino (slika 8a, 8b). Kljub bolj zahtevni sestavi glede na T-spoj se fokusiranje toka veliko uporablja, saj omogoča spreminjanje hitrosti tokov zvezne in dispergirane faze in s tem produkcijo kapljic različnih velikosti. Če curek dispergirane faze zelo zožimo, je frekvenca nastajanja kapljic visoka, kapljice pa majhne. Fokusiranje toka je tudi bolj primerno če želimo v kapljice vključiti žive celice, saj je verjetnost, da se poškodujejo, manjša kot pri T-spoju.

2.1.5 Stopnična emulzifikacija

Pri tej metodi generiranja kapljic uporabljajo stopnico (razširitev kanala), da sprožijo razpad toka na kapljice (slika 8c) [7]. Dve tekočini preko T- ali Y-spoja pripeljejo v kanal z velikim razmerjem



Slika 8. Fokusiranje toka brez oženja curka (a) in z oženjem curka skozi odprtino (b). c) Stopnična emulzifikacija. Voda (dispersgirana faza) je ujeta med dve steni in obdana z oljem (zvezno fazo). Vir: [4].

med širino in višino (kanal je lahko sploščen v eni ali drugi smeri). Curek dispergirane faze je tako ujet v ožini med dvema stenama kanala, kar mu preprečuje, da bi razpadel. Ko pride do stopnice (razširitve), se dispergirana faza začne nabirati v kapljico, dokler ni dovolj velika, da se odcepi. S to metodo lahko dosežemo visoke frekvence produkcije, če na isto stopnico pošljemo več curkov dispergirane faze naenkrat. Stopnična emulzifikacija ponuja nekaj prednosti pred T-spoji in fokusiranjem toka: s to metodo dosegajo največjo homogenost velikosti kapljic in hkrati omogoča spreminjanje frekvence produkcije na območju velikem tudi do dveh redov velikosti.

Obstaja sicer še nekaj drugih metod za proizvodnjo kapljic, ki pa se uporabljajo veliko manj kot zgoraj omenjene.

2.2 Manipulacija kapljic

Ustvarjanje kapljic je le prvi korak v celotnem procesu, ki ga želimo opraviti v laboratoriju na čipu. Ko imamo ustvarjen tok zaporednih kapljic, jih običajno želimo na nadaljnji poti kontrolirati. V tem podpoglavju bom opisal nekaj načinov sortiranja kapljic glede na velikost ali vsebino ter metode za ustvarjanje in manipulacijo posameznih kapljic.

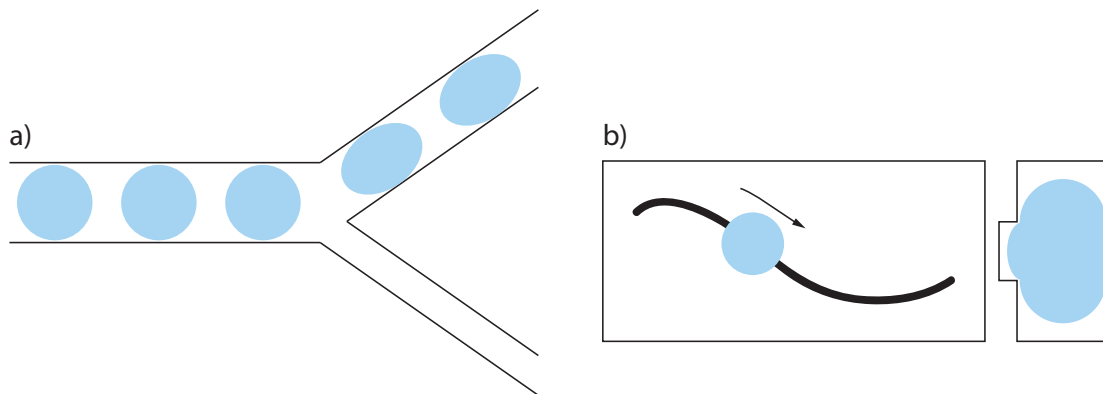
2.2.1 Razvrščanje in premikanje kapljic z obliko kanalov

Podobno kot ohmski upor v električnih vezjih, obstaja hidravlični upor v mikrofluidnih vezjih. Hitrost toka je obratno sorazmerna s hidravličnim uporom in premo sorazmerna z gradientom tlaka. Dodatni padec tlaka preko površine kapljice, ki se premika po kanalu lahko izkoristimo za usmerjanje in razvrščanje kapljic.

Predstavljajmo si podolgovate kapljice na obeh koncih zaključene s polkroglo. Zaradi površinske napetosti opazimo padec tlaka $\Delta p = p_1 - p_2$ preko stika kapljice z nosilno tekočino. p_1 je tlak znotraj kapljice, p_2 pa tlak zunaj kapljice in ker je stična površina sferična, velja $\Delta p = 2\gamma/r$, kjer je γ površinska napetost in r radij polkrogelne kapice obravnavane kapljice.

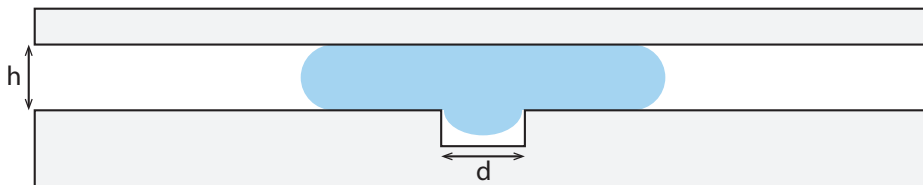
Če poskušamo kapljico spraviti v ožji kanal, se mora r zmanjšati in posledično se Δp na sprednji strani kapljice poveča. Ta dodatni tlak mora priti od pritiska nosilne tekočine na zadnji del kapljice, in če tega pritiska v sistemu ne dosežemo, se kapljica ne bo usmerila v ožji kanal (slika 9a). S tem lahko razvrščamo in usmerjamo kapljice.

Še en način za usmerjanje kapljic je s pomočjo ozkih vdolbin na dnu kanalov [8]. Kapljica ima



Slika 9. a) Zaradi manjšega hidrodinamskega upora se kapljice raje usmerijo v širši kanal. Vir: [4]. b) Vodenje kapljice po tračnici, na principu znižanja površinske napetosti. Na desni je prikazan stranski pogled na kapljico. Vir: [4].

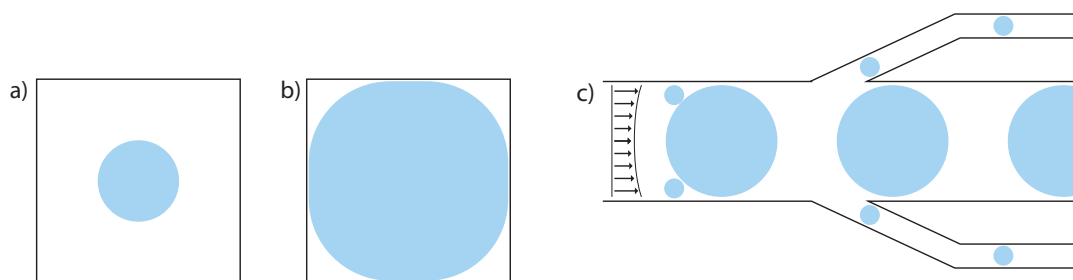
najmanjšo energijo, če zavzema obliko krogle. Predstavljajmo si sedaj kapljico, ki ima volumen večji od največjega volumna $V = 4\pi(h/2)^3/3$, ki ga lahko ima v kanalu višine h , da še zavzema krogelno obliko. Kapljica bo torej sploščena. Takšno kapljico lahko ujamemo in s tem zaustavimo, če v dno kanala izdolbimo majhno cilindrično vdolbino (slika 10), saj ji s tem zmanjšamo površino in posledično energijo. Takšna vdolbina torej deluje kot nekakšna potencialna jama. Izkaže se, da se kapljica ujame tudi, če so dimenzije vdolbine mnogo manjše kot dimenzije kapljice [8]. Seveda pa ob premočnem toku kapljica uide iz potencialne jame. Poleg ujetja kapljice je možno tudi vodenje kapljice po podolgovati vdolbini, kot je prikazano na sliki 9b.



Slika 10. Skica ujetе kapljice z definiranimi parametri. Vir: [8].

Hitrost kapljice je odvisna od njene relativne velikosti glede na velikost preseka kanala. Če je kapljica zelo majhna v primerjavi s širino kanala (slika 11a), bo imela večjo hitrost od povprečne hitrosti nosilne tekočine, saj bo v sredini kanala občutila le maksimum paraboličnega hitrostnega profila, ki ga ima tok viskozne tekočine po kanalu. Če pa je kapljica večja od dimenzij kanala, bo utegnjena med stenami kanala (slika 11b). Nosilna tekočina lahko kapljico obide le skozi odprtine v vogalih in ima zato povprečno hitrost večjo od hitrosti kapljice.

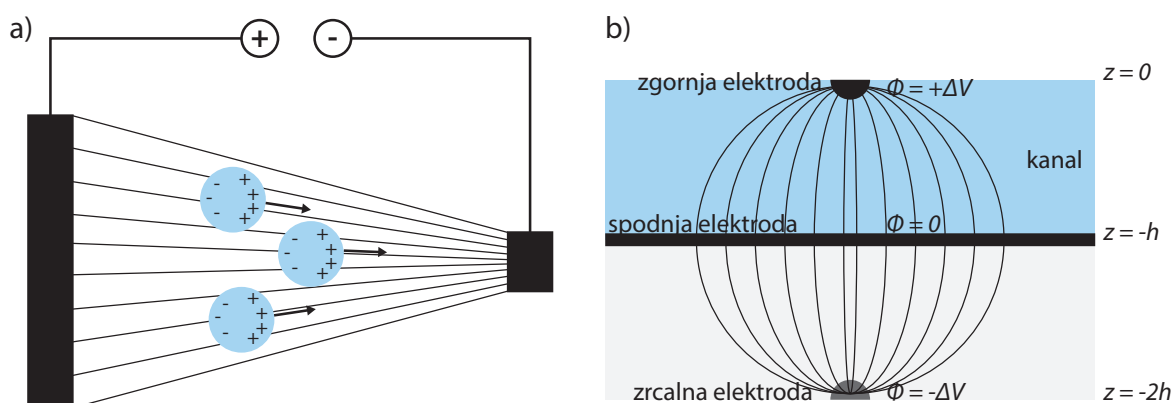
Na podlagi te razlike v hitrosti so zasnovali sistem za razvrščanje kapljic glede na velikost (slika 11c). Majhne kapljice imajo hitrost večjo od povprečne hitrosti nosilne tekočine, medtem ko so velike kapljice počasnejše. Majhne kapljice dohitijo velike in ker sledijo toku nosilne tekočine se ujamejo za velikimi kapljicami ob steni kanala. Če postavimo ozke stranske kanale, ki so dovolj široki za majhne kapljice, se bodo te kapljice ločile od velikih in naprej potovale po svojem kanalu.



Slika 11. Kapljica je lahko majhna (a) ali velika (b) v primerjavi z dimenzijo kanala, kar vpliva na njeno relativno hitrost glede na nosilno tekočino. c) Ločevanje kapljic glede na velikost s pametno zasnovanim omrežjem kanalov. Vir: [4].

2.2.2 Dielektroforeza

Prikladen način premikanja kapljic je z uporabo električnega polja. Ker imajo vodne kapljice običajno mnogo večjo dielektrično konstanto kot nepolarna nosilna tekočina (olje), lahko nenabite kapljice premikamo v smeri večanja električnega polja (slika 12a). Nehomogeno polje dobimo, če za eno elektrodo kondenzatorja vzamemo ravno ploščo in za drugo majhno kroglo. Alternativa sta dve majhni krogli na dvojni razdalji in dvojni razliki potenciala (slika 12b), kar dobimo z zrcaljenjem krogelne elektrode čez ravno elektrodo. V nadaljevanju bom zapisal izpeljavo sile na sferično kapljico v nehomogenem električnem polju [3].



Slika 12. a) Prikaz manipulacije kapljic z dielektroforezo. Vir: [4]. b) Prikaz postavitve elektrod za dielektroforezo. Kanal je obarvan modro. ϕ je električni potencial, z pa višina. Vir: [3].

Induciran dipol znotraj dielektrične sfere v dielektrični tekočini V homogeno električno polje \mathbf{E}_0 , znotraj tekočine z dielektrično konstanto ϵ_1 , postavimo kroglo z radijem a in dielektrično konstanto ϵ_2 . Zaradi električnega polja se v krogli inducira električni dipolni moment, ki ga dobimo z reševanjem Laplace-ove enačbe za skalarni električni potencial ϕ . Induciran dipolni moment \mathbf{p} zapišemo kot

$$\mathbf{p} = 4\pi\epsilon_0\epsilon_1 \frac{\epsilon_2 - \epsilon_1}{\epsilon_2 + 2\epsilon_1} a^3 \mathbf{E}_0. \quad (8)$$

Dielektroforezična sila na dielektrično sfero Sedaj ko imamo izračunan induciran električni dipolni moment sfere, lahko izračunamo kakšna sila \mathbf{F}_{dip} deluje nanjo. V splošnem je težko izračunati

silo na kroglo končnega radija a v nehomogenem električnem polju, zato se bom omejil na primer, ko se električno polje spreminja na razdaljah mnogo večjih od a . Delamo torej v približku točkastega dipola. Silo izračunamo po formuli

$$\mathbf{F}_{dip} = (\mathbf{p} \cdot \nabla) \mathbf{E}. \quad (9)$$

V našem primeru je sila \mathbf{F}_{dip} na kapljico v točki \mathbf{r}_0 enaka

$$\begin{aligned} \mathbf{F}_{dip}(\mathbf{r}_0) &= [\mathbf{p}(\mathbf{r}_0) \cdot \nabla] \mathbf{E}_0(\mathbf{r}_0) \\ &= 4\pi\epsilon_0\epsilon_1 \frac{\epsilon_2 - \epsilon_1}{\epsilon_2 + 2\epsilon_1} a^3 [\mathbf{E}_0(\mathbf{r}_0) \cdot \nabla] \mathbf{E}_0(\mathbf{r}_0) \\ &= 2\pi\epsilon_0\epsilon_1 \frac{\epsilon_2 - \epsilon_1}{\epsilon_2 + 2\epsilon_1} a^3 \nabla [\mathbf{E}_0^2(\mathbf{r}_0)], \end{aligned} \quad (10)$$

kjer sem uporabil $\nabla [\mathbf{E}^2] = 2(\mathbf{E} \cdot \nabla) \mathbf{E}$, kar velja v elektrostatiki, kjer je $\nabla \times \mathbf{E} = 0$. To silo pogosto imenujemo dielektroforezična sila in jo zapišemo kot

$$\mathbf{F}_{DEP}(\mathbf{r}_0) = 2\pi\epsilon_0\epsilon_1 \frac{\epsilon_2 - \epsilon_1}{\epsilon_2 + 2\epsilon_1} a^3 \nabla [\mathbf{E}_0^2(\mathbf{r}_0)]. \quad (11)$$

2.2.3 Manipulacija kapljic z magnetnim poljem

Podobno, kot lahko kapljice premikamo z električnim poljem, lahko magnetne delce premikamo z magnetnim poljem. Če damo takšne magnetne delce v kapljice, nam to omogoča poljubno premikanje kapljic po mikrofluidnem vezju.

Kot alternativo lahko uporabimo fero-tekočino kot zvezno fazo in z njo blokiramo kanale na razpotjih in s tem usmerjamo kapljice.

2.2.4 Termokapilarni efekt

Termokapilarni ali Marangonijev efekt izkorišča dejstvo, da je površinska napetost funkcija temperature. Pri večini tekočin se površinska napetost z višanjem temperature zmanjšuje, pri tekočinah stabiliziranih z emulgatorjem pa se zvišuje. Zaradi termične energije molekule emulgatorja zapustijo površino, kar oslabi njihov učinek zmanjševanja površinske napetosti, zato se le-ta poveča.

Če površinska napetost ni konstantna, na površino deluje površinska Marangonijeva sila, ki jo zapišemo kot

$$\mathbf{f} = \nabla \gamma, \quad (12)$$

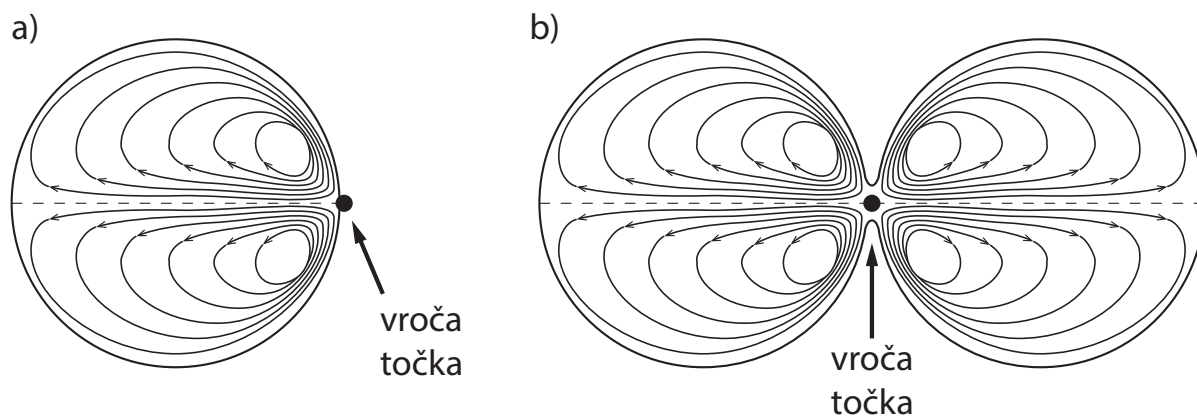
kjer je \mathbf{f} površinska gostota sile in γ površinska napetost [3].

Tok začne teči proti delu z višjo površinsko napetostjo, in ko z laserskim žarkom ogrejemo del kapljice (slika 13a), povzročimo tokove znotraj in zunaj kapljice, ter jo s tem premikamo glede na nosilno tekočino. Z zmanjševanjem velikosti kapljic se učinek tega pojava povečuje in možno je doseči sile, nekaj redov velikosti večje kot pri dielektroforezi.

Termokapilarni efekt lahko uporabimo tudi za združevanje kapljic. Prvo kapljico z laserskim žarkom držimo na mestu, dokler je naslednja kapljica ne ujame. Nato postavimo laserski žarek med obe kapljici, ki ju bo vleklo vedno bolj skupaj, dokler se končno ne združita preko laserskega žarka (slika 13b).

2.2.5 Elektoreološke tekočine

Elektoreološke tekočine so koloidne suspenzije delcev, ki se pod vplivom električnega polja poravnajo. S tem lahko spreminjamo viskoznost tekočine ali celo ustvarimo trdno pregrado. Lahko jih na primer uporabimo kot zvezno fazo pri fokusiranju toka in s spremembo viskoznosti sprožimo



Slika 13. a) Marangonijev efekt: tokovi tečejo proti točki z večjo površinsko napetostjo. Tokovi zunaj kapljice niso prikazani. Vir: [4]. b) Shema združevanja kapljic s termokapilarnim efektom. Vir: [4].

nastanek kapljic. Ker imajo visoko dielektričnost, jih lahko uporabljamo za zaznavanje kapljic z meritvijo kapacitete kondenzatorja, saj se ta spremeni, ko gre kapljica mimo. Prav tako jih lahko uporabimo za združevanje kapljic, saj je dielektroforezična sila nanje zelo velika.

Poleg opisanih metod za manipulacijo kapljic uporabljajo še mehanske zaklopke, ki so primerne za vse velikosti kapljic in niso odvisne od njihovih električnih in magnetnih lastnosti [4].

3. Primeri uporabe kapljične mikrofluidike

Eden glavnih namenov kapljične mikrofluidike je razvoj zanesljivih metod manipulacije kapljic za proizvodnjo posebnih materialov ter opazovanje bioloških in biokemičnih procesov. V tem poglavju bom opisal nekaj primerov uporabe te tehnologije.

3.1 Proizvodnja posebnih materialov

Večinoma gre za proizvodnjo majhnih trdnih ali gelastih delcev, ki jih razdelimo na več skupin glede na način s katerim sprožimo kemijsko reakcijo. To je lahko s temperaturo, svetlobo, difuzijo med fazama ali mešanjem dveh reagentov [4].

Najlažje je kar ustvariti kapljice, ki vsebujejo snov, ki se sčasoma strjuje in tako dobiti mikrodelce. Slabost takšnih snovi je, da se lahko primejo sten kanala, ko kapljice še niso oblikovane, se tam strdijo in zamašijo kanal. Temu se lahko izognemo, če reakcijo sprožimo šele, ko so kapljice že oblikovane in niso več v stiku s stenami kanala. To je mogoče doseči s foto-polimerizacijo, temperaturno aktivirano polimerizacijo ali z izmenjavo reaktanta z nosilno fazo.

V kapljice damo torej le pred-polimerne molekule, katerih polimerizacijo potem sprožimo na enega od navedenih načinov. S foto-polimerizacijo lahko na tak način ustvarimo trdne ali gelaste kroglice, ki imajo zelo visoko stopnjo homogenosti v velikosti.

Poleg delcev s homogeno sestavo lahko ustvarijo tudi delce iz več različnih materialov, npr. kroglice iz dveh različnih polimerov [9]. Ustvariti se da celo magnetne delce, če v kapljice dodajo feromagnetne nanodelce in jih med procesom polimerizacije poravnajo tako, da imajo na koncu skupni magnetni moment.

Kot alternativa foto-polimerizaciji se uporablja termično inducirana polimerizacija, kjer segrevajo mikrofluidno vezje. Tu je treba paziti, da so kapljice dovolj narazen, saj temperaturna nihanja

povzročajo termokapilarni efekt in lahko destabilizirajo površine.

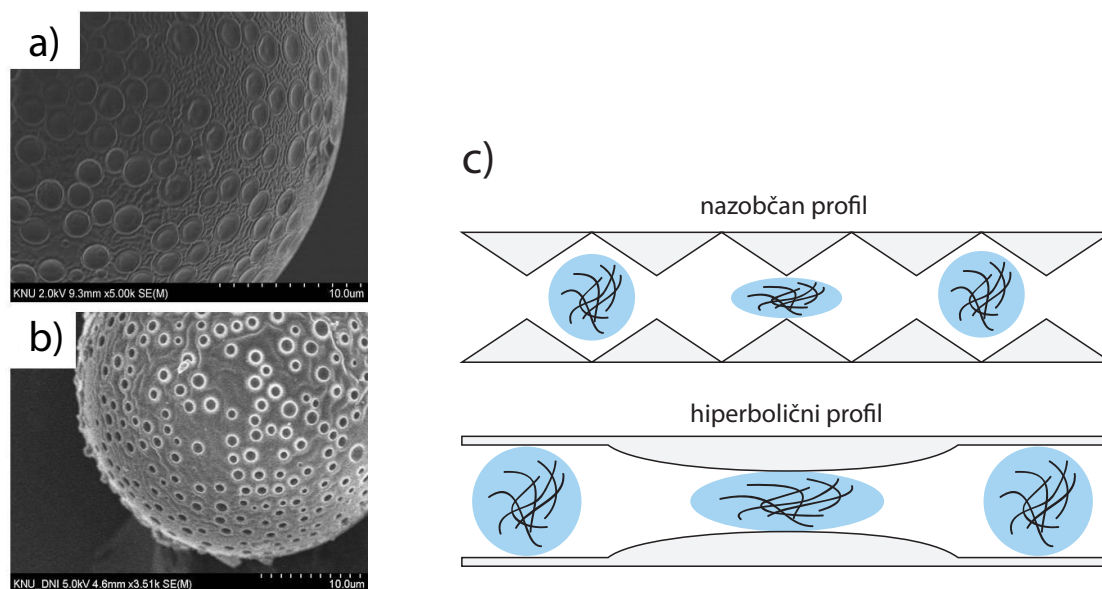
Še eden od načinov inicializacije reakcije je izmenjava ionov ali molekul med zvezno in dispergirano fazo. Ta metoda omogoča izdelavo bolj zapletenih delcev, ki imajo tekočo sredico obdano s trdno lupino [10]. Seveda pa morajo biti molekule, ki se izmenjujejo med fazama topne v obeh tekočinah, kar lahko povzroči nečistosti v kapljicah ali nastanek oborine ob stenah kanalov. Ta metoda je uporabna za izdelavo zdravil, ki se v telesu postopno sproščajo. V kroglico dajo zdravilo in ga obdajo z lupino, ki bo nekaj časa zdržala preden se bo stopila, kar omogoča, da pride na želeno mesto v telesu in se sprostí v optimalnem času (slika 14a, 14b).

3.2 Biologija in biofizika v kapljicah

Kapljična mikrofluidika omogoča obsežne študije biomolekularnih procesov. Pogosto uporabljena metoda je *in vitro* kompartmentalizacija, ki se uporablja za DNK sekvenčenje, PCR (polymerase chain reaction - verižna reakcija s polimerazo) itd. S PCR lahko npr. izolirajo posamezne gene v kapljicah in preučujejo učinke teh genov na različne beljakovine.

Prav tako lahko preučujejo posamezne celice ujete v kapljicah [11]. Lahko jim dovajajo hranila z združevanjem kapljic in jih ohranjajo žive. Ker celice potrebujejo kisik, morata biti nosilna tekočina in material, iz katerega je čip izdelan, porozna za pline (zrak). Na tak način lahko celice ohranijo žive in jih opazujejo tudi po več dni.

Kapljično mikrofluidiko uporabljajo tudi za proučevanje fizikalnih lastnosti mrež beljakovinskih vlaken (slika 14c). Takšna vlakna sodelujejo pri strjevanju krvi in celjenju poškodb žil. V kapljice ujamejo vlakna, ki začnejo tvoriti mrežo z elastičnimi lastnostmi, ki jih preučujejo tako, da kapljice z vlakni pošiljajo skozi ožine v kanalih in opazujejo, kako se skrčijo in spet sprostijo, ko zapustijo ožino.



Slika 14. Sliki površine biorazgradljivega delca iz PLGA, ki se uporablja za obloge zdravil: a) prví dan, b) po 47 dneh, ko se je obloga že delno razgradila in vsebina uhaja ven. Vir: [10]. c) Shematični prikaz zasnov kanalov za opazovanje elastičnih lastnosti beljakovinskih vlaken ujetih v kapljice: nazobčan profil za periodično deformacijo in relaksacijo, hiperbolični profil za postopno enakomerno stiskanje. Vir: [4].

4. Zaključek

V članku sem opisal kapljično mikrofluidiko, eno od vej mikrofluidike. Čeprav je tehnologija laboratorija na čipu dokaj nova, je v zadnjih nekaj letih zelo napredovala. Izboljšali so metode produkcije in manipulacije kapljic pa tudi izdelava čipov je hitrejša in lažja. To je interdisciplinarno področje, ki združuje fiziko, kemijo in biologijo. Končni cilj teh raziskav bi lahko bil univerzalni laboratorij na čipu, ki bi omogočal opravljanje najrazličnejših procesov, npr. hitro DNK sekvenčenje, analizo krvi, analizo škodljivih snovi v okolju, kot so izpušni plini, strupene kemikalije in nenazadnje bojni plini na vojnih območjih. V medicini bi se takšni čipi lahko uporabljali za samodijagnozo pacientov, ter z dostopnimi cenami in hitrim delovanjem prinesli možnosti napredne diagnostike tudi v široko uporabo.

5. Zahvala

Zahvaljujem se svojemu mentorju, doc. dr. Mihi Ravniku, za vodstvo in pomoč pri pisanju tega članka.

LITERATURA

- [1] George M. Whitesides, *The origins and the future of microfluidics*, Nature **442**, (2006), 368-373
- [2] D. Mark, S. Haeblerle, G. Roth, F. von Stetten, R. Zengerle, *Microfluidic lab-on-a-chip platforms: requirements, characteristics and applications*, Chem. Soc. Rev. **39(3)**, (2010), 1153-1182
- [3] H. Bruus, *Theoretical microfluidics*, Oxford university press, Oxford, (2008)
- [4] R. Seemann, M. Brinkmann, T. Pfohl, S. Herminghaus, *Droplet based microfluidics*, Rep. prog. phys. **75.1**, (2012), 016601
- [5] <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/en//0/0d/Micelle.png>, 11. 4. 2014
- [6] <http://en.wikipedia.org/wiki/Wetting>, 11. 4. 2014
- [7] R. Dangla, E. Fradet, Y. Lopez, C. N. Baroud, *The physical mechanisms of step emulsification*, J. Phys. D: Appl. Phys. **46(11)**, (2013), 114003
- [8] P. Abbyad, R. Dangla, A. Alexandrou, C. N. Baroud, *Rails and anchors: guiding and trapping droplet microreactors in two dimensions*, Lab Chip **11**, (2011), 813-821
- [9] C. H. Chen, R. K. Shah, A. R. Abate, D. A. Weitz, *Janus particles templated from double emulsion droplets generated using microfluidics*, Langmuir **25(8)**, (2009), 4320-4323
- [10] H. G. Kim, J. H. Choi, G. M. Kim, K. M. Kim, S. H. Lee, Y. H. Kim, *Controlled drug release analysis of monosized drug-loaded PLGA microparticles by ligand-sensitized fluorescence*, 16th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, (2012)
- [11] L. Mazutis, J. Gilbert, W. L. Ung, D. A. Weitz, A. D. Griffiths, J. A. Heyman, *Single-cell analysis and sorting using droplet-based microfluidics*, Nat. Protoc. **8(5)**, (2013), 870-891