

ВОЗМОЖНОСТИ СЕПАРАЦИИ КЛЕТОК МЕТОДОМ БЕСКОНТАКТНОГО БАРЬЕРНОГО ДИЭЛЕКТРОФОРЕЗА

Сорокина О.Н.¹, Подойницын С.Н.¹, Климов М.А.¹, Левин И.И.², Симакин С.Б.²

¹Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН
ул. Косыгина, 4, г. Москва, 119334, РФ; e.mail: alsiona@gmail.com

²ООО «ИОНТЕК-нано»
Нагорный проезд, 7, г. Москва, 117105, РФ

Поступила в редакцию: 25.05.2018

Аннотация. Предложена конструкция сепарационного устройства и метод разделения микробиологических образцов в устройствах, реализующих барьерный бесконтактный диэлектрофорез. Принцип работы сепарационного устройства основан на формировании диэлектрофоретических барьеров в объеме сепарационной камеры, благодаря чему разрабатываемый метод отличается высокой производительностью и простотой использования по сравнению с традиционными планарными системами диэлектрофореза. Кроме того, особенностью метода можно назвать отсутствие контакта разделяемых образцов с проводящими элементами электродной структуры. Проведено компьютерное моделирование распределения напряженностей электрических полей в области формирования диэлектрофоретических барьеров, а также показано влияние толщины изолирующего покрытия на диэлектрофоретические свойства барьеров. На основании данных компьютерного моделирования проведены оценки сил, действующих на частицу (клетку дрожжей диаметром 7 мкм) в сепарационной камере. Теоретически предсказана и экспериментально подтверждена возможность задерживания клеток на ДЭФ барьерах на примере дрожжевых грибов *Saccharomyces cerevisiae*.

Ключевые слова: сепарация клеток, бесконтактный барьерный диэлектрофорез.

ВВЕДЕНИЕ

Манипулирование биологическими частицами имеет важное значение для развития множества отраслей науки и техники [1-4].

Для захвата фокусировки и сепарации микро- и наночастиц наряду с оптическими [5], механическими [6] и магнитными [7] методами могут использоваться методы пространственного разделения частиц с помощью электрических полей [8, 9]. Воздействие электрического поля позволяет эффективно управлять движением клеток в потоке. Основными методами манипулирования биологическими частицами в электрических полях 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 [4, 10, 11]. Практически все частицы могут проявлять диэлектрофоретическую активность в присутствии градиентных электрических полей. Метод диэлектрофореза находит свое применение для разделения клеточных культур, органелл ДНК и др. [4, 10, 11].

В настоящее время для сепарации микробиологических объектов методом диэлектрофореза используется ряд подходов, таких как ловушки, фракционирование в потоке в присутствии поля, разделение в бегущей волне, захват на непроводящих структурах, бесконтактный ДЭФ и диэлектрофорез барьерного типа [12-17].

Наиболее перспективным с точки зрения своей производительности можно назвать ДЭФ барьерного типа, при реализации которого градиентные электрические поля формируются в объеме сепарационной камеры, а не только вдоль плоскости с электродами, как это характерно для ДЭФ устройств планарного типа. Основной принцип работы сепарационного устройства барьерного типа основан на формировании узких барьеров градиентного электрического поля, непроницаемых для частиц, подверженных сильному диэлектрофоретическому воздействию [17, 19]. Развитие ДЭФ барьерного типа может быть направлено как на разработку дизайна новых электродных структур эффективных для решения конкретной задачи, так и на модификацию и объединение свойств различных методик ДЭФ разделения для расширения возможностей сепарационного процесса. В случае бесконтактного ДЭФ в разделительном микроэлементе создается электрическое поле с использованием электродов, отделенных от образца тонким изолирующим слоем [16, 20]. Электроды с изолирующим покрытием можно рассматривать как плоские конденсаторы, внутри которых создается электрическое поле, проникающее через покрытие, при приложении переменного напряжения к обкладкам. Основным преимуществом бесконтактного ДЭФ является отсутствие контакта между металлом электрода и биологическим образцом. Отсутствие контакта между электродами и жидкостью пробы внутри канала предотвращает образование пузырьков и минимизирует загрязнение среды.

Объединение ДЭФ барьерного типа и бесконтактного ДЭФ может стать перспективным методом ДЭФ сепарации, который будет обладать достоинствами обоих методов ДЭФ сепарации.

В настоящей работе была предложена концепция сепарационного устройства, основанная на объединении принципов барьерного бесконтактного диэлектрофореза. Эффективность работы такого ДЭФ устройства, а

также его применимость для сепарации биологических объектов были показаны теоретически и экспериментально.

Теоретические основы диэлектрофоретического разделения. На частицу, обладающую диэлектрическим моментом в потоке, проходящем через сепарационную камеру, будут действовать разнонаправленные силы – диэлектрофоретическая сила (F_{DEP}) и гидродинамическая сила (влекущая сила потока) (F_{drag}).

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

где R – радиус частицы; η – динамическая вязкость среды; v – линейная скорость потока.

Усредненная во времени диэлектрическая сила (F_{DEP}), действующая на сферическую частицу, может быть определена из выражения:

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

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

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

Значение константы CM_f может варьироваться в пределах от 1 до $-0,5$ для сферических частиц. Знак перед константой CM_f определяет направление действия диэлектрофоретической силы. Положительные значения константы соответствуют положительному ДЭФ (р-ДЭФ) и частица втягивается в область увеличивающегося электрического поля, отрицательные, соответственно отрицательному ДЭФ (н-ДЭФ), когда частицы выталкиваются из области высокого градиентного электрического поля.

Электропроницаемость ε^* описывает комплексную переменную частотной зависимости величины константы CM_f :

$$\varepsilon^* = \varepsilon_0 \varepsilon_p - j \frac{\sigma}{\omega}, \quad (4)$$

где ε_p – электропроницаемость материала (клетки); σ – электропроводность материала (клетки); ω – угловая частота приложенного электрического поля.

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

В этом случае для расчета величины ДЭФ воздействия используют модифицированные выражения для константы CM_f для многослойной модели клетки эллиптической формы [21].

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

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

1. Сепарационное устройство. Конструкция предлагаемого сепарационного устройства состоит из двух пластин с электродами, формирующими сепарационную камеру (30 x 10 мм), разделенную тонкой (0,05 мм) диэлектрической прокладкой. Структура электродов представляет собой мелкую штриховку чередующихся параллельных токопроводящих линий шириной 100 мкм и диэлектрических промежутков шириной 200 мкм, ориентированных под углом 60° к потоку, вводимой суспензии. В работе использовались пластины с изолирующим покрытием и без него. Диэлектрическое тонкопленочное покрытие карбида кремния наносилось методом осаждения из ионного пучка с источником ионов типа END-HALL с холодным катодом на специализированном вакуумном стенде (Ion Beam Deposition).

Перед осаждением диэлектрической пленки производилась очистка поверхности образца пучком ускоренных ионов аргона с энергией до 1 кэВ. При этом ток пучка ионов аргона составлял 100-120 мА. Время процесса очистки – 20 минут. При нанесении диэлектрической пленки карбида кремния (SiC) в разрядную камеру источника ионов напускался гексаметилдисилоксан ($C_6H_{18}OSi_2$) до достижения давления $3,0 \cdot 10^{-1}$ Па.

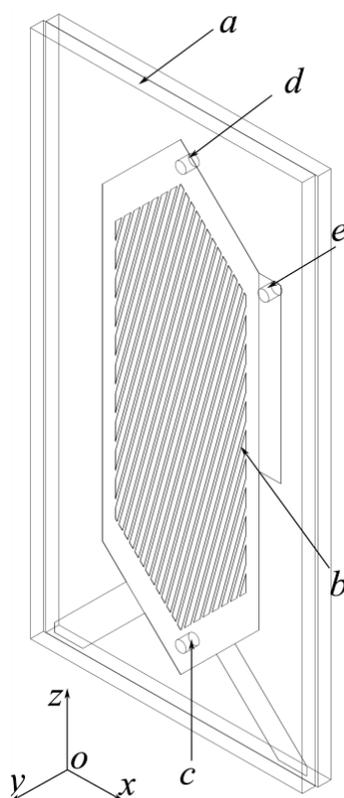


Рисунок 1. Схема ячейки барьерного ДЭФ

При этом в разрядной камере под действием электронного удара происходил распад молекул гексаметилдисилоксана и ионизация распавшихся частей молекул. Образовавшиеся ионы через систему экстракции ионного пучка источника ионов ускорялись и направлялись на объект обработки, на поверхности которого осаждалась диэлектрическая пленка. Энергия ионов составляла 1,2-1,5 кэВ, ток ионов в пучке – 150-160 мА. Суммарное время нанесения диэлектрического покрытия составило 10 часов. В результате удавалось получить устойчивое однородное диэлектрическое покрытие толщиной 4-6 мкм.

Разрабатываемое сепарационное устройство (рис. 1) имеет одно вводное отверстие для подачи суспензии (с) разделяемых частиц в сепарационную камеру и два выводных отверстия для забора фракций образцов с сильным (е) и слабым (d) ДЭФ эффектом. Переменный электрический сигнал подается на вводные электроды (b) сепарационного устройства, расположенные на корпусе сепаратора (a).

2. Сепарационная установка. Сепарационная установка для ДЭФ сепарации включает в себя предлагаемое 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 (SN-50C6, Китай). Инфузионный насос используется для регулирования скорости подачи пробы в диапазоне 0,1-400 мл/ч. Для тестовых экспериментов была выбрана скорость подачи 20 мл/ч.

Для подачи напряжения и регулирования его амплитуды используется генератор переменного напряжения UNI-T (UTG9010C) (Китай), клеммы которого подключают к электродам сепаратора (рис. 1b). Генератор позволяет устанавливать частоту напряжения в широком диапазоне 1-10⁸ Гц, а амплитуду – в диапазоне 0,01-20 В. В настоящей работе частота равна 100 кГц, амплитуда сигнала варьировали в диапазоне 1-20 В, форма импульса – прямоугольная (меандр). Контроль амплитуды и частоты осуществляется при помощи цифрового осциллографа OWON HDS2062-MN (Китай).

3. Подготовка и анализ пробы. Клетки дрожжевых грибов *Saccharomyces cerevisiae* (ООО «САФ-НЕВА»-LESAFFRE, Россия) были выбраны в качестве объекта для тестирования возможностей метода барьерного бесконтактного ДЭФ. Навеску замороженных дрожжевых клеток нагревали до комнатной температуры и растворяли в деионизованной воде MilliQ так чтобы массовая концентрация клеток составляла 0,5 мг/мл. Средний диаметр дрожжевых клеток составлял 7 мкм.

Подготовленную суспензию дрожжевых клеток объемом 10 мл подавали в камеру сепарационного устройства со скоростью прокачки 20 мл/ч. В экспериментах последовательно отбирали из выходных отверстий (рис. 1d) ячейки контрольную фракцию образца клеток, проходящих через сепарационное устройство без электрического поля и экспериментальную фракцию образца при подключенном электрическом поле. Экспериментальная фракция представляет собой фильтрат без частиц или с частицами со слабым ДЭФ эффектом. Частицы, подвергающиеся значительному ДЭФ воздействию, концентрировались в специальном «депо» и выводились через выходное отверстие (рис. 1e) после отключения электрического поля посредством

вымывания из «депо» остатками сепарируемой суспензии со скоростью прокачки 400 мл/ч. Объем каждой фракции образца составлял 1 мл.

Изменение относительной концентрации клеток в суспензии в процессе сепарации определяли фотометрически [22]. Ранее было показано, что фотометрический метод дает хорошие корреляции ($r = 0,980$) с методами прямого микроскопического подсчета окрашенных клеток [23]. Измерения интенсивностей поглощения образцов проводились на фотометре вертикального сканирования Anthos ht1 (Германия) на длинах волн $\lambda_{\text{abs}} = 405, 450, 540, 620, 690$ нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В объеме сепарационной камеры неоднородности поля, полученные за счет парной ориентации токопроводящих дорожек пластин электродов, формируют множество барьеров высокоградиентного электрического поля (ДЭФ барьеров). При работе устройства частицы движутся в потоке жидкости, встречая на своем пути ДЭФ барьеры. Частицы, обладающие сильным ДЭФ эффектом, будут задерживаться на барьере и смещаться вдоль него под действием суммарного вектора сил F_{DEP} и F_{drag} (рис. 2). Частицы со слабой или нулевой ДЭФ-активностью, могут свободно преодолевать эти барьеры вместе с потоком, не отклоняясь от исходного направления. Таким образом, происходит пространственное разделение потоков частиц с различными диэлектрофоретическими свойствами.

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

$$F_{drag} = 6\pi R \eta v \sin(\theta). \quad (5)$$

Преимуществом предложенной конфигурации проводников является то, что ДЭФ активные частицы, преодолевшие один ДЭФ барьер, могут быть захвачены на последующих барьерах. Это позволяет увеличить расстояние между пластинами с проводниками и соответственно увеличить производительность сепаратора. Эффективность бесконтактного ДЭФ устройства барьерного типа будет зависеть от геометрических параметров электродов и сепарационной камеры таких, как: расстояние между пластинами, ширина электрода, расстояние между соседними электродами на пластине, толщина изолирующего покрытия на электродах. Предложенная конструкция позволяет за счет изменения геометрических параметров электродов и самой камеры расширять круг потенциальных объектов для разделения. Так, например, уменьшая зазор между пластинами сепаратора и, следовательно, электродами, можно уменьшать размер потенциально разделяемых объектов.

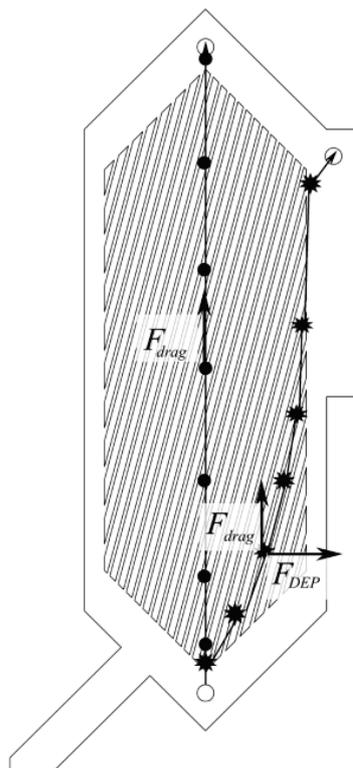


Рисунок 2. Схема распределения векторов сил, действующих на частицу со слабым (круг) и сильным ДЭФ (звезда) эффектом в потоке сепарационной камеры

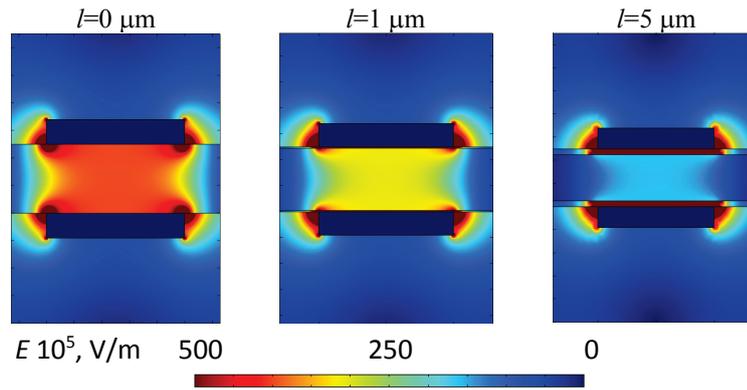


Рисунок 3. Компьютерное моделирование распределения электрического потенциала (а) и напряженности электрического поля (б) в зазоре ячейки между токопроводящими дорожками в зависимости от толщины изолирующего покрытия

1. Компьютерное моделирование сепарационного процесса. Используя средства компьютерного моделирования (ПО ElCut, ООО «ТОР», Россия), были получены визуальные изображения распределения напряженности электрического поля между электродами в зазоре сепарационной камеры рабочего образца сепарационного устройства при ориентации токопроводящих дорожек друг напротив друга. Для расчета была создана плоская модель сечения сепарационной камеры с токопроводящими дорожками шириной 100 мкм, расположенными на расстоянии 200 мкм друг от друга, расстояние между электродами составляет 50 мкм. Материал пластин – стеклотекстолит, материал электродов – медь, тонкое изолирующее покрытие – карбид кремния ($\epsilon = 9,7$), среда между пластинами – вода ($\epsilon = 80$). Расчет проводился методом конечных элементов, в плоской постановке в рамках электростатической модели при разности потенциалов между электродами противоположных пластин 20 В. На рисунке 3 приведены изолинии электрического потенциала и напряженности электрического поля, формирующегося на электродах сепарационной камеры в зависимости от толщины изолирующего покрытия.

В отсутствии изолирующего покрытия 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. По мере приближения к углам дорожек градиенты электрического поля будут резко увеличиваться, и достигать своих максимумов в углу дорожки. Таким образом, каждая пара токопроводящих дорожек создает по два барьера.

При реализации барьерного разделения, частицы, отличающиеся по диэлектрическим свойствам от среды, будут задерживаться на барьере градиентного электрического поля. Частицы с негативными диэлектрофоретическими свойствами (**n**-ДЭФ) не будут проникать в область барьера, а будут двигаться «снаружи» барьера вдоль него. Частицы с пол ожительными диэлектрофоретическими свойствами (**p**-ДЭФ), наоборот, будут втягиваться внутрь барьера и двигаться вдоль него. Поскольку **p**-ДЭФ частицы двигаются в сторону увеличения напряженности электрического поля, при перемещении внутри барьера такие частицы будут демонстрировать тенденцию к притяжению к стенкам сепарационной камеры, где согласно компьютерной модели электрическое поле максимально. Частицы с **n**-ДЭФ при движении вдоль барьера будут выталкиваться в области, где согласно компьютерной модели электрическое поле минимально.

При нанесении тонких изолирующих покрытий характер распределения электрического поля не изменяется, однако, на электродах устройства происходит частичное экранирование приложенного электрического потенциала. В результате экранирования потенциала напряженность электрического поля, формирующегося вокруг электродов, будет существенно меньше, чем в случае неизолированных электродов. Причем с увеличением толщины изолирующего покрытия его экранирующие способности резко возрастают. Следовательно, можно предположить, что бесконтактный ДЭФ барьерного типа может быть применим для разделения частиц по их диэлектрическим свойствам только при сравнительно небольших толщинах изолирующего покрытия.

Клетки дрожжевых грибов *Saccharomyces cerevisiae* можно рассматривать как сферу диаметром 7 мкм, состоящую из нескольких оболочек с разными диэлектрическими свойствами. Клетка состоит из цитоплазматического пространства, содержащего клеточные органеллы и клеточной оболочки, которая состоит из тонкой мембраны и толстой клеточной стенки, разделенных переплазматическим пространством. Диэлектрические свойства отдельных оболочек клетки *Saccharomyces cerevisiae* представлены в таблице 1 [24].

Таблица 1. Диэлектрические свойства отдельных оболочек клетки *Saccharomyces cerevisiae*

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

Расчетный параметр константы Клаузиуса-Массоти (ур. 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 и иметь тенденцию к осаждению на стенках сепарационной камеры.

Оценки параметров сил, действующих на клетку *Saccharomyces cerevisiae* в сепарационном устройстве F_{DEP} и F_{drag} , проводилась по ур. 2 и 5 соответственно исходя из градиентов напряженностей электрического поля, рассчитанных по данным компьютерного моделирования (рис. 3). Для расчетов был выбран участок размером 100 x 50 мкм по оси Oy и Oz соответственно, включающий в себя область проводящей дорожки электрода (50 мкм) и пространства без проводника (50 мкм), для более наглядной визуализации барьера градиентного электрического поля, формирующегося между электродами. Градиент электрического поля рассчитывали в направлении движения основного потока жидкости вдоль оси Ox . Расчет влекущей гидродинамической силы (F_{drag}) производился в приближении ламинарного течения со средней линейной скоростью потока 1100 мкм/с. Ламинарный поток между двух пластин 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 рисунке 4 представлены профили, действующих на частицу в канале сепарационной камеры, сил ДЭФ и влекущей силы потока в ячейке без изоляционного покрытия и с изоляционным покрытием толщиной 5 мкм.

Из рисунка 4 видно, что в отсутствии изоляционного покрытия по всему профилю канала сила ДЭФ воздействия много выше гидродинамической силы потока, действующей на частицу дрожжей радиусом 3,5 мкм. Можно говорить о том, что в этих условиях клетки дрожжей не смогут преодолеть барьер ДЭФ сил и должны практически полностью задерживаться на электродах сепарирующего устройства. Кроме того, наличие множества барьеров должно повышать эффективность сепарации т.к. частицы, преодолевшие один барьер, могут перераспределяться в пространстве и удерживаться на следующем барьере. Экспериментальное тестирование ячейки без изолирующего покрытия продемонстрировало высокую эффективность захвата дрожжевых частиц. Так во фракции образца, отобранной при напряжении 20 В, интенсивность сигнала поглощения близка к 0 (рис. 5а, кривая 2), что подтверждает захват основной части клеток сепарационным устройством. При этом в смыве концентрация клеток увеличивается практически в 2 раза (рис. 5а, кривая 3) по сравнению с контрольным образцом (рис. 5а, кривая 1).

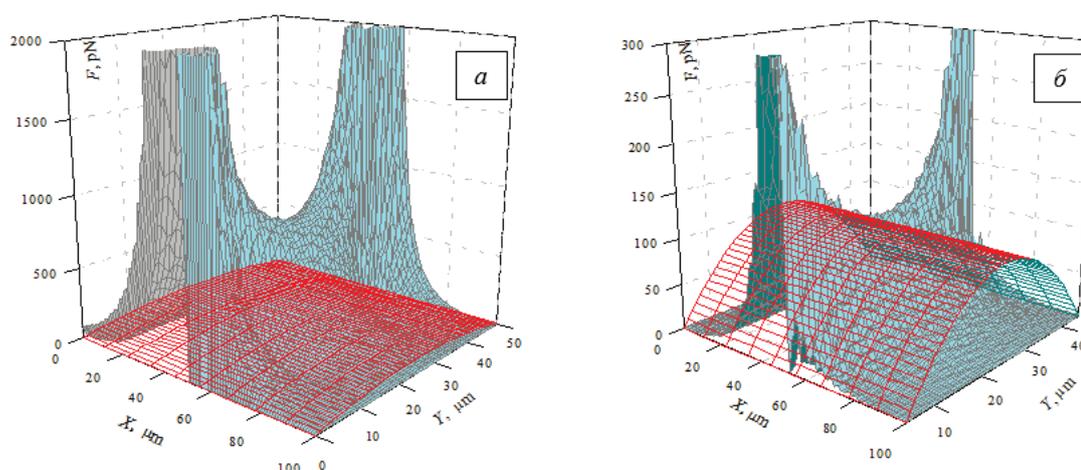


Рисунок 4. 3-х мерное изображение профилей сил действующих на клетку дрожжей радиусом 3,5 мкм в потоке в процессе диэлектрфоретической сепарации в ячейке без изолирующего покрытия (а) и с изолирующим покрытием толщиной 5 мкм (б). Красная сетка – гидродинамическая сила потока, влекущая частицу, серая сетка – сила диэлектрфоретического воздействия

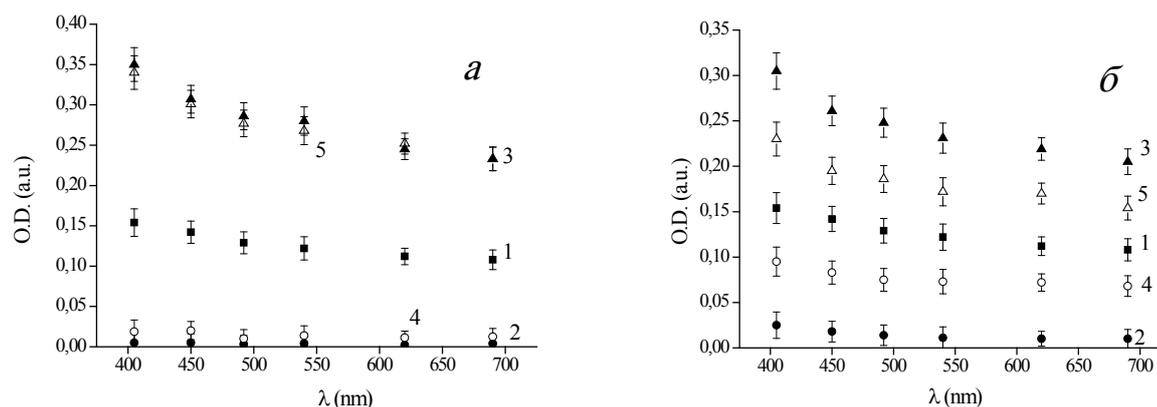


Рисунок 5. Кривые рассеивания (поглощения) суспензии дрожжевых клеток в контрольной фракции образца (1), в экспериментальной фракции образца на ячейке без изолирующего покрытия (2) и ее смыве (3), в экспериментальной фракции образца на ячейке с изолирующим покрытием (4) и ее смыве (5) при напряжении 20 В (а) и 10 В (б)

При нанесении сравнительно тонкого изолирующего покрытия (ок. 5 мкм) интенсивность ДЭФ воздействия на клетку дрожжей со средним диаметром 7 мкм падает примерно в 8 раз. В этом случае величина гидродинамической силы потока, действующей на клетку, становится соизмеримой по величине с силой ДЭФ воздействия в области минимальной высоты ДЭФ барьера. Таким образом, даже при наличии изолирующего слоя большая часть дрожжевых клеток должна задерживаться в ячейке, что подтверждается в результате экспериментального тестирования ДЭФ ячейки с изолирующим покрытием. Концентрация дрожжевых клеток во фракции образца, отобранной при напряжении 20 В, уменьшается более чем на 90 % (рис. 5а, кривая 4). Высокие показатели эффективности задерживания клеточной суспензии в сепарационной камере полученные в эксперименте совпадают с теоретическими оценками, предсказывающими превалирование диэлектрофоретических сил, действующих на частицу над влекущей силой потока, по всему объему сепарационной камеры.

При уменьшении подаваемого напряжения эффективность захвата частиц ячейкой, как с изолирующим покрытием, так и без него ожидаемо уменьшается. Эффективность захвата клеток дрожжей при уменьшении разности потенциалов с 20 до 10 В в ячейке с неизолированными электродами изменяется незначительно и близка к 90 % (рис 5б, кривая 2). При этом двукратное уменьшение подаваемого на электроды потенциала приводит к существенному снижению эффективности захвата клеток в ячейке с изолирующим покрытием. Более 50 % клеток оказываются во фракции фильтрата (рис 5б, кривая 4). При уменьшении напряжения до 5 и 1 В значимого задерживания клеток в ячейках с изолирующим покрытием не наблюдается.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Бесконтактный барьерный диэлектрофорез доказал свою пригодность при работе с микробиологическими объектами. Несмотря на частичное экранирование прикладываемого электрического потенциала, эффективность ДЭФ задерживания остается достаточно высокой. Следует учитывать, что толщина диэлектрического слоя существенно влияет на способность экранировать прикладываемый потенциал, поэтому важно создавать тонкие покрытия, с толщиной.

Наличие диэлектрического покрытия исключает электрохимические процессы, возникающие на поверхности проводящих структур при приложении электрического потенциала, такие как электрофорез, выход ионов металлов с поверхности электродов и др., что позволяет улучшить качество работы с биологическими объектами, т.к. отсутствует контакт с поверхностью металла.

При этом бесконтактный барьерный диэлектрофорез сохраняет высокую производительность, и структуру градиентных полей как в обычном барьерном диэлектрофорезе.

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

Список литературы / References:

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, vol. 11, pp. 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, vol. 35, pp. 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, vol. 33, pp. 1311-1321, DOI: 10.1002/elps.201100505.

4. Pethig R., Markx G.H. Applications of dielectrophoresis in biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 1997, vol. 15, p. 426, 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, pp. 1371-1383, DOI: 10.1039/C3LC41256C.
6. Shenoy A., Tanyeri M., Schroeder C.M. Characterizing the performance of the hydrodynamic trap using a control-based approach. *Microfluid Nanofluid.*, 2015, vol. 18, pp. 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, pp. 51-56, DOI: 10.1016/j.jmmm.2015.08.075.
8. Gupta V., Jafferji I., Garza M., [et. al.] ApoStream™, a new dielectrophoretic device for antibody independent isolation and recovery of viable cancer cells from blood. *Biomicrofluidics*, 2012, vol. 6, no. 2, e024133, DOI: 10.1063/1.4731647.
9. Turgeon R.T., Bowser M.T. Micro free-flow electrophoresis: theory and applications. *Anal Bioanal Chem.*, 2009, vol. 394, no. 1, 187-198, DOI: 10.1007/s00216-009-2656-5.
10. Yahya W.N., Kadri N.A., Ibrahim F. Cell patterning for liver tissue engineering via dielectrophoretic mechanisms. *Sensors (Basel)*, 2014, vol. 14, no. 7, pp. 11714-34, 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, vol. 8, e76751, DOI: 10.1371/journal.pone.0076751.
12. Markx G.H., Huang Y., Zhou X.-F., [et al.] Dielectrophoretic characterization and separation of microorganisms. *Microbiology*, 1994, vol. 140, pp. 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, vol. 8, pp. 1386-1393, DOI: 10.1039/B717043B.
14. Liu D., Garimella S.V. Microfluidic pumping based on traveling-wave dielectrophoresis. *CTRC Research Publications*, 2009, paper 120, pp. 1-43, DOI: 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, vol. 76, no. 6, pp. 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, vol. 10, e014109, DOI: 10.1063/1.4939947.
17. Dürr M., Kentsch J., Müller T., Schnelle Th., Stelzle M. Microdevices for manipulation and accumulation of micro- and nanoparticles by dielectrophoresis. *Electrophoresis*, 2003, vol. 24, pp. 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, vol. 15, pp. 18281-18309, DOI: 10.3390/ijms151018281.
19. Lee D., Hwang B., Choi Y., [et al.] Negative dielectrophoretic force based cell sorter with simplified structure for high reliability. *International Journal of Precision Engineering and Manufacturing*, 2016, vol. 17, no. 2, pp. 247-251, DOI: 10.1007/s12541-016-0032-x.
20. H. Shafiee, J.L. Caldwell, M.B. Sano, R.V. Davalos Contactless dielectrophoresis: a new technique for cell manipulation. *Biomed Microdevices*, 2009, vol. 11, pp. 997-1006, DOI: 10.1007/s10544-009-9317-5.
21. Park S., Zhang Y., Wang T.-H., [et. al.] Continuous dielectrophoretic bacterial separation and concentration from physiological media of high conductivity. *Electronic Supplementary Material (ESI) for Lab on a Chip*, 2011, vol. 11, pp. 2893-2900, DOI: 10.1039/c1lc20307j.
22. Price J.A.R., Butt J.P.H., Pethig R. Applications of a new optical technique for measuring the dielectrophoretic behaviour of microorganisms. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1988, vol. 964, pp. 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. *Journal of Biotechnology*, 1994, vol. 32, pp. 29-37, DOI: 10.1016/0168-1656(94)90117-1.
24. Fikar P., Babuska V., Georgiev V., Rousseau G., Zach P., Georgiev D. Dependence of dielectrophoretic forces on membrane proteins. *Poster presented at The Sixth International Meeting on Synthetic Biology*, London, Great Britain, 2013.

CELL SEPARATION BY BARRIER CONTACTLESS DIELECTROPHORESIS

Sorokina O.N.¹, Podoyunitsyn S.N.¹, Klimov M.A.¹, Kovarski A.L.¹, Levin I.I.²,
Simakin S.B.²¹Emanuel Institute of Biochemical Physics of RAS
Kosygin str., 4, Moscow, 119334, Russia; e.mail: alsiona@gmail.com²JSC «IONTEC-nano»
Nagorny proezd, 7, Moscow, 117105, Russia

Abstract. A design of a separation device and a method for microbiological samples separation based on barrier contactless dielectrophoresis are proposed. The principle of operation of the separation device is based on the formation of dielectrophoretic barriers in the volume of the separation chamber. The suggested method is highly efficient and easy to use in comparison with traditional planar dielectrophoresis systems. The feature of the method is the absence of contact between the separated samples and the conductive elements of the electrode structure. A computer simulation of the distribution of electric field over the dielectrophoretic barriers was carried out, and the effect of the thickness of the insulating coating on the dielectrophoretic properties of the barriers was shown. Based on the computer simulation data, the forces acting on the particle (a yeast cell with a diameter of 7 μm) in the separation chamber were estimated. The possibility of cell retention on cDEP barriers is theoretically predicted and experimentally confirmed using the example of yeast *Saccharomyces cerevisiae*.

Key words: cell separation, barrier contactless dielectrophoresis.