

УДК 528.87 + 535.8 + 621.378 + 535.214

© А. А. Евстапов

ФИЗИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ УПРАВЛЕНИЯ ДВИЖЕНИЕМ И РАЗДЕЛЕНИЕМ МИКРОЧАСТИЦ В ЖИДКИХ СРЕДАХ. I. ДИЭЛЕКТРОФОРЕЗ, ФОТОФОРЕЗ, ОПТОФОРЕЗ, ОПТИЧЕСКИЙ ПИНЦЕТ

Проведен сравнительный анализ современных методов и способов управления движением и разделением микрочастиц. Необходимость изучения биологических объектов привела к появлению новых методов и подходов, обеспечивающих возможность эффективного неразрушающего воздействия на частицы в жидкостях с помощью внешних полей. Рассмотрены современные методы, которые могут быть применены в микроаналитических приборах и устройствах.

ВВЕДЕНИЕ

Существует множество аналитических методов разделения молекул, ионов и частиц в жидких средах, основанных на воздействии внешних полей на микрочастицы. Наиболее известными и широко распространенными можно считать фильтрационные и хроматографические методы, ультразвуковые методы, электрофорез, диэлектрофорез и т. п. В последнее время эти методы успешно используются в микроаналитических приборах, например в так называемых системах lab-on-a-chip и m-TAS [1–17], позволяющих осуществлять уникальные манипуляции с микроколичествами вещества. Основой этих приборов являются микрочипы, получаемые методами микро- и нанотехнологий. Области применения подобных приборов чрезвычайно широки: аналитическая химия, медицинский анализ, фармацевтические исследования, биотехнология, судебная медицина и криминалистика, экологический мониторинг [1–9, 14–17, 20]. Наибольший интерес вызывает использование микроаналитической техники для изучения и анализа биологических объектов (молекул, бактерий, клеток, ДНК).

Электрофоретические методы, идеально поддающиеся автоматизации, применяются для разделения биологических молекул в однородном электрическом поле (ионы, белки, ДНК) (см., например, [2, 18–19]).

При разделении и анализе микрочастиц (молекул) используются разновидности методов микрохроматографии, фильтрации и капиллярного электрофореза. Что касается разделения макромолекул или крупных частиц (больших ДНК, белков), то здесь возможно использование только ограниченного числа способов анализа, например импульсного электрофореза и седиментационного метода

[20, 21]. При комплексных исследованиях обычно большие молекулы пытаются "расчлнить" на фрагменты и исследовать каждый фрагмент отдельно. Часто же оказывается необходимым изучить микрочастицу как индивидуальную частицу, чтобы выявить ее специфические функции, корректно и полно определить ее свойства и характеристики.

Наиболее трудными объектами для исследования являются живые клетки, представляющие собой сложный объект изучения. Анализ содержания и поведения отдельных клеток важен для фундаментального понимания их функций в окружающей среде: сложных процессов взаимодействия клеток, их химических повреждений, ответа на внешние воздействия. Клетки содержат большое разнообразие компонентов — от маленьких молекул до белков. Многие из этих компонентов присутствуют в микроколичествах и чрезвычайно малых объемах. Таким образом, аналитические инструменты для изучения индивидуальных клеток должны позволять проводить анализ малых объемов образцов и следовых количеств разнообразных аналитов. В настоящее время только ограниченное количество методов применяется для манипуляций с микрочастицами и разделений клеток.

В технике микрофильтрации используются различия в размерах микрочастиц, а их движение обеспечивается гидродинамическим давлением. С помощью методов микро- и нанотехнологий можно создать в материалах разнообразные конструкции фильтров, например множество портов, извилистых каналов [22], фильтров в форме гребенки и ступенчатого типа [23], с целью эффективного разделения одних частиц от других. Преимущество микрофильтрации состоит в том, что этот процесс не требует создания определенных

буферных условий разделения. Но необходимо, чтобы существовало различие в размерах между разделяемыми видами клеток [20].

Традиционно для изучения клетки используют электрокинетические методы. Наличие особых свойств клетки (например, двойной электрический слой, окружающий клетку) приводит к тому, что электрокинетическое движение клеток происходит по несколько иным принципам, чем в случае высокомолекулярных микрочастиц (ДНК, белки). Электрофорез не позволяет воспроизводимо разделить клетки по каким-либо характеристикам. Поэтому при разделении клеток обычно применяют разные варианты диэлектрофореза (DEP) [21, 24–32]. Из-за простоты DEP широко используется в микрочиповых приборах для разделений бактерий [29–30], раковых клеток [31], стволовых клеток [31] и субпопуляций лейкоцитов [32]. В отличие от микрофльтрации диэлектрическое разделение не ограничено различиями в размерах между клетками или частицами. В принципе, различные типы клеток могут быть отделены с одной и той же конструкцией электрода при подборе соответствующей частоты для каждого типа клетки. Преимущества диэлектрофореза в гибкости, контролируемости и удобстве для автоматизации. По сравнению с микрофльтрацией большинство диэлектрических разделений требует сепарационного буфера с низкой проводимостью, что означает, что клетки не могут быть непосредственно отделены в исходном образце. Evotec Cytocon [33] — пример коммерческой микросистемы для разделения и сортировки клеток, основанной на диэлектрофорезе.

Существуют другие методы для концентрирования, разделения и управления движением микрочастиц, например основанные на ультразвуковых технологиях. Используя акустические волны, клетки и частицы можно перемещать и концентрировать в неподвижном растворе или в потоке [34, 35].

Развитие микро- и нанотехнологий, создание низкоразмерных функциональных структур (каналов, реакторов, смесителей, фильтров, колонок, насосов, датчиков и т.п.), синтез новых наноматериалов дают возможность получить микроаналитические устройства, подходящие для изучения отдельных частиц и клеток. А это в свою очередь обуславливает необходимость эффективного управления движением отдельных частиц и клеток.

Сравнительно недавно появились новые методы и подходы, обеспечивающие возможность эффективного воздействия на частицы в жидкости с помощью внешних полей [36–39]. Целью данного обзора является анализ современных методов и технологий управления движением микрообъектов, которые могут быть применены в микроаналитических приборах и устройствах.

Итак, существуют следующие эффективные способы внешнего физического воздействия на частицы: электрические поля (постоянное и переменное поля); электромагнитное поле — световое поле (обычно лазерное излучение); акустические и магнитные поля.

1. ДИЭЛЕКТРОФЕРЕЗ

В основе диэлектрофореза (Dielectrophoresis, DEP) [27, 28] лежит явление взаимодействия частиц с неоднородным электрическим полем в среде, что является активным подходом к разделению. Так, в переменном электрическом поле клетки проявляют разные диэлектрические свойства в зависимости от характеристик этого поля. Поэтому, выбирая соответствующую частоту поля для образца, можно разделить различные типы клеток и сосредоточить в различных областях микроэлектродов в зависимости от их индивидуальных диэлектрических откликов на прикладываемое электрическое поле. Диэлектрофорез — перемещение микрочастицы в неоднородном электрическом поле, вызванное взаимодействием между вынужденным (индуцируемым) диполем в микрочастице и внешним электрическим полем. "Положительный" DEP соответствует перемещению, в котором микрочастица движется в область более сильного электрического поля, а "отрицательный" — по противоположному направлению [27, 40].

1.1. Основные принципы диэлектрофореза

Если рассматривать микрочастицу (биологический объект — клетку, сложные молекулы, ДНК) как конгломерат молекул, представленных в виде диполей, то на каждую молекулу, помещенную в электрическое поле с напряженностью E , действует сила F . Суммарная сила, приводящая к движению микрочастицы, будет складываться из отдельных электрокинетических сил. Кроме этого, для подобных микрочастиц характерны особые свойства, например двойной электрический слой, который окружает микрочастицу и смещается во внешнем электрическом поле.

Итак, суммарная электрическая сила, действующая на частицу с распределенным зарядом Q в неоднородном электрическом поле E , определяется напряженностью этого поля и может быть рассчитана [27, 28, 41]:

$$F = QE + \delta qE(r_+) - \delta qE(r_-) = QE + (\mathbf{m}\nabla)E,$$

где ∇ — векторный набла-оператор, \mathbf{m} — дипольный момент частицы.

В случаях, когда частица не имеет заряда или при частотах поля ω выше 1 кГц (когда электрофоретические эффекты незначительны), правая

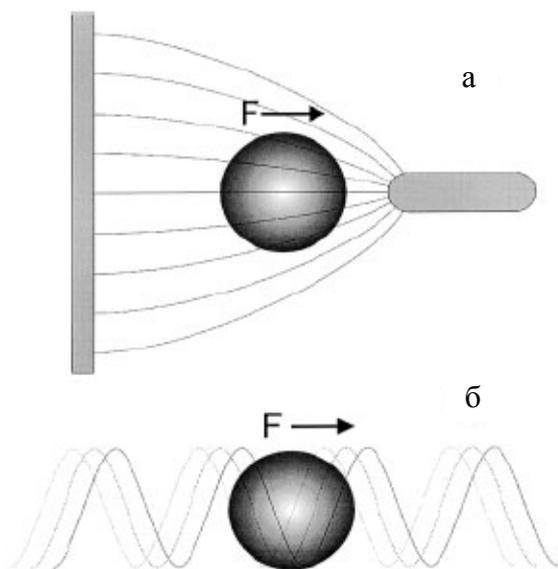


Рис. 1. Частица в неоднородном электрическом поле. Частица подвергается действию неоднородного электрического поля и движется силой, обусловленной: а — градиентом амплитуды поля, б — градиентом фазы поля

часть уравнения (содержащая дипольный момент и градиент электрического поля) значительно преобладает, и поэтому усредненную по времени силу можно выразить как

$$F(\omega) = \text{Re} \{ m(\omega) \} \nabla E^2 / 2E .$$

Диэлектрофоретическая сила зависит от размера частицы, от величины и степени неоднородности приложенного электрического поля (градиент амплитуды или фазы). Вектор этой силы зависит от полярности вынужденного диполя, которая в свою очередь определяется проводимостью и поляризацией микрочастицы и окружающей ее среды. Эта сила вызывает движение частицы в направлении градиента или против него в зависимости, является ли частица более полярной, чем среда, в которой она находится (рис. 1). Диэлектрофоретическая сила возникает только в случае неоднородных полей. В остальных случаях сила равна нулю.

Наиболее простым способом создания неоднородного электрического поля для диэлектрофореза является применение электродов различной формы. Современные методы микро- и нанотехнологий позволяют получить любую геометрию электродов в нужном объеме. Существуют разнообразные конструкции электродов, но самыми распространенными являются сочетания пластинчатых

и игольчатых электродов. Вблизи пластинчатого электрода формируется электрическое поле с меньшей напряженностью, в то время как у игольчатого формируется поле с большей напряженностью.

1.2. Стратегии разделения микрочастиц

В работах [12, 13] рассмотрены некоторые стратегии разделения частиц, которые могут быть реализованы в микрочиповых системах:

- 1) разделение частиц в потоке;
- 2) диэлектрофоретическое фракционирование в поле потока (DEP—Field Flow Fractional, DEP—FFF:);
- 3) пошаговое разделение в потоке (Stepped Flow Separation);
- 4) диэлектрофорез "бегущей волны" (Traveling Wave Dielectrophoresis) и др.

Простейшая реализация первого способа разделения — использование площадки с множеством электродов, через которую проходит поток жидкости со смесью частиц. Часть частиц под действием положительного диэлектрофореза затормаживается, а прочие частицы проходят через площадку, не меняя скорости (рис. 2).

При диэлектрофоретическом фракционировании в поле потока используют отрицательный диэлектрофорез как силу, обеспечивающую нахождение

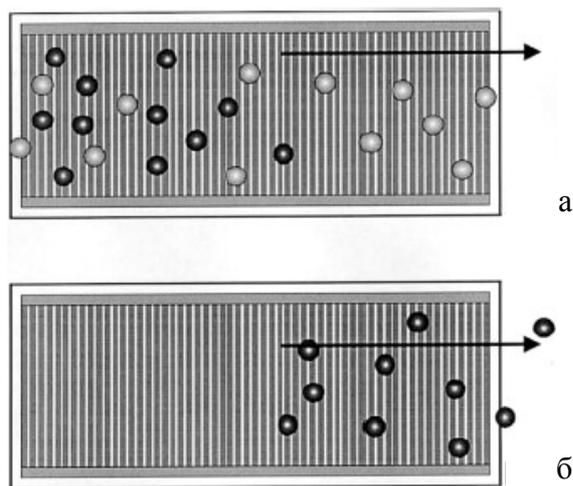


Рис. 2. Разделение частиц в потоке. Два вида частиц (светлые и темные) движутся поперек множества электродов. Темные частицы тормозятся положительным диэлектрофорезом, в то время как легкие (светлые) частицы проходят через площадку (а). Затем электрическое поле снимается, и темные частицы потоком вымываются (б) и могут быть отдельно собраны [13]

частицы на некотором расстоянии от поверхности электродов. При этом на частицу действуют сила тяжести, гидродинамическая и диэлектрофоретическая силы, что позволяет распределить частицы в соответствии с их свойствами послойно над поверхностью электродов. Иногда этот принцип называется принципом гиперслоистого разделения. Подобные устройства использовались для демонстрации фракционирования латексных шариков,

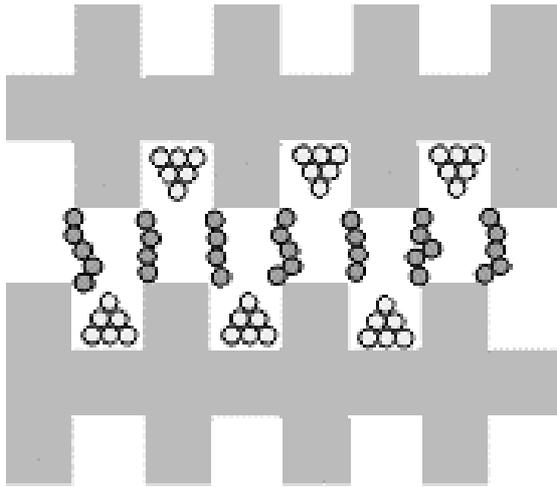


Рис. 3. Разделение частиц с использованием гребенчатых электродов

бактерий и раковых клеток [12].

Пошаговое разделение в потоке осуществляется с помощью специальных диэлектрофоретических шаговых сепараторов — конструкций электродов в виде гребенки (рис. 3). Частицы с большей проводимостью сосредотачиваются в областях с высокой напряженностью поля (положительный диэлектрофорез), образуя скопления

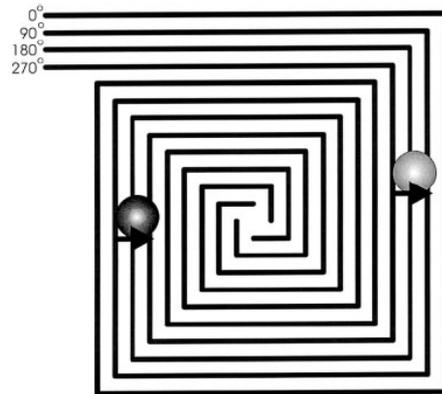


Рис. 4. Разделение частиц способом диэлектрофореза "бегущей волны". На электроды подается сигнал с одинаковой амплитудой и частотой, но со сдвигом фаз на 90° на каждом электроде [13]

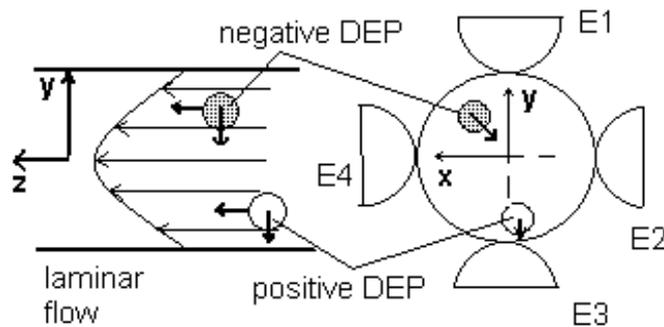


Рис. 5. Принцип диэлектрофоретического разделения при использовании квадрупольного электрода (E1–4) в капилляре или в микроканале. Частицы, смещающиеся в сторону большей и меньшей напряженности электрического поля, попадают в области с разными скоростными профилями и, следовательно, двигаются с различной скоростью (рис. из [39])

в виде бус. Частицы с меньшей проводимостью скапливаются в областях с низкой напряженностью поля, образуя при этом характерные дельтовидные скопления. Чередование циклов подачи и снятия напряжения с потоками, вымывающими частицы, позволяет проводить эффективное разделение частиц.

При разделении частиц способом диэлектрофореза "бегущей волны" применяется изменение градиента фазы электрического поля, обеспечиваемое конструкцией подводящих электродов, выполненных в виде спиральных электродных площадок (рис. 4 [13]). Электроды сформированы так, что создают четыре соединенных в спираль электрода, на которые подаются электрические сигналы со сдвигом фаз. Это дает возможность получить управляемое электрическое поле. Частицы внутри такой конструкции испытывают силу, продвигающую их или к центру спирали, или от центра. Такое устройство полезно для обнаружения редких частиц, поскольку они могут быть перемещены к центру и сконцентрированы из сравнительно большой области, другие же частицы могут быть удалены.

Диэлектрофоретическое разделение частиц может осуществляться и другими способами. Например, вдоль канала расположены электроды, формирующие переменное электрическое поле перпендикулярно направлению движения потока частиц. Сочетание ламинарного потока частиц с положительным или отрицательным диэлектрофорезом частиц приводит к тому, что одни из них замедляются (рис. 5, positive DEP) у стенки капилляра или канала, а другие ускоряются в центре канала (negative DEP).

Вышеизложенные стратегии разделения частиц в микрочипах, конечно, не охватывают все способы, которые применяются в настоящее время.

1.3. Электроротация

Заряженная частица, представляющая собой диполь, может вращаться в электрическом поле. Это явление называется электроротацией, а вращающий момент может быть определен исходя из уравнения

$$\mathbf{T} = \mathbf{m} \times \mathbf{E}.$$

Вращающий момент зависит только от вектора электрического поля и не зависит от градиента напряженности.

Полярные молекулы, частицы и клетки можно вращать с помощью однородного знакопеременного электрического поля. Для создания такого поля необходимо как минимум 4 электрода, расположенных крестообразно (рис. 6). На противоположно расположенные электроды подается знакопеременное напряжение, при этом на смежные

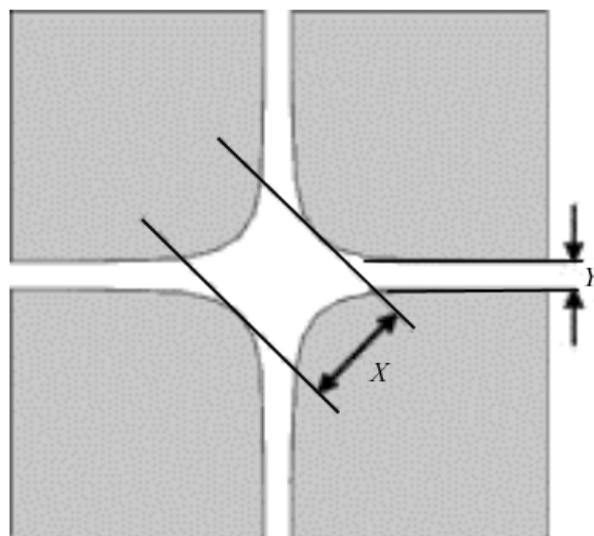


Рис. 6. Составной электрод для электроротации частиц. $X = 6 \text{ мкм}$, $Y = 2 \text{ мкм}$ (рис. из [43])

электроды подается такое же напряжение, но со сдвигом фаз в 90° .

Совместное действие ротационных и диэлектрофоретических сил позволяет реализовать очень чувствительные методики разделения микрочастиц различных типов и клеток. Но для этого необходимо создавать специальные устройства с набором микроэлектродов.

1.4. Диэлектрофорез с изолирующими постами

Одним из недостатков традиционных методов диэлектрофореза является неизбежность контакта исследуемой пробы с электродами, что создает определенные неудобства и ограничивает область изучаемых микрочастиц. Авторами работ [38, 44, 45] был предложен способ создания градиента электрического поля в микрочипе с помощью изолирующих постов, позволяющий устранить ряд недостатков, присущих традиционным конструкциям. Так называемый "струящийся" диэлектрофорез создается с помощью множества изолирующих постов для того, чтобы осуществить концентрирование или разрежение потоков частиц. Этот способ обеспечивает реализацию различных режимов электрокинетически управляемого транспорта частиц, которые определяются сочетанием электроосмотических и электрофоретических сил, действующих на частицы. При низких электрических полях — диэлектрофорез слишком мал по сравнению с электрокинетическим потоком. В умеренных электрических полях — диэлектрофоретические эффекты конкурируют с элек-

трокинетическим потоком, что может привести к концентрированию или разрежению частиц. В сильных полях — диэлектрофорез доминирует над другими транспортными механизмами, заманивая в ловушки частицы в максимумах поля. Эти эффекты открывают новые возможности для непрерывной фильтрации или концентрирования частиц, которые могут использоваться для биологических применений.

Электроосмос и транспортный электрофорез линейно пропорциональны локальному уровню электрического поля, их суперпозиция может быть названа электрокинетическим потоком. Идеальный электрокинетический поток — случай объединенного транспорта, в котором электрокинетическое поле скорости $u_{ек}$ пропорционально локальному электрическому полю E :

$$u_{ек} = \mu_{ек} E = u_{ео} + u_{еп} = (\mu_{ео} - \mu_{еп}) E,$$

где $\mu_{ек}$, $\mu_{ео}$, $\mu_{еп}$ — электрокинетическая, электроосмотическая и электрофоретическая подвижности.

В идеальном электрокинетическом потоке частицы движутся вдоль линий электрических полей. В отличие от электрокинетического потока диэлектрофоретическое движение — вдоль градиента электрического поля, может концентрировать и разрезать частицы. Диэлектрофоретическая скорость пропорциональна градиенту электрического поля:

$$u_{деп} = \mu_{деп} \nabla(E \cdot E).$$

Для растворов поток частиц j в изолированных каналах определяется, включая диффузию, электрокинетический поток и диэлектрофорез:

$$j = -D\nabla c + c [u + u_{ек} + u_{деп}],$$

где D — коэффициент диффузии, c — концентрация частиц, u — неэлектрокинетический компонент скорости.

1.5. Диэлектрофорез биологических частиц

Биологические частицы или клетки, находящиеся в электролите, благодаря наличию на своей поверхности электрического заряда притягивают противоионы из окружающей среды, которые стремятся приблизиться к ионизированным группам клеточной мембраны за счет межмолекулярного взаимодействия. Клетка, имеющая на своей поверхности определенный заряд, стремится притянуть все противоположные по знаку частицы, присутствующие в растворе, но диффузия и тепловое движение молекул не позволяют образовываться большим скоплениям противоионов вокруг клетки. Вблизи поверхности клетки сила электро-

статического притяжения преобладает, и противоионы и диполи воды образуют так называемый двойной электрический слой. Электростатические силы стремятся собрать возможно большее количество противоионов вблизи заряженной поверхности частицы, а молекулярное тепловое движение способствует их равномерному распределению во всем объеме суспензирующей среды. Поэтому вокруг частицы ионы статистически распределяются таким образом, что вблизи поверхности число противоположно заряженных ионов в среднем во времени будет больше, а число одноименно заряженных меньше, чем в окружающей среде, в которой их концентрации равны. Следовательно, вокруг частицы образуется ионная атмосфера с избыточным диффузным зарядом, который является наружной оболочкой двойного слоя. Наиболее высокая плотность электрического заряда двойного слоя вблизи поверхности частицы, при удалении от нее в глубину раствора плотность заряда постепенно уменьшается до нуля [41].

Толщина двойного электрического слоя частицы зависит от ионной силы раствора. При высокой ионной силе раствора двойной электрический слой частицы сжимается, приближаясь по своей структуре к слою Гельмгольца—Перрена, а при низкой ионной силе он увеличивается, соответствуя диффузному слою Гуи—Штерна. Если поместить клетку в однородное электрическое поле с постоянными знаками электродов, то оно приведет к деформации двойного электрического слоя. Частица и окружающая ее среда различаются по электрическим характеристикам (по проводимости и диэлектрической константе). При воздействии электрического поля на границе раздела двух фаз скапливаются наведенные электрические заряды, которые стремятся уменьшить различия в электрических характеристиках частицы и среды. Происходит вынужденная поляризация клетки из-за различия ее электрических характеристик и окружающей среды. Смещение двойного электрического слоя и образование заряда на границе раздела фаз придают клетке свойства электрического диполя, величина которого значительно больше, чем у обычных диполей, образующихся на небольших молекулах. Величина диполя зависит от расстояния между противоположно заряженными частями частицы, даже при небольшом разделенном заряде дипольный момент достигает больших величин из-за существенных расстояний. Вышеуказанное приводит к тому, что электрофорез клеток осуществляется очень быстро, а извлечь при этом какие-либо информативные сигналы, однозначно характеризующие клетки, чрезвычайно затруднительно [41, 45–47].

При решении ряда задач возникает необходимость разделения живых и мертвых клеток. Для мертвой клетки или клетки с малым емкостным

сопротивлением мембраны (как правило, это случается при повреждении мембраны, например, вирусами) электрическое поле свободно проникает внутрь клетки. Цитоплазма клетки, содержащая больше солей и веществ, имеет более высокую проводимость, чем окружающая среда. Электрическое поле, проникая в более проводящую среду, сильно поляризует такую клетку, и общий дипольный момент противоположен полю. Затем этот индуцированный диполь притягивается к соответствующим электродам, причем направление движения определяется полем большей напряженности. В результате мертвые клетки движутся по направлению электрического поля. При помещении живой клетки в электрическое поле неповрежденная мембрана будет представлять собой барьер для проникновения поля внутрь клетки. Значительный вклад в общий дипольный момент вносит смещение двойного электрического слоя вокруг клетки, дипольный момент клетки совпадает с направлением поля. Возникают силы отталкивания образованного диполя от электродов. Но так как существует различие в конфигурации (конструкции) электродов, то силы отталкивания не уравниваются и направление движения диполя должно происходить из области высокой напряженности поля в область низкой напряженности, против направления силовых линий поля.

Электроротация используется для выявления электрических характеристик клеток, которые зависят от внешних воздействий и по изменению которых можно судить о физиологическом состоянии клетки. Это может быть использовано, например, для биологического тестирования загрязненности воды. Если поместить клетку в неблагоприятную для нее среду, то клетка отвечает на это изменением метаболизма, что приводит к изменению дипольного момента и влияет на характер движения клетки в ротационном поле. Явление электроротации также можно использовать для выявления специфичности белков, антител и других биологических молекул. Так называемый электроротационный тест основан на различных электрокинетических характеристиках исследуемых частиц.

В работе [13] демонстрировалось разделение вирусных частиц с различными характеристиками на множестве электродов. Чтобы получить качественное диэлектрофоретическое разделение необходимо правильно выбрать среду разделения.

При диэлектрофорезе происходит нагревание жидкости, в которой осуществляется процесс разделения частиц. В случае биологических частиц важно контролировать и управлять температурой среды, т. к. значительный нагрев может привести к повреждению и разрушению частиц.

Применение метода диэлектрофореза, основанного на использовании изолирующих постов (in-

ulator based electrophoresis) и постоянного электрического поля, демонстрировалось [47] при разделении живых бактерий. Было показано, что проводимость мембран — не единственный параметр, определяющий поведение клеток при диэлектрофорезе. Влияние оказывают и другие факторы и параметры, например размер и форма клетки, а также ее морфологические характеристики.

Следует отметить, что диэлектрофорез является наиболее разработанным и часто используемым методом для разделения и управления микрочастицами, о чем свидетельствуют многочисленные публикации и патенты, например [49–52]. В Интернете даже есть сайт, посвященный проблемам диэлектрофореза [53].

Итак, достоинствами диэлектрофореза являются: простота метода и возможность создания любых конструкций с электродами любой формы, простота управления градиентом поля и использование относительно низких напряжений.

Среди недостатков следует выделить следующие: необходимость подбора среды с требуемыми свойствами (проводимостью), контакт образца с электродами, неизбежный нагрев в процессе разделения.

2. УПРАВЛЕНИЕ ДВИЖЕНИЕМ ЧАСТИЦ С ПОМОЩЬЮ СВЕТОВЫХ ПОЛЕЙ

2.1. Фотофорез

Профессор Феликс Эренхафт (Ehrenhaft) наблюдал и изучал движение частиц пыли, взвешенной в воздухе, под воздействием светового потока от мощной лампы. Некоторые частицы двигались навстречу световому потоку, и это нельзя было объяснить действием светового давления. Эренхафт назвал это явление *фотофорезом* [54]. При поглощении света частицей происходит перераспределение электромагнитной энергии по объему частицы. Внутри частицы возникают источники тепловой энергии, неоднородно нагревающие частицу. Молекулы газа (воздуха) после соударения с частицей отражаются от нагретой стороны частицы с большей скоростью, чем от холодной. В результате этого частица получает нескомпенсированный импульс, направленный от горячей стороны частицы к холодной. В зависимости от размеров, формы, оптических свойств материала частицы более горячей может оказаться как освещенная, так и теневая сторона частицы. Поэтому может иметь место движение навстречу световому потоку и от него (отрицательный и положительный фотофорез). Если поток неоднороден по сечению, то может возникнуть и поперечное относительно направления распространения электромагнитного излучения движение частицы в газе [55]. Эффект изучался в ряде работ, но сначала не имел

практического применения. Появление и широкое внедрение лазеров вновь вызвало интерес к этому явлению, о чем свидетельствует большое количество теоретических и экспериментальных работ [56–58].

Теоретические методы, используемые при выводе выражений для фотофоретической силы и скорости фотофореза частиц, основанные на кинетической теории газов, предполагают, что радиус частицы a во много раз меньше длины свободного пробега λ (число Кнудсена $Kn = \frac{\lambda}{a} \gg 1$), т.е.

частица является "малой". В случае "крупных" частиц (малых чисел Кнудсена) теория фотофореза строится на основе гидродинамического метода (совместно решаются уравнения гидродинамики и уравнения переноса тепла) [59]. При малых числах Рейнольдса ($Re = \frac{Ua}{\nu}$, где U — скорость обтекающего частицу потока газа на большом расстоянии от частицы, ν — коэффициент кинематической вязкости) уравнение гидродинамики заменяется лианеризованным уравнением.

С другой стороны, в зависимости от размера частиц может иметь место релеевское рассеяние света или рассеяние Ми (Mie), что оказывает влияние на фотофорез частиц.

В ходе изучения фотофореза были предложены многочисленные варианты его применения: разделение частиц в жидкости, оптическая левитация частиц в вакууме и в газе, захват, удержание и перемещение частиц в лазерном луче и т.д.

2.1.1. Основные принципы лазерного фотофореза. Сила рассеяния радиационного давления (результат рассеяния и/или поглощения света частицей) достаточно редко используется для целей миграционного анализа микрочастиц, хотя Эшкин (Ashkin) открыл существование такого явления в 1970 г. [60]. Эта сила позволяет осуществить миграцию любых частиц, которые имеют показатель преломления, отличный от такового среды окружения. Другая особенность лазерного фотофореза — то, что этот процесс позволяет обеспечивать перемещение индивидуальных частиц к биологическим объектам и/или непосредственно в них. Кроме того, если частица поглощает свет, наблюдаются некоторые экстраординарные эффекты поведения из-за повышения температуры частицы и окружающей жидкости при фототепловом конверсионном процессе. Фототепловой эффект дает дополнительный способ фотофоретического разделения поглощающих частиц. Поэтому лазерный фотофорез является перспективным методом изучения характеристик и свойств отдельных микрочастиц, а также для перемещения и разделения микрочастиц в жидких средах.

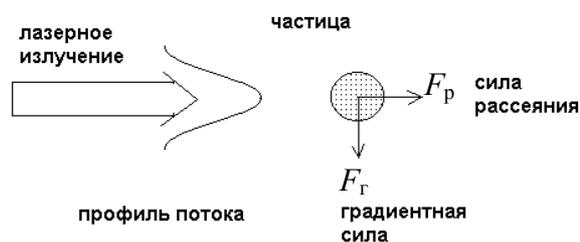


Рис. 7. Фотофорез. Воздействие лазерного излучения на частицу

Если на частицу падает световой поток с гауссовым распределением интенсивности, то фотофоретическая сила (сила рассеяния F_p), оказывающая действие на сферическую частицу, находящуюся в центре потока (рис. 7), определяется соотношением

$$F_p = \frac{2Pnr^2}{c\omega^2} \tilde{Q}, \quad (*)$$

где P — мощность падающего излучения, n — показатель преломления частицы, r — радиус частицы, c — скорость света в вакууме, ω — радиус светового потока лазера в плоскости нахождения частицы, \tilde{Q} — безразмерный коэффициент фотофоретической эффективности.

Коэффициент \tilde{Q} представляет долю падающего потока, которая идет на образование фотофоретической силы. Для случая потока, падающего на полностью отражающую или полностью поглощающую свет сферическую частицу, $\tilde{Q}=1$. Для оптических сил, действующих на маленькие диэлектрические частицы, \tilde{Q} может варьировать от 0.03 до 0.1 [61].

Если сферическая твердая частица в жидкости под действием фотофоретической силы движется со скоростью v , то она подвергается противодействию сил вязкости среды. Сила сопротивления для твердой сферической частицы определяется уравнением Стокса

$$F_R = 6\pi\eta r v,$$

где η — вязкость среды.

Таким образом, при состоянии равновесия фотофоретическая скорость частицы в жидкой среде может быть выражена как

$$v = \frac{2n \text{Pr} \tilde{Q}}{3\pi c \omega^2 \eta}$$

Из уравнения очевидно, что различие в размерах частиц ведет к различной скорости их перемещения, что может использоваться для их разделения по размерам. Кроме того, важно оценить величину \tilde{Q} для интересующей частицы, чтобы анализировать и предсказывать фотофоретическую скорость частиц. Происхождение лучевой силы — передача импульса света к частице из-за отражения, преломления, и поглощения лазерного света частицами, т. е. рассеивания света частицами. Предложены два способа вычисления величины \tilde{Q} : методами лучевой оптики для прозрачных частиц и теории рассеяния Ми. Однако для лучевой оптики затруднительно учитывать эффекты поглощения частицей света. В теории рассеяния Ми падающий луч лазера представлен как электромагнитная волна, и взаимодействие между лучом и сферической частицей определяется уравнениями Максвелла. Поэтому можно оценить влияние длины волны лазера и светового поглощения на величину \tilde{Q} [62, 63].

2.1.2. Фотофорез прозрачных микрочастиц. Авторами работы [64] проведено изучение фотофореза девяти разных видов оптически прозрачных органических частиц радиусом от 1.5 до 4 мкм в воде и показана зависимость фотофоретической скорости от радиуса частиц и показателя преломления. Фотофоретическая скорость прямо пропорциональна мощности лазера и радиусу частиц, что подтверждает правильность соотношения (*). Полученные результаты хорошо согласовывались с теоретическими в рамках модели лучевой оптики. Другими авторами [39] исследован процесс фотофореза полистирольных частиц (радиусом от 0.4 до 1.4 мкм). Было получено, что фотофоретическая эффективность зависит от радиуса частиц и увеличивается с увеличением радиуса. Методами лучевой оптики нельзя было объяснить полученные результаты, тогда как применение модели рассеяния Ми давало хорошее совпадение с экспериментальными результатами. На рис. 8 представлена зависимость фотофоретической эффективности от радиуса полистирольных частиц.

Итак, фотофоретическая эффективность прозрачных сферических маленьких частиц может быть оценена при использовании модели рассеяния Ми, в то время как методы лучевой оптики дают удовлетворительные результаты для более крупных частиц (бóльших, чем длина волны воздействующего излучения).

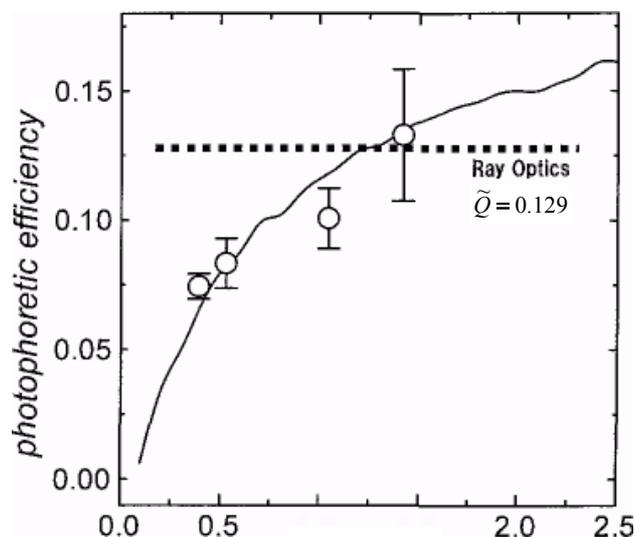


Рис. 8. Зависимость фотофоретической эффективности от радиуса полистирольных частиц. Сплошной и прерывистой линиями обозначена фотофоретическая эффективность, получаемая при вычислении рассеяния Ми и приближения лучевой оптики соответственно. Полистирольные частицы ($n=1.59$) в водной среде ($n=1.33$) при воздействии лазерного облучения на 1064 нм (рис. из [39])

В работе [65] был предложен "оптический хроматограф" для разделения по размерам прозрачных частиц во встречном потоке жидкости с помощью лучевого давления. В их эксперименте лазерный луч был сфокусирован в капилляре с раствором образца, который противотек коаксиально к лучу. Частица осталась в положении, где лучевое давление и тянущаяся сила, вызванная потоком, были сбалансированы. Поскольку фотофоретическая сила зависит от радиуса частицы, то радиус частицы может быть определен в соответствии с ее положением равновесия. Этот метод применялся в иммуноанализе [66]. Использовались частицы полистирола, покрытые антителами, которые реагировали с антигенами. Свободные и связанные частицы в растворе могли быть отделены фотофорезом, затем — определено их соотношение и вычислена концентрация антигенов в растворе.

Разделение частиц с помощью неоднородных оптических полей, образующих "решетку", продемонстрировано в работе [67].

2.2. Оптофорез

При взаимодействии оптических полей с частицей величина воздействующей силы зависит от физических свойств частицы (например, показателя

преломления, состава, морфологии и размера). Оптофорез (Optophoresis) — неразрушающая методика анализа частиц (в том числе живых клеток), основанная на взаимодействии частиц с градиентом оптических полей, обычно создаваемых инфракрасным лазером. Эта методика предполагает измерение движения или изменения в движении частицы в поле с градиентом. Некоторые оптофоретические методы измерения были развиты и применены для анализа клеток в стеклянных микрочипах [68, 69].

Разновидностью оптофоретических методов является "времяпролетный" оптофорез (time-of-flight optophoresis, TOP optophoresis) — выполнение методики в микрофлюидном устройстве, при которой измеряется время прохождения частицей заданного расстояния с и без лазерного излучения. Эта технология позволяет сортировать различные частицы (клетки) без специфичных маркеров и красителей. Система, в которой были использованы капилляры и стеклянный микрофлюидный чип с каналами шириной 50 мкм, глубиной 20–25 мкм, испытана при анализе и разделении здоровых от злокаче-

ственных раковых клеток. Наблюдалось, что при движении биологических объектов (живых клеток) в световом потоке от лазера различия в скорости движения частиц в канале микрочипа связаны с ее биологическими свойствами [37].

Можно записать следующее соотношение, учитывающее действие сил (в плоскости XY) на частицу при оптофорезе (рис. 9):

$$m \frac{d^2x}{dt^2} = F_{\text{optica_lateral}}(x, y, z) - F_{\text{drag}} \left(\frac{dx}{dt} - v_f(y, z) \right),$$

x — координата центра частицы по направлению потока, m — масса частицы, dx/dt — скорость частицы, d^2x/dt^2 — ускорение частицы, $v_f(z)$ — скорость потока на глубине z , $F_{\text{optica_lateral}}$ — оптическая сила, действующая на частицу вдоль латеральной оси X , F_{drag} — сила движения жидкости.

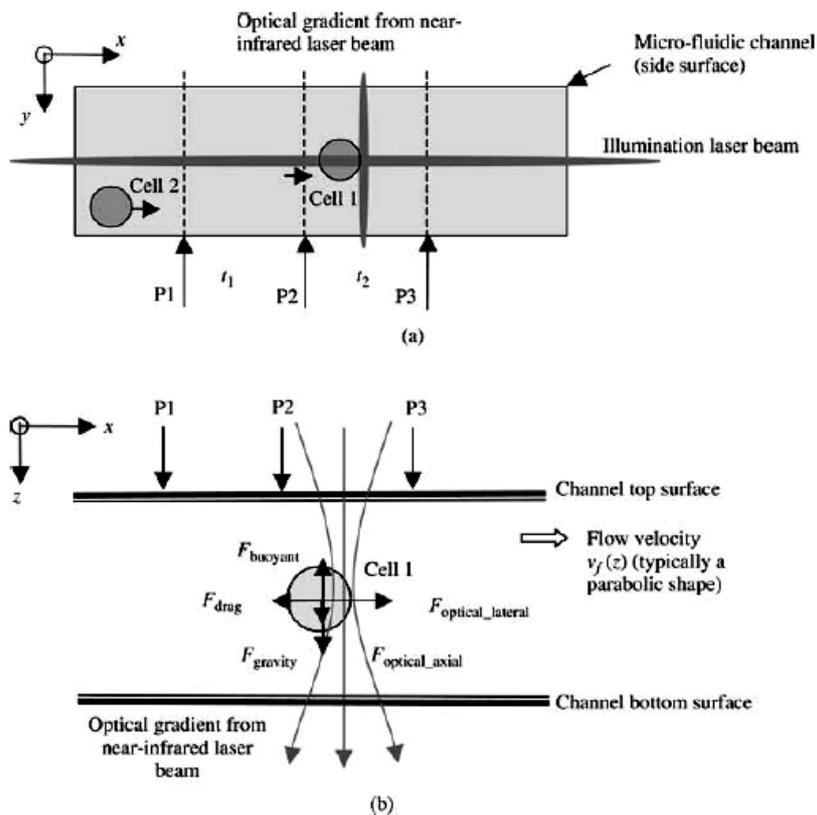


Рис. 9. Времяпролетный оптофорез (рис. из [37])

Техника "временнoго оптофореза", выполненная в канале микрофлюидного чипа, иллюстрируется рис. 9, (а). Три одинаковых области: P1, P2 и P3 регистрируются отдельно фотодатчиками, чтобы обнаружить присутствие и положение частиц, движущихся в канале. Градиент оптического поля от сфокусированного лазерного луча (в ближней инфракрасной области) создается между второй (P2) и третьей (P3) областями. Лазерный луч фокусируется в микроканале по оси Z, как показано на рис. 9, (б). Время прохождения частицы из первой позиции (P1) ко второй (P2) определяется как t_1 ; а время прохождения от второй позиции (P2) к третьей (P3) — как t_2 . В отсутствие оптического градиента и в случае стабильного потока $t_2 = t_1$. Когда оптический градиент присутствует, силы, действующие на частицу, будут менять время прохождения t_2 . Кроме того, луч лазера с небольшой мощностью освещает центр канала по направлению движения потока, так что только частицы, движущиеся в центре канала и освещенные этим лучом, регистрируются фотодатчиками. В случае, изображенном на рис. 9, (а), только частица Cell 1 будет обнаружена, в то время как частица Cell 2 будет игнорироваться. Отметим, что это маломощное лазерное освещение не производит никакого существенного оптического воздействия на частицу, по сравнению с ИК-лазерным излучением (несколько мВт против Вт).

В октябре 2000 г. для разработки оптических технологий и методов анализа клеток была сформирована компания Genoptix (Сан-Диего, США) [70]. Genoptix создала технологическую платформу для исследования биологических свойств живых клеток без маркеров, меток и т.п., основанную на методе оптофореза. Оптофорез считается единственной технологией, способной одновременно анализировать и разделять клетки, основываясь на фундаментальном различии откликов разных клеток на воздействие окружающей среды. Технологии Genoptix предполагают новые подходы при изучении биологических систем в фармацевтических исследованиях, клинической диагностики, биотерапевтических исследованиях.

Итак, оптофорез позволяет:

- анализировать микрочастицы и клетки в их естественном состоянии, без маркеров;
- идентифицировать и сортировать микрочастицы и клетки;
- наблюдать микрочастицы в режиме реального времени и изучать их взаимодействие с другими частицами (например, клетки с лекарствами);
- осуществлять неоднократные измерения на одном и том же образце;
- управлять и контролировать процессы анализа полностью (от начала до конца).

2.3. Оптический пинцет (Optical tweezer)

В 1968 г. доктором В.С. Летоховым (Институт спектроскопии РАН) была теоретически показана возможность поляризации и захвата нейтральных частиц (атомов) в неоднородных полях, порождаемых лазерным излучением. Причем световое излучение должно удовлетворять ряду требований, в частности иметь частоту, совпадающую с частотой собственных колебаний электронов на своих орбитах. Иначе фотоны не будут поглощаться электронами, а атом не получит импульсов торможения. Используя эффект Доплера, можно подобрать частоту лазерного излучения таким образом, что фотоны будут поглощаться (восприниматься) только атомами, двигающимися навстречу световому излучению. Спустя несколько лет американский физик А. Эшкин предложил конструкцию лазерной ловушки для нейтральных частиц, которая позднее была реализована. Дальнейшее развитие этих работ было осуществлено исследователями из Станфордского Университета под руководством профессора С. Чу, которым удалось создать установку для перемещения микрообъектов. Идеология, воплощенная в этих установках получила название laser (optical) tweezers — "лазерный (оптический) пинцет". За разработку методов лазерного охлаждения и удерживания атомов Нобелевский комитет в 1997 г. присудил премию Стивену Чу (Станфордский университет), Уильяму Филиппу (Национальный институт стандартов и технологии США, штат Мэриленд) и Клоду Коэн-Таннуджи (Высшая нормальная школа и Коллеж де Франс в Париже).

2.3.1. Основные принципы "оптического пинцета". Техника "оптического пинцета" основана на силе, возникающей в сфокусированном световом луче, которая позволяет удерживать и перемещать микроскопические количества вещества. При фокусировке лазерного излучения линзой с большой числовой апертурой частица захватывается вблизи фокальной точки градиентной силой, известной как оптический пинцет, в то же время, если поток не сфокусирован, частица движется вперед силой рассеяния радиационного давления (фотофорез). В случае падения фотона на непрозрачную (поглощающую или отражающую) поверхность ей сообщается импульс, т.е. поверхность испытывает световое давление. Если осветить лазером прозрачную частицу, то световой пучок преломляется на ней — изменяется направление вектора скорости света и, следовательно, направление импульса. При этом возникает изменение силы, которое действует на частицу так, что она двинется в сторону наибольшей интенсивности лазерного пучка. Интенсивность лазерного пучка максимальна на его оси и плавно спадает к краям. Поэтому частица удерживается на оси

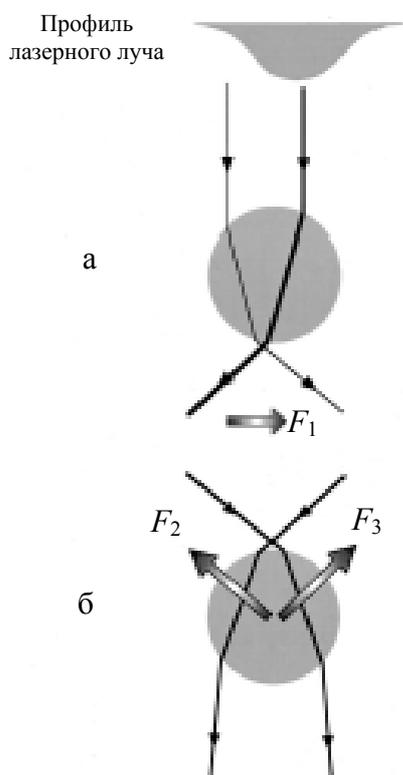


Рис. 10. Преломление света диэлектрической частицей (а) и силы, действующие на нее, (б)

пучка, а при фокусировке пучка линзой она "втягивается" в точку фокуса и оказывается "пойманной" в трех измерениях (рис. 10). Чтобы создать силы, способные осуществить такую "трехмерную ловушку", требуется излучение мощностью порядка нескольких милливатт. Размер захваченных частиц может колебаться от долей длины волны до нескольких десятков микрон. Перемещением фокуса можно передвигать частицы, выстраивая из них самые разнообразные конструкции.

Технология оптического пинцета хорошо изучена и широко используется для захватывания, поднятия или манипуляции с микрочастицами или биологическими объектами в жидких средах.

Вычисление сил захвата в лазерном пинцете может быть выполнено в рамках геометрической оптики или с помощью электромагнитной теории света. В первом случае объекты должны иметь размер $>10\lambda$ (длин волн лазерного излучения); для частиц, имеющих размер меньше, чем длина волны, используется электромагнитное приближение [71].

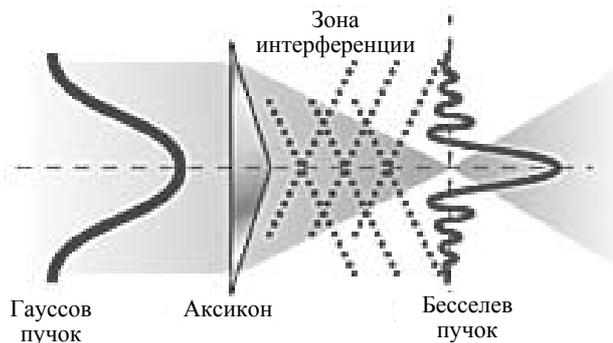


Рис. 11. В обычном лазерном излучении интенсивность света максимальна в центре пучка и плавно падает к его краям (гауссов пучок). При установке конической линзы — аксикона отклоненные лучи интерферируют, создавая сложную картину распределения интенсивности (яркое центральное пятно, окруженное системой колец) [74]

"Оптический пинцет" обладает рядом недостатков. Во-первых, чем сильнее стянут пучок в фокус, тем быстрее он расходится после него. Это означает, что сила, удерживающая частицу, быстро падает по мере удаления от зоны захвата и уже на расстоянии нескольких десятков микрон от фокуса оказывается недостаточной, чтобы снова захватить частицу. Однопучковая ловушка эффективна лишь для захвата одиночной частицы в области фокуса. Во-вторых, лазерный пучок после взаимодействия с объектом будет отличаться от исходного из-за дифракции, преломления, отражения и поглощения, что также ограничивает расстояние, на котором он может действовать как оптический пинцет. Кроме того, определенное влияние оказывает расходимость светового потока: чем сильнее он расходится, тем хуже его фокусирует оптическая система, а получить идеально параллельный пучок принципиально невозможно из-за дифракции. В 1987 г. американские физики Дж. Дарнин, Дж. Майсели и В. Эберли [72] показали, что существует класс световых пучков, фактически свободных от дифракции. Их проекция на экран выглядит как яркое пятно, окруженное системой концентрических колец (такое распределение интенсивности описывает функция Бесселя, и поэтому сами пучки называют бesselевыми). Существуют методы превращения гауссова пучка в бesselевый, основанные на использовании конических линз, голограмм или пространственных модуляторов света (рис. 11) [73–78]. Бesselеву пучку присущи полезные свойства, которые используются на практике. "Оптический пинцет", использующий бesselев пучок, способен захватывать частицы,

разнесенные на расстояние 3 мм. В этих экспериментах использовалось лазерное излучение с длиной волны 1.064 мкм, образующее бесселев пучок с ярким центральным пятном, окруженным 19 кольцами. Общая мощность излучения составляла 700 мВт, из которой на центральное пятно приходилось примерно 35 мВт. Захватывалась полая сфера диаметром около 5 мкм между центральным пятном и первым кольцом пучка. Сфера искажала пучок, который за ней восстанавливался и работал как оптический пинцет, сводящий вместе три кварцевые сферы диаметром 5 микрон. После этого пучок восстанавливался еще раз.

В настоящее время техника использования бесселевых световых потоков хорошо разработана и продемонстрирована в ряде экспериментов [75–79].

2.3.2. Применение техники "оптического пинцета". Новые возможности открывает техника оптического пинцета перед химиками, биологами и биофизиками, поскольку принципы захвата атомов применимы к частицам микронных размеров, например полистирольным шарикам, которые можно присоединить к одиночным молекулам. Профессор С. Чу изучал таким способом мышечное сокращение на молекулярном уровне, упругие свойства ДНК, других биополимеров. В статье [80] обсуждаются эксперименты на уровне отдельных молекул, являющиеся новым направлением в биофизических исследованиях ДНК. При экспериментах с отдельными молекулами ДНК обычно концы молекул химически модифицируют, и один из них фиксируется на поверхности или микрочастице полимерного носителя. Второй присоединяется к поверхности полимерной частицы, но не фиксируется, и с незакрепленным концом производят эксперименты, удерживая его оптическим или магнитным пинцетом. Таким образом возможно прилагать к индивидуальным молекулам ДНК внешнюю силу. В результате были изучены структурные переходы двойной спирали ДНК под воздействием внешнего напряжения. В работе [81] приведен краткий обзор принципов действия оптических пинцетов и представлены два новых примера использования осциллирующих лазерных пинцетов для исследования динамических сил в коллоидных средах: зондирование микроскопических вязких свойств неустойчивых полимерных цепей вблизи поверхности коллоидных частиц и изучение гидродинамического парного взаимодействия частиц в суспензии.

При воздействии на биологические объекты важно, чтобы частица, которая будет поймана в ловушку, являлась прозрачной для лазерного света, поскольку поглощение излучения приводит к нагреву и следовательно, к оптическому повреждению образца. Биологические частицы погло-

щают излучение в видимом спектральном диапазоне, поэтому для "захвата" биологического материала часто выбирается область ближнего инфракрасного диапазона (700–1300 нм), т. к. дальний инфракрасный диапазон поглощается частицами воды [82]. Кроме этого, для микроскопических объектов длины волн в дальнем инфракрасном диапазоне не используются. Лазеры, применяемые в оптических твизерах: Nd: YAG — 1064 нм, Nd: YLF — 1047 нм, Nd: YVO₄ — 1064 нм, Ti: Al₂O₃ — 695–1100 нм. Диодные лазеры, работающие на длинах волн 700–1300 нм, менее дорогостоящие, но имеют невысокую мощность. Сфокусированный лазерный луч может захватывать в ловушку частицу при мощностях около 10 мВт, если выполнены некоторые дополнительные условия, но в общем используются ловушки с оптической мощностью от 10 мВт до 1 Вт. Лазер для оптического захвата биологических частиц должен использоваться в непрерывном режиме генерации, поскольку импульсные лазеры могут повредить образец из-за высокой плотности энергии. Поэтому могут наблюдаться фотоповреждения и термоповреждения частиц [83].

Сочетая метод "оптического пинцета" с использованием других лазерных пучков, можно, например, захватить отдельную частицу и разрезать ее на кусочки для дальнейшего анализа. Для захвата частиц часто применяют инфракрасное излучение с длиной волны $\lambda=1.064$ мкм, а вторую гармонику этого излучения — зеленый свет ($\lambda=0.532$ мкм) иногда используют для разрезания частиц: биологические объекты почти прозрачны в инфракрасной области, но сильно поглощают зеленый свет.

Для успешного использования "лазерного пинцета" необходимо точно подбирать мощность излучения, создающую необходимую силу захвата. Но воздействие лазерного излучения приводит к изменениям, происходящим в биологических микрообъектах, что требует особого тщательного изучения. В литературе приводятся достаточно скудные данные о зависимости силы захвата от мощности лазерного излучения и влияния излучения на биологические объекты [84–86].

Авторами работы [87] разработаны технология и устройства для создания безвихревых и самосводящихся оптических ловушек с использованием компьютерно-синтезированных голограмм, которые могут быть применены в качестве "оптических пинцетов" нового типа для бесконтактного захвата и манипулирования микрообъектами. Проведены эксперименты с частицами 10–15 мкм, которые захватывались и перемещались относительно предметного столика микроскопа.

Некоторыми теоретическими и экспериментальными аспектами проблемы использования оптических ловушек для биологических объектов

занимаются и российские исследователи, например, в Самарском филиале Физического института им. П.Н. Лебедева РАН [88].

Микрочастицы, захваченные в фокусе лазерного луча, имеют склонность вращаться. Угловой момент вращения может быть обусловлен как самим светом (поляризация, фазовая структура), так и свойствами захваченной частицы [89, 90]. Используя этот эффект можно измерить упругость скручивания молекулы ДНК, измерять микроскопическую вязкость, изготавливать и манипулировать микроскопическими объектами.

Появление новых фотополимеризующихся материалов привело к возможности создания произвольных конструкций с помощью лазерного излучения в предельно малых объемах. Управляемым перемещением луча можно получить объект любой формы и привести его в движение. Микрочастицы захватывались и удерживались в фокусе инфракрасного полупроводникового лазера "оптическим пинцетом" (Zeiss и Cell Robotics). Затем проводили процесс полимеризации при двухволновом облучении (два лазерных луча с различной длиной волны, один — сфокусированный, другой — слабо "расфокусированный") оптического клея Norland. Клей облучался ультрафиолетовым светом, а в фокусе луча аргонового лазера достигалась необходимая интенсивность для полимеризации. Из образовавшегося стеклообразного полимера, помещенного на трехосную пьезоплатформу, с помощью "лазерного пинцета" создавались детали нужной конфигурации в масштабе нескольких микрон. След лазера при перемещении образует тонкую полимерную нить, размер которой зависит от фокусировки и мощности лазерного пучка и достигал в этих экспериментах 0.5 мкм при ин-

тенсивности излучения 20 мВт. Таким образом удалось создавать различные микродетали — роторы, шестеренки, и т. п. Кроме того, сфокусированный луч лазерного пинцета мог удерживать, например, ротор в нужном положении и создавать необходимый поток для его вращения [91].

С помощью компьютерных дифракционных оптических элементов американским исследователям удалось сформировать двумерную систему оптических фокусов, которая может использоваться для сборки больших количеств коллоидных частиц в сложные двух- или трехмерные системы. Перемещая смесь частиц через поле таких ловушек с помощью перепада давления, электрофореза и т. д., можно захватывать, сортировать и разделять одни частицы от других [92].

В [67] демонстрируется возможность оптической сортировки микроскопических биологических частиц трехмерной "оптической решеткой". Сила взаимодействия с участками "решетки" зависит от оптической поляризуемости частиц, показателя преломления и других характеристик. Показано, что эта техника подходит для сортировки и фракционирования частиц в микрофлюидных системах ("лабораториях на чипе") и может применяться в молекулярных и биологических исследованиях.

Применение двумерных и трехмерных "оптических решеток" позволяет улучшить качество разделения микрочастиц, получить новые возможности для манипуляций с множеством одинаковых частиц и т. п. [93–95]. Техника и методы "оптического пинцета" непрерывно развиваются [96, 97], становясь все более доступными для широкого круга применений.

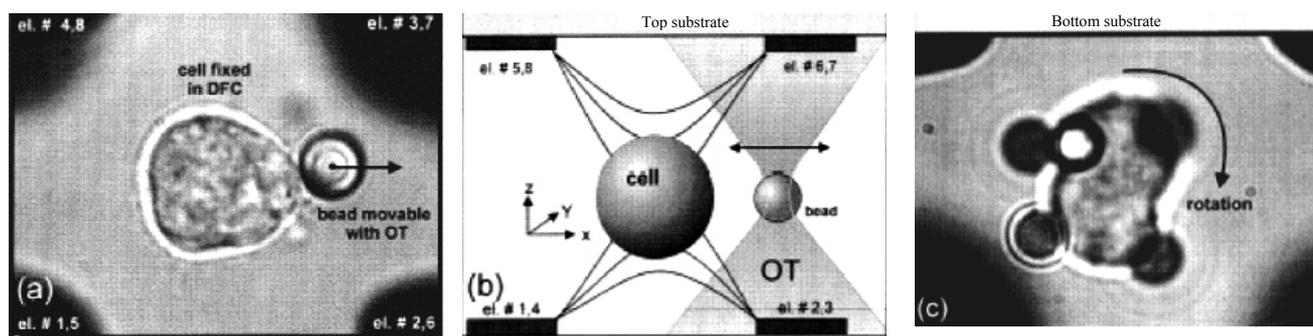


Рис. 12. Применение диэлектрофореза и техники оптического пинцета для измерения прилипания частицы к клетке: (а) — 4.1 мкм частица полистирола, пойманная лазерным пинцетом (справа) в контакте с клеткой (T-lymphoma cell, 15 мкм в диаметре); (б) — схематическое представление эксперимента для измерения силы прилипания между частицей и клеткой; (с) — исследование поверхностных областей клетки при прилипании частиц (рис. из [98])

Эффективные результаты дает комбинированное использование техники диэлектрофореза и оптического пинцета. Авторы [98] сообщают о микрочиповом устройстве, основанном на сочетании техник оптического пинцета и диэлектрофореза, для изучения взаимодействия клетки с микрочастицами. Устройство позволяет проводить манипуляции с микронной точностью (рис. 12).

Другая микрофлюидная система [99] предназначена для высокопроизводительного разделения и изоляции отдельных живых клеток или микроорганизмов в присутствии большого количества других клеток в образце. Система также основана на объединении техник диэлектрофореза и оптического пинцета. Скорость потока в микроканале выбрана таким образом, чтобы обеспечить баланс оптических сил на клетке. Захваченная клетка (или микроорганизм) может транспортироваться через систему микроканалов и отделяться от других частиц. Это — многообещающая методика для разделения микробов, культивирования клеток и т. д. [100].

К достоинствам методов управления движением частиц с помощью световых полей следует отнести высокую эффективность их воздействия на частицы. Кроме того, эти методы достаточно просто могут быть реализованы в микрофлюидных устройствах. Наиболее привлекательными для решения целого ряда задач являются комбинированные методы, использующие, например диэлектрофорез и технику "оптического пинцета", диэлектрофорез и фотофорез (или оптофорез).

Одной из проблем, возникающих при применении лазерного излучения, является воздействие излучения на живые микрообъекты. Изменения, вызванные лазерным излучением, начали изучать еще в 1981 г., когда группа ученых, возглавляемая Бернсом из института Бекмана в Калифорнии, обнаружила вредное действие лазерного света (532 нм) на яйцеклетки китайского хомяка. Но до сих пор влияние лазерного излучения на биологические объекты недостаточно хорошо изучено, что создает дополнительные трудности при использовании излучения для управления и анализа биочастиц.

Световые поля могут вызывать фототепловой эффект, который может приводить к сильному нагреву и даже к повреждению образца. Поэтому важно учитывать этот эффект, соответствующим образом выбирая длины волн воздействующего излучения. С другой стороны, фототепловой эффект так или иначе оказывает дополнительное влияние на частицы, что также необходимо учитывать, например, в случае фотофоретического разделения частиц.

Трудности возникают при использовании техники "оптического пинцета" для манипуляций с объектами, размеры которых меньше длины

волны зондирующего излучения. Такие объекты сложно контролировать. Определенные ограничения, определяющие минимальный диаметр светового пятна, существуют при фокусировке лазерного излучения.

Благодарности. Работа выполнена при поддержке фонда РФФИ, грант № 03-01-39003 GFEN_a.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. McEnery M. et al. Liquid chromatography on-chip: progression towards a μ -total analysis system // *Analyst*. 2000. V. 125. P. 25–27.
2. Kutter J.P. Current developments in electrophoretic and chromatographic separation methods on microfabricated devices // *Trac-Trends In Analytical Chemistry*. 2000. V. 19. P. 352–363.
3. Reyes D.R., Iossifidis D., Auroux P.-A., Manz A. Micro total analysis systems // *Anal. Chem.* 2002. V. 74. P. 2623–2652.
4. Sanders G.H.W., Manz A. Chip-based microsystems for genomic and proteomic analysis // *Trends in analytical chemistry*. 2000. V. 19, N 6. P. 364–378.
5. Khandurina J., Guttman A. Bioanalysis in microfluidic devices // *Chromatography, A*. 2001. V. 924 (1–2). P. 233–238.
6. Verpoorte E. Microfluidic chips for clinical and forensic analysis // *Electrophoresis*. 2002. V. 23. P. 677–712.
7. Huang Y., Mather E.L., Bell J.L., Madou M. MEMS-based sample preparation for molecular diagnostics // *Anal. Bioanal. Chem.* 2002. V. 372. P. 49–65.
8. Figeys D., Pinto D. Lab-on-a-chip: A revolution in biological and medical sciences // *Analytical Chemistry*. 2000. V. 72. P.330A–335A.
9. Beebe D.J., Mensing G.A., Walker G.M. Physics and applications of microfluidics in biology // *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2002. N 4. P. 261–286.
10. Sato K. et al. Integration of chemical and biochemical analysis system into a glass microchip // *Analytical Sciences*. January 2003. V. 19. P. 15–22.
11. Greenwood Paul A. and Greenway Gillian M. Sample manipulation in micro total analytical systems // *TRAC Trends in Analytical Chemistry*. 2002. V.21, N 11. P. 726–740.
12. Gascoyne P.R.C., Vykoukal J. Particle separation by dielectrophoresis // *Electrophoresis*. 2002. V. 23. P. 1973–1983.
13. Hughes M.P. Strategies for dielectrophoretic separation in laboratory-on-a-chip systems // *Electrophoresis*. 2002. N 23. P. 2569–2582.
14. Proceedings of the μ Tas 2001 Symposium "Micro Total Analysis Systems 2001", Monterey, Ca.,

- USA, 21–25 October, 2001 / Ed. J. Michael Ramsey and Albert J. Van den Berg. Kluwer, Academic Publishers, 2001. 724 p.
15. Proceedings the 6th International Symposium on Micro Total Analysis Systems (μ Tas) "Micro Total Analysis System 2002", 3–7 November, 2002 / Ed. Yoshinobu Baba. Nara, Japan.
 16. Proceedings of μ TAS 2003 7th International Conference on Micro Total Analysis Systems "Micro total analysis system 2003" / Ed. M. Allen Northrup, Klavs F. Jensen, D. Jed Harrison. Squaw Valley, California, USA, October 5–9, 2003. V. 1 & 2.
 17. Oosterbroek R.E., Berg A. Van Den Lab-on-a-chip: miniaturized systems for (Bio) chemical analysis and synthesis. Elsevier Science, 2003. 391 p.
 18. Dolnic V., Liu S., Jovanovich S. Capillary electrophoresis on microchip // *Electrophoresis*. 2000. N 21. P. 41–54.
 19. Carey L., Mitnik L. Trends in DNA forensic analysis // *Electrophoresis*. 2002. N 23. P. 1386–1397.
 20. Huang Y., Mather E.L., Bell J.L., Madou M. MEMS-based sample preparation for molecular diagnostics // *Anal. Bioanal. Chem.* 2002. V. 372. P. 49–65.
 21. Greenwood P.A., Greenway G.M. Sample manipulation in micro total analytical systems // *TRAC Trends in Analytical Chemistry*. 2002. V. 21, N 11. P. 726–740.
 22. Wilding P. et al. Manipulation and flow of biological fluids in straight channels micromachined in silicon // *Clin. Chem.* 1994. V. 40. P. 43–47.
 23. Yuen P.K et al. Microchip module for blood sample preparation and nucleic acid amplification reactions // *Genome Res.* 2001. N 11. P. 405–412.
 24. Hölzel R. Single particle characterization and manipulation by opposite field dielectrophoresis // *Journal of Electrostatics*. 2002. V. 56, N 4. P. 435–447.
 25. Dürr M. et al. Microdevices for manipulation and accumulation of micro- and nanoparticles by dielectrophoresis // *Electrophoresis*. 2003. V. 24, N 4. P. 722–731.
 26. Li Y., Kaler K.V.I.S. Dielectrophoretic fluidic cell fractionation system // *Analytica Chimica Acta*. 1 April 2004. V. 507, N 1. P. 151–161.
 27. Pohl H.A. Dielectrophoresis. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1978. 720 p.
 28. Jones T.B. Electromechanics of particles. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1996. 285 p.
 29. Cheng J et al. Isolation of cultured cervical carcinoma cells mixed with peripheral blood cells on a bioelectronic chip // *Anal. Chem.* 1998. V. 70. P. 2321–2326.
 30. Huang Y. et al. Electric manipulation of bioparticles and macromolecules on microfabricated electrodes // *Anal. Chem.* 2001. V. 73. P. 1549–1559.
 31. Yang J. et al. Cell separation on microfabricated electrodes using dielectrophoretic/gravitational field-flow fractionation // *Anal. Chem.* 1999. V. 71. P. 911–918.
 32. Yang J. et al. Differential analysis of human leukocytes by dielectrophoretic field-flow-fractionation // *Biophys. J.* 2000. V. 78. P. 2680–2689.
 33. Gradl G., Muller T., Pfennig A., Shirley S., Schnelle T., Fuhr G. // *Micro total analysis systems* / Ed. Van den Berg A., Olthius W., Bergveld P. Kluwer Academic Publishers, Enschede, The Netherlands, 2000. P. 443–445.
 34. Coakley W.T. et al. Analytical scale ultrasonic standing wave manipulation of cells and microparticles // *Ultrasonics*. 2000. V. 38. P. 638–641.
 35. Ballantine D.S. et al. Acoustic wave sensors, theory, design and physico-chemical applications. Academic Press, London, UK, 1997. 111 p.
 36. Lu., Huang W.-H., Wang Z.-L., Cheng J.-K. Recent developments in single-cell analysis // *Analytica Chimica Acta*. 17 May 2004. V. 510, N 2. P. 127–138.
 37. Zhang H. et al. Time-of-flight optophoresis analysis of live whole cells in microfluidic channels // *Biomedical Microdevices*. 2004. V. 6, N 1. P. 11–21.
 38. Cummings E.B., Singh A.K. Dielectrophoresis in Microchips Containing Arrays of Insulating Posts: Theoretical and Experimental Results // *Anal. Chem.* 2003. V. 75. P. 4724–4731.
 39. Watarai H. et al. Migration analysis of microparticles in liquids using microscopically designed external fields // *Anal. Sci.* 2004. V. 20. P. 423–434.
 40. Pohl H.A. Some effects of nonuniform fields on dielectrics // *J. Appl. Phys.* 1958. V. 29. P. 1182–1188.
 41. Казанкин Д.С. Электрокинетические методы прижизненного исследования клеток. Практическая информация. Теоретическая информация и математические выкладки. <http://ikar.udm.ru>
 42. Wang X.-B. et al. Theoretical and experimental investigations of the interdependence of the dielectric, dielectrophoretic and electrorotational behaviour of colloidal particles // *J. Phys. D: Appl. Phys.* 1993. V. 26. P. 312–322.
 43. <http://www.elec.gla.ac.uk/~jbarker/bioelectronics/Welcome.html>
 44. Chou C.-F., Zenhausern F. Electrodeless dielectrophoresis for micro total analysis systems // *IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine*. November/December 2003. P. 63–67.
 45. Pethig R. Application of A.C. electrical fields to the manipulation and characterization of cells //

- Automation in Biotechnology / Ed. I. Karube. Elsevier, 1991. P. 159–185.
46. Wang X.-B. et al. Selective dielectrophoretic confinement of bioparticles in potential energy wells // J. Phys. D: Appl. Phys. 1993. V. 26. P. 1278–1285.
 47. Markx G.H. and Pethig R. Dielectrophoretic separation of cells: continuous separation // Biotechnol. Bioeng. 1995. V. 45. P. 337–343.
 48. Lapizco-Encinas B.H., Simmons B.A., Cummings E.B., Fintschenko Y. Insulator-based dielectrophoresis for the selective concentration and separation of live bacteria in water // Electrophoresis. 2004. V. 25. P. 1695–1704.
 49. Becker et al. Method and apparatus for manipulation using spiral electrodes. Patent US 5.858.192. Jan. 12. 1999.
 50. Krulevitch et al. Microfluidic DNA sample preparation method and device. Patent US 6.352.838 B1. Mar. 5. 2002.
 51. Becker et al. Method and apparatus for fractionation using conventional dielectrophoresis and field flow fractional. Patent US 6.641.708 B1. Nov. 4. 2003.
 52. Gascoyne et al. Systems and method for cell subpopulation analysis. Patent US 2002/0036142 A1. Mar. 28. 2002.
 53. <http://www.dielectrophoresis.org/>
 54. Ehrenhaft F. // Ann. Phys. 1918. Bd. 55. P. 81–132 (Ehrenhaft Felix Photophoresis and its interpretation by electric and magnetic ions // Journal of the Franklin Institute. March 1942. V. 233. P. 235–255).
 55. Кутуков В.Б., Яламов Ю.И. // Нелинейные эффекты при распространении лазерного излучения в атмосфере. Томск, 1977. С. 145–147.
 56. Lin S.P. On photophoresis // J. Colloid Interface Sci. 1975. V. 51, N 1. P. 66–71.
 57. Tong N.T. Experiments on photophoresis and thermophoresis // J. Colloid Interface Sci. 1975. V. 51, N 1. P. 143–151.
 58. Яламов Ю.И., Хасанов А.С. Фотофорез гетерогенных по теплопроводности крупных аэрозольных частиц // ЖТФ. 1998. V. 68, № 4. С. 1–6.
 59. Хаппель Дж., Бреннер Г. Гидродинамика при малых числах Рейнольдса. М.: Мир, 1976. 632 с.
 60. Ashkin A. Acceleration and trapping of particles by radiation pressure // Phys. Rev. Lett. 26 January 1970. V. 24, Issue 4. P. 156–159.
 61. Molloy J.E., Padgett M. Light, action: optical tweezers // Contemporary Physics. 2002. V. 43. P. 241–258.
 62. Борн М., Вольф Э. Основы оптики. М.: Наука, 1973. 720 с.
 63. Huisken J., Stelzer E.H.K. Optical levitation of absorbing particles with a nominally Gaussian laser beam // Optics Letters. July 15, 2002. V. 27, N 14. P. 1223–1225.
 64. Hirai A., Monjushiro H., Watarai H. // Langmuir. 1996. N 12. P. 5570–5575.
 65. Imasaka T., Kawabata Y., Kaneta T., Ishidzu Y. Optical chromatography // Anal. Chem. 1995. V. 67. P. 1763–1765.
 66. Hatano T., Kaneta T., Imasaka T. Application of optical chromatography to immunoassay // Anal. Chem. 1997. V. 69. P. 2711–2715.
 67. MacDonald M.P., Splading G.C. and Dholakia K. Microfluidic sorting in an optical lattice // Nature. 2003. V. 426. P. 421–424.
 68. Soo Hoo W., Wang M.M., Kohrumel J.R., Hall J. A novel methods for detection of virus-infected cells through moving optical gradient fields using adenovirus as a model system // Cytometry Part A. 2004. V. 58A, N 2. P. 140–146.
 69. Wang Mark M. et al. Marchand optical forces for noninvasive cellular analysis // Applied Optics. 1 oct. 2003. V. 42, N 28. P. 5765–5773.
 70. <http://www.genoptix.com>
 71. Wright W.H., Sonek G.J., Berns M.W. Parametric study of the forces on microspheres held by optical tweezers // Applied Optics. 1994. V. 33. P. 9–16.
 72. Durnin J., Miceli J.J., Eberly Jr. Diffraction-free beams // Phys. Rev. Lett. 13 April 1987. V. 58, N 15. P. 1499–1501.
 73. Indebetouw G. Nondiffracting optical fields: some remarks on their analysis and synthesis // J. Opt. Soc. Am. 1989. A 6. P. 150–152.
 74. <http://nauka.relis.ru/05/0306/05306028.htm>
 75. Sabino Chavez-Cerda et al. Experimental observation of interfering Bessel beams // Optics Express. December 21, 1998. V. 3, N 13. P. 524–529.
 76. Arlt J., Garcés-Chavez V., Sibbett W. and Dholakia K. Optical micro-manipulation using a Bessel light beam // Optics Communications. 2001. V. 197. P. 239–245.
 77. Garcés-Chávez V. et al. Optical levitation in a Bessel light beam // Appl. Phys. Lett. 2004. V. 85. P. 4001.
 78. Little H. et al. Optical guiding of microscopic particles in femtosecond and continuous wave Bessel light beams // Opt. Express. 2004. N 12. P. 2560.
 79. Moothoo D.N. et al. Beth's experiment using optical tweezers // American Journal of Physics. 2001. V. 69, N 3. P. 271–276.
 80. Франк-Каменецкий М.Д. Биофизика молекулы ДНК: одно из новых направлений // Молекулярная биология. 2002. Т. 36, № 2. С. 307–311.
 81. Янг Х.Д., Хоп Л.А., Дафлайен Дж.С. Осциллирующие оптические твизеры для исследования динамических сил в коллоидных суспензиях // Автометрия. 2000. № 5. С. 58–66.

82. *Ashkin A., Dziedzic J.-M., and Yamane T.* Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams // *Nature*. 1987. V. 330. P. 769–771.
83. *Paterson Lynn* Novel micromanipulation techniques in optical tweezers. A thesis submitted to the University of St. Andrews (Scotland) in application for the degree of Doctor of Philosophy. 2003. 259 p.
84. *Schutze K., Posl K., Lahr G.* Laser micromanipulation systems as universal tools in cellular and molecular biology and in medicine // *Cellular and Molecular Biology*. 1998. V. 44. P. 735–746.
85. *Zahn M., Seeger S.* Optical tweezers in pharmacology // *Cell. Mol. Biol.* 1998. V. 44. P. 747–761.
86. *Wright W.H., Sonek G.J., Tadir Y., Berns M.W.* Laser trapping in cell biology // *IEEE Journal of Quantum Electronics*. 1990. V. 26, N 12. P. 2148–2157.
87. http://www.defis.com.ua/pro3_ru.htm
88. *Котова С.П., Рахматулин М.А., Филькин В.В.* Оптические ловушки, образованные различными модами лазера // *Известия Самарского научного центра РАН: Лазерная техника и технология*. 2001. Т. 3, № 1. С. 48–54.
89. *Paterson L. et al.* Controlled rotation of optically trapped microscopic particles // *Science*. 2001. V. 292. P. 912–914.
90. *Paterson L. et al.* Controlled simultaneous rotation of multiple optically trapped particles // *J. Mod. Opt.* 2003. V. 50, N 10. P. 1591–1599.
91. *Galajda P., Ormos P.* Complex micromachines produced and driven by light // *Appl. Phys. Lett.* 2001. V. 78, N 2. P. 249–251.
92. *Korda P., Spalding G.C., Dufresne E.R., and Grier D.G.* Nanofabrication with holographic optical tweezers // *Rev. Sci. Instrum.* 2002. V. 73, N 4. P. 1956–1957.
93. *MacDonald M.P. et al.* Trapping and manipulation of low-index particles in a two-dimensional interferometric optical trap // *Optics Letters*. 2001. V. 26. P. 863–943.
94. *Prentice P. et al.* Manipulation and filtration of low index particles with holographic Laguerre-Gaussian optical trap arrays // *Opt. Express*. 2004. N 12. P. 593.
95. *Garcés-Chávez V. et al.* Simultaneous micromanipulation in multiple planes using a self-reconstructing light beam // *Nature*. 2002. V. 419. P. 145.
96. *Molloy J.E., Dholakia K. and Padgett M.J.* Optical tweezers in a new light // *J. Mod. Opt.* 2003. V. 50, N 10. P. 1501–1507.
97. *Dholakia K., Spalding G. and MacDonald M.* Optical tweezers: the next generation // *Physics World*. 2003 (October 2002). N 15. P. 31.
98. *Reichle C. et al.* Combined laser tweezers and dielectric field cage for the analysis of receptor-ligand interactions on single cells // *Electrophoresis*. 2001. V. 22. P. 272–276.
99. *Arai F. et al.* High-speed separation system of randomly suspended single living cells by laser trap and dielectrophoresis // *Electrophoresis*. 2001. V. 22. P. 283.
100. *Khandurina J., Guttman A.* Bioanalysis in microfluidic devices // *Journal of Chromatography, A*. 2002. V. 943. P. 159–183.

*Институт аналитического приборостроения РАН,
Санкт-Петербург*

Материал поступил в редакцию 12.01.2005.

PHYSICAL METHODS OF MICROPARTICLE TRANSPORT AND SEPARATION CONTROL IN LIQUID MEDIA. I. DIELECTROPHORESIS, PHOTOPHORESIS, OPTOPHORESIS, OPTICAL TWEEZERS

A. A. Evstrapov

Institute for Analytical Instrumentation RAS, Saint-Petersburg

The paper presents a comparative study of currently available techniques and methods of microparticle transport and separation control. Intense studies of biological objects have required new effective means for nondestructive action upon particles in liquids using external fields. The up-to date techniques applicable to microanalytical instruments and devices are considered.