

Układ do pasywnego podziału kropli na emulsje i znakowania emulsji oraz sposób pasywnego podziału kropli na emulsje i znakowania emulsji

Przedmiotem wynalazku jest układ do pasywnego podziału wielu kropli na emulsje monodispersyjnych kropli zawieszonych w fazie ciągłej i znakowania każdej wygenerowanej emulsji przez kolejność w sekwencji emulsji oddzielonych od siebie wzajemnie trzecią, niemieszającą się z pozostałymi fazami, fazą, a także sposób pasywnego podziału kropli na emulsje i znakowania emulsji oraz sposób pasywnego podziału kropli na emulsje i znakowania emulsji z wykorzystaniem tego układu.

Rozwiązania będące przedmiotem wynalazku, w połączeniu z modułami mikroprzepływowymi znanymi w stanie techniki – na przykład opisanymi w poprzednich zgłoszeniach wynalazków zespołu prof. Piotra Garsteckiego (opublikowane zgłoszenia polskie nr P-390250, P-390251, P-393619 oraz zgłoszenie międzynarodowe nr PCT/PL2011/050002) mogą służyć do przeprowadzania wysokoprzepustowych badań przesiewowych przeprowadzonych w kroplach o pikolitrowych (subnanolitrowych) objętościach, w których mogą znajdować się pojedyncze komórki lub pojedyncze molekuly. Reakcje na pojedynczych komórkach mają olbrzymi potencjał w diagnostyce i w badaniach nad heterogenicznymi populacjami jak np. tkanki nowotworowe czy środowiskowe próbki mikrobiologiczne. W ostatnich latach eksperymenty przeprowadzone na pojedynczych komórkach stają się podstawą badań w takich dziedzinach jak biologia systemowa, genomika czy metabolomika. Ponadto pikolitrowe krople uzyskane w naszych układach mogą służyć jako platforma do prowadzenia reakcji na pojedynczych cząsteczkach biologicznych takich jak enzymy czy sekwencje kwasów nukleinowych. Reakcje takie są podstawą prowadzenia ukierunkowanej ewolucji enzymów czy reakcji cyfrowego PCR (ang. Polymerase Chain Reaction) – np. US RE41,780E.

Metoda „Microfluidic Step Emulsification” (MSE) (np. T. Kawakatsu *et al.*, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1997, 74, 317–321.; S. Sugiura *et al.*, *Langmuir*, 2002, 18, 3854–3859) pozwala na otrzymywanie w układach mikroprzepływowych emulsji, charakteryzujących się wysokim stopniem monodispersyjności: podczas odrywania się kolejnych kropli do fazy rozproszonej emulsji w miejscu odrywania panują zbliżone warunki hydrodynamiczne, zatem otrzymane krople emulsji cechuje zbliżona do siebie nawzajem objętość. Jednym z potencjalnych zastosowań MSE jest możliwość wykorzystania opartych na MSE układów mikroprzepływowych w badaniach diagnostycznych, na przykład w badaniach opartych na cyfrowej reakcji amplifikacji kwasów nukleinowych, droplet digital

Polymerase Chain Reaction (ddPCR) (np. B. J. Hindson *et al.*, *Anal. Chem.*, 2011, 83, 8604–8610). Metoda MSE może zostać wykorzystana do tworzenia bibliotek kropeł, czyli emulsji złożonych z kilkuset, kilku tysięcy kropeł o jednakowym składzie chemicznym. Wykorzystanie wielu bibliotek kropeł o różniącym się stężeniu kwasów nukleinowych w badaniu opartym na ddPCR pozwala na zredukowanie całkowitej liczby kropeł użytych do badania bez zmniejszenia zakresu dynamicznego badania w porównaniu do ddPCR opartego na jednej emulsji otrzymanej z pojedynczej próbki (o jednym stężeniu kwasów nukleinowych) (P. R. Debski *et al.*, *Anal. Chem.*, 2015, 87, 8203–8209).

Do wygenerowania emulsji w układzie mikroprzepływowym przy użyciu MSE niezbędne są źródła ciśnienia, które wymuszają przepływ płynów w układzie. Powszechnie jest wykorzystywanie do tego dwóch źródeł przepływu np. pomp strzykawkowych. Jedna pompa w takim systemie doprowadza fazę rozproszoną do elementu geometrii przewężenia (zwanego dalej „emuzyfikatorem”) układu, który to element wymusza odrywanie się kropli dostarczanej fazy rozproszonej do emulsji. Druga pompa doprowadza fazę ciągłą do miejsca w układzie położonego bezpośrednio w dół strumienia przepływu od emuzyfikatora. Doprowadzana faza ciągła powoduje odepchnięcie powstających kropli emulsji od emuzyfikatora i gwarantuje zbliżone warunki fizyczne odrywania się każdej kropli, a przez to wysoki stopień monodispersyjności emulsji (np. N. Mittal *et al.*, *Phys. Fluids*, 2014, 26, 082109; K. van Dijke *et al.*, *Lab Chip*, 2009, 9, 2824-2830; E. Amstad *et al.*, *Lab Chip*, 2016, 16, 4163-4172).

Jeżeli faza ciągła nie jest dostarczana, krople emulsji odrywane przez emuzyfikator nie oddalają się od niego. Kolejne krople, które przechodzą przez emuzyfikator, stykają się podczas procesu odrywania do emulsji z uprzednio wygenerowanymi kroplami. Stykanie się generowanej w emuzyfikatorze kropli z poprzednio wygenerowanymi kroplami prowadzi do wysokiej polidispersyjności emulsji, a zatem do pogorszenia jakości emulsji.

Alternatywnie wobec pompy strzykawkowej jako źródła fazy ciągłej do odpychania generowanych kropli od emuzyfikatora stosuje się: grawitacyjne odpychanie kropli od emuzyfikatora oparte na różnicy gęstości między kroplami a fazą ciągłą (F. Dutka *et al.*, *Lab Chip*, 2016, 16, 2044–2049), odpychanie kropli oparte na różnicy gęstości w sztucznym polu grawitacyjnym wytworzonym w wirówce (F. Schuler *et al.*, *Lab Chip*, 2015, 15, 2759–2766), odciąganie przez magnes kropli emulsji tworzonej przez ferrofluid (ciecz magnetyczną) (S. Kahkeshani i D. Di Carlo, *Lab Chip*, 2016, 16, 2474–2480), samoczynną ucieczkę kropli opartą na preferencji kropli do pozostania w sferycznym kształcie w układach o zróżnicowanej wysokości kanałów (R. Dangla *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2013, 110, 853–858). Jeżeli układ mikroprzepływowy ma pozostać zorientowany w jednej płaszczyźnie, co jest pożądane ze względu na łatwość wytworzenia, obserwacji i użytkowania

takiego układu lub w przypadku małych różnic gęstości pomiędzy fazą kroplową a fazą ciągłą metody grawitacyjne są wykluczone. Ponadto, grawitacyjne usuwania kropeł z progu przebiega stosunkowo wolno, co z kolei ogranicza częstotliwość tworzenia kropeł w emulsyfikatorze. Metody oparte na ferrofluidach mają zastosowanie ograniczone tylko do cieczy o własnościach magnetycznych, zaś metoda oparta na samoczynnej ucieczce kropli z emulsyfikatora cechuje się niską częstotliwością generacji kropeł w odniesieniu do pozostałych metod odpychania kropli z emulsyfikatora. Zatem głównym sposobem odpychania kropli od emulsyfikatora w układzie zorientowanym w jednej płaszczyźnie jest wykorzystanie dwóch źródeł ciśnienia, co podnosi koszty metody oraz komplikuje projekt i zastosowanie układów mikroprzepływowych.

Wygenerowane przy użyciu MSE emulsje mogą być przechowywane w tym samym układzie mikroprzepływowym, w którym zostały wygenerowane, lub poza nim. Wygenerowanie wielu bibliotek kropeł (tj. szeregu emulsji różniących się składem chemicznym) w jednym układzie mikroprzepływowym przy zastosowaniu MSE nie zostało dotąd zaprezentowane. Geometrie emulsyfikatorów do MSE zakładają, że stosunkowo płytki i szeroki kanał dostarczający fazę rozproszoną znajduje ujście do głębszego kanału lub zbiornika zawierającego fazę ciągłą. Aby wiele kropli wygenerowanych w danym układzie mikroprzepływowym mogło zostać zamienionych w wiele emulsji w tym samym układzie zawierającym emulsyfikator oparty na MSE, płytki kanał doprowadzający musiałby być długi. Długi i płytki kanał generowałby znaczne opory przepływu oraz zwiększałby ryzyko zwilżania fazy rozproszonej (R. Dreyfus *et al.*, *Phys. Rev. Lett.*, 2003, 90, 144505) do ścianek kanału oraz samoistnego i przedwczesnego podziału kropeł na mniejsze podobjętości. Te niekorzystne zjawiska w dużej mierze utrudniałyby kontrolę nad kroplami.

Biblioteki kropeł (emulsje powstałe z kolejnych kropeł) zazwyczaj ulegają wymieszaniu ze sobą w szerokim kanale umiejscowionym za emulsyfikatorem. Aby odróżnić od siebie biblioteki kropeł o odmiennym składzie chemicznym wygenerowane przy użyciu MSE, należy każdą z tych bibliotek/emulsji oznakować. Możliwe jest wykorzystanie znaczników chemicznych, na przykład barwników fluorescencyjnych: jednego barwnika w różnych stężeniach w kolejnych bibliotekach kropeł lub kombinacji wielu barwników w kolejnych bibliotekach kropeł. Poza tym możliwe jest zastosowanie na przykład cząsteczek kwasów nukleinowych o zróżnicowanej sekwencji zasad azotowych jako znaczników kolejnych bibliotek kropeł. Biblioteki kropeł można także indeksować przestrzennie, to jest odizolować je od siebie na przykład w probówkach lub płytkach wielodołkowych zanim wymieszają się ze sobą. Ponadto izolacja przestrzenna bibliotek pozwala na zahamowanie niepożądanego dyfuzji reagentów (zwłaszcza substancji hydrofobowych) między poszczególnymi kroplami emulsji. Izolowanie od siebie bibliotek kropeł w probówkach czy płytkach wielodołkowych wymaga nakierowania każdej kolejnej emulsji do swojego desygnowanego naczynia.

Operacja ta może być przeprowadzana za pomocą przewodu przemieszczanego manualnie lub za pomocą sterowanego komputerowo robota-podajnika, co związane jest z niekorzystnym wydłużeniem czasu trwania eksperymentu oraz z dodatkowym kosztem zakupu systemu zautomatyzowanego.

Celem wynalazku jest zaproponowanie sposobu, który pozwoliłby na wygenerowanie wielu emulsji monodispersyjnych kropli w układzie zorientowanym w jednej płaszczyźnie (może ona być dowolna), co ułatwia produkcję układu. Ponadto bez użycia dodatkowego źródła ciśnienia możliwe jest odpychanie kropli emulsji od emulsyfikatora, a następnie izolacja przestrzenna poszczególnych emulsji bez konieczności użycia probówek lub płytek wielodołkowych. Celem wynalazku jest także zaproponowanie układu skonfigurowanego i przeznaczonego do realizacji takiego sposobu.

Zgodnie z wynalazkiem układ do pasywnego podziału kropli na emulsje obejmuje:

- kanał główny, umożliwiający przepływ cieczy od wlotu do wylotu kanału głównego, to jest w kierunku przepływu, przy czym w kanale głównym znajduje się przewężenie, to jest fragment kanału głównego, na którym pole przekroju poprzecznego tego kanału jest znacznie mniejsze niż w obydwu odcinkach kanału głównego bezpośrednio sąsiadujących z tym fragmentem przed i za nim, patrząc w kierunku przepływu, szerokość i wysokość kanału głównego kwadratowego w przekroju poprzecznym wynosi od 1 μm do 5000 μm , korzystnie od 100 do 600 μm , szerokość przewężenia jest równa szerokości kanału głównego, głębokość przewężenia wynosi pomiędzy 0,1 % a 25 % szerokości kanału, korzystnie 5 % do 10 % szerokości kanału,
- trójdzielne złącze mikroprzepływowe umiejscowione za przewężeniem, patrząc w kierunku przepływu oraz
- przewód wyprowadzający, do odprowadzania cieczy z trójdzielnego złącza przepływowego,

i charakteryzuje się tym, że kanał główny obejmuje pochylnię, to jest prowadzący do przewężenia odcinek o stale zmniejszającym się co najmniej jednym wymiarze poprzecznym, to jest wymiarze mierzonym w kierunku prostopadłym do kierunku przepływu.

Korzystnie, układ dodatkowo posiada co najmniej jeden kanał przetokowy, biegnący wzdłuż pochylni, z wlotem z kanału głównego do kanału przetokowego umiejscowionym tuż przed pochylnią i wylotem z kanału przetokowego do kanału głównego znajdującym się tuż za przewężeniem, patrząc w kierunku przepływu, przy czym wlot z kanału głównego do kanału przetokowego ma pole przekroju

poprzecznego mniejsze niż pole przekroju poprzecznego kanału głównego, a korzystniej posiada dwa lub więcej takich kanałów przetokowych.

Korzystnie, układ posiada dwa kanały przetokowe, przebiegające symetrycznie po przeciwnych stronach kanału głównego, korzystnie równoległe do kanału głównego.

Korzystnie, długość kanałów przetokowych wynosi od 100 % do 4000 % szerokości kanału głównego, a korzystniej 2000 % szerokości kanału głównego, szerokość kanałów przetokowych wynosi od 1 μm do 3000 μm , a korzystnie 200 μm do 300 μm , głębokość kanałów przetokowych wynosi od 10 % do 100 % szerokości kanałów przetokowych, a korzystnie ok. 30 % szerokości kanałów przetokowych, głębokość wlotów do kanałów przetokowych wynosi 50 % do 150 % głębokości kanałów przetokowych, korzystnie ok. 75 % głębokości kanałów przetokowych.

Korzystnie, przekrój poprzeczny kanałów przetokowych jest prostokątny.

Korzystnie, kanał główny posiada prostokątny przekrój poprzeczny, płaskie ściany boczne, płaskie dno i płaską powierzchnię ograniczającą kanał główny od góry, a pochylnia stanowi odcinek kanału głównego o stale zmniejszającej się wysokości, to jest wymiarze mierzonym w kierunku prostopadłym do płaszczyzny, w której zorientowane są kanały.

Korzystnie, kąt nachylenia powierzchni ograniczającej kanał główny od góry względem płaskiego dna, wynosi od 0,25 do 45 stopni, korzystnie od 1 do 10 stopni, najkorzystniej około 2,5 stopnia.

Korzystnie, kanał główny i ewentualnie kanały przetokowe są zorientowane w jednej płaszczyźnie.

Korzystnie, układ posiada wlot dla fazy ciągłej do kanału głównego oraz wlot dla fazy rozproszonej do kanału głównego oraz że obydwa te wloty skierowane są prostopadle do płaszczyzny, w której zorientowany jest kanał główny i ewentualnie kanały przetokowe.

Korzystnie, układ jest wykonany z materiału wybranego z grupy obejmującej: elastomer poli(dimetylosiloksan), poliwęglan, poli(metakrylan metylu), teflon, cykliczny kopolimer olefinowy (COC cyclic olefin copolymer), szkło, krzem.

Wynalazek obejmuje także sposób pasywnego podziału kropli na emulsje, realizowany w układzie według wynalazku, charakteryzujący się tym, że obejmuje następujące kroki:

- a) doprowadzenie kanałem głównym kropli-matki, korzystnie z wody, zawieszonej w fazie ciągłej, korzystnie w oleju fluorowanym, do przewężenia;
- b) przejście kropli-matki przez przewężenie z podziałem kropli-matki na emulsję;
- c) odprowadzenie emulsji od przewężenia i doprowadzenie jej do jednej gałęzi trójdzielonego złącza mikroprzepływowego;

- d) doprowadzenie trzeciej fazy, niemieszającej się z fazą ciągłą, korzystnie oleju mineralnego lub skwalanu, do drugiej gałęzi tego trójdzielnego złącza mikroprzepływowego;
- e) skierowanie emulsji w trójdzielnym złączu mikroprzepływowym do przewodu wyprowadzającego i wtłoczenie do tego kanału poprzez trójdzielne złącze mikroprzepływowe trzeciej fazy, bezpośrednio za emulsją.

Korzystnie, sposób jest realizowany w układzie zorientowanym w jednej płaszczyźnie.

Korzystnie, jako trzecią fazę stosuje się odmienne ciecze dla różnych emulsji.

Poniżej zwięźle wyjaśniono mechanizm działania układu według wynalazku. Zgodnie z wynalazkiem, sposób prowadzi się korzystnie w układzie mikroprzepływowym, który posiada:

- przewężenie w kanale mikroprzepływowym, do którego to przewężenia prowadzi fragment kanału o stale zmniejszającej się wysokości (pochylnia), która pozwala na zastosowanie przed emulsyfikatorem kanału o przekroju znacznie większym niż przekrój przewężenia. Co za tym idzie, przy zastosowaniu przewężenia w głębokim i szerokim kanale, można w nim umieścić wiele kropeł, z których w emulsyfikatorze wygenerowane zostaną emulsje. Ze względu na znaczny w stosunku do przewężenia rozmiar kanału, kanał przed przewężeniem nie będzie stawiał znaczących oporów przepływu. W głębokim i szerokim kanale operacje na kroplach, z których mają zostać wygenerowane emulsje (dalej „kroplach-matkach”), takie jak mieszanie oraz transport wzdłuż kanału, będą efektywniejsze niż w płytkim i długim kanale. Pochylnia ułatwia kropli-matce przejście w całej objętości przez przewężenie (emulsyfikator) i zapobiega pozostawianiu kropli przed przewężeniem.

- dwa kanały przetokowe, biegnące wzdłuż pochylni, z wlotami umiejscowionymi tuż przed (w odniesieniu do kierunku przepływu) pochylnią i wylotami znajdującymi się tuż za emulsyfikatorem. Kropla-matka nie wpływa do kanałów przetokowych ze względu na duży opór przepływu kropli w wąskich kanałach przetokowych – przepływ kropli przez taki kanał wiązałby się ze znaczącym i energetycznie niekorzystnym rozciągnięciem powierzchni międzyfazowej woda/olej. Natomiast faza ciągła wpływa do wąskich kanałów przetokowych w czasie, kiedy główny kanał (pochylnia) emulsyfikatora jest zablokowany przez dzielącą się kroplę-matkę. Gdy kropla matka przechodzi przez emulsyfikator, odrywane są od niej krople emulsji. Faza ciągła, która przepływa przez kanały przetokowe, odpycha każdą nowopowstającą kroplę emulsji od emulsyfikatora. Powoduje to, że nie jest potrzebne dodatkowe źródło ciśnienia (na przykład pompa strzykawkowa) dedykowana do odpychania kropeł emulsji od emulsyfikatora. Dzięki odpychaniu kropeł, proces emulsyfikacji jest

niezaburzony przez niekorzystne kolizje między kroplami i możliwe jest uzyskanie wysoce monodispersyjnych emulsji.

- trójdzielne złącze mikroprzepływowe umiejscowione za emulsyfikatorem. Z drugiej gałęzi złącza doprowadzana jest trzecia faza (np. olej mineralny), który nie miesza się z fazą ciągłą (np. olej perfluorowany), w którym zawieszona jest emulsja (np. roztwór wodny). Po tym, jak emulsja przejdzie przez złącze, do złącza wprowadza się porcję trzeciej fazy z drugiej gałęzi złącza, co powoduje odizolowanie danej biblioteki kropeł od pozostałych bibliotek kropeł generowanych w emulsyfikatorze.

- przewód, którego ścianki zwilża trzecia faza (np. olej mineralny), która oddziela od siebie poszczególne biblioteki kropeł, zapewniając w ten sposób szczelność izolacji. Do przewodu kierowane są wygenerowane i odizolowane od siebie monodispersyjne biblioteki kropeł.

W innej korzystnej wersji wynalazku izoluje się emulsje wygenerowane na emulsyfikatorze wyposażonym w pochylnię i niewyposażonym w kanały przetokowe. W tej wersji wynalazku natychmiast w dół strumienia za emulsyfikatorem znajduje się złącze trójdzielne. Z drugiej gałęzi złącza dostarczana jest trzecia faza niemieszająca się z fazą ciągłą, w której zawieszona jest emulsja. Trzecia gałąź złącza jest zorientowana pionowo i prowadzi do przewodu, którego ścianki zwilża trzecia faza, w której nie są zawieszane emulsje. Taki system pozwala na mniejsze zużycie fazy, w której zawieszona jest emulsja w porównaniu do opisanej tu metody wykorzystującej kanały przetokowe, kosztem stopnia monodispersyjności emulsji.

Korzystny przykład wykonania wynalazku

Wynalazek zostanie teraz bliżej przedstawiony w korzystnym przykładzie wykonania, z odniesieniem do załączonych rysunków, na których:

Fig. 1 przedstawia schemat emulsyfikatora z pochylnią w przekroju podłużnym widzianym z boku wraz z ilustracją emulsyfikacji kropli-matki i zaznaczeniem kierunku przepływu. Na schemacie na pochylnię 101 wpływa z kanału 103 zgodnie z kierunkiem wskazywanym przez strzałkę kropla-matka 102, która podlega emulsyfikacji w przewężeniu emulsyfikatora 104 i zostaje podzielona na mniejsze krople 105, tworzące bibliotekę kropeł w dalszej części kanału 106;

fig. 2 przedstawia wykonaną z góry fotografię emulsyfikatora 201 z pochylnią 202 i kanałami przetokowymi 203, 204;

fig. 3 przedstawia schemat widzianego z góry układu mikroprzepływowego stosowanego w sposobie według wynalazku, na schemacie zaznaczono krople-matki 301, generowane biblioteki kropeł 302, i biblioteki kropeł odizolowane od siebie nawzajem 303 w przewodzie wyprowadzającym 304;

fig. 4 przedstawia powstającą emulsję kropli 401 odpychanych od emulsyfikatora 402 przez fazę ciągłą doprowadzaną przez wyloty (403, 404) kanałów przetokowych (203, 204, 312, 313);

fig. 5 przedstawia średnice kolejnych kropli w powstającej emulsji w zależności od zadanej prędkości przepływu fazy ciągłej doprowadzającej kroplę-matkę do emulsyfikatora dla wysokości przewężenia w emulsyfikatorze równej 70 μm ;

fig. 6 przedstawia monodispersyjność biblioteki kropeł (mierzoną jako współczynnik zmienności średnicy kropeł w wygenerowanej emulsji) w zależności od prędkości przepływu fazy ciągłej doprowadzającej kroplę-matkę do emulsyfikatora dla wysokości przewężenia w emulsyfikatorze równej 70 μm i w zależności od stężenia fluorosurfaktantu PFPE-PEG-PFPE w fazie ciągłej;

fig. 7 przedstawia histogram częstości występowania danych objętości kropli w ośmiu emulsjach wygenerowanych kolejno przy użyciu emulsyfikatora wyposażonego w pochylnię i kanały przetokowe dla wysokości przewężenia w emulsyfikatorze równej 30 μm ;

fig. 8 przedstawia fotografię przewodu polimerowego 801, wewnątrz którego widoczne są dwie emulsje kropli wodnych w oleju perfluorowanym 802, 803, które to emulsje oddzielone są od siebie trzecią fazą 804 (tu: olejem mineralnym), która nie miesza się z fazą ciągłą (tu: olejem perfluorowanym), w której zawieszono są emulsje i która (olej mineralny) zwilża ścianki przewodu polimerowego.

Schemat układu

Przeprowadzono testowanie wielu wersji geometrii układu, różniące się m. in. kątem nachylenia pochylni do płaszczyzny kanału, przekrojem kanałów przetokowych, długością kanałów przetokowych. Wybrano najbardziej optymalną geometrię układu. Na fig. 3 przedstawiono schemat układu mikroprzepływowego, na którym zaznaczone są:

305 – złącze trójdzielne typu T, w którym formowane są krople-matki 301 objętości ok. 400 nl w następujący sposób: z jednej gałęzi 306 złącza dostarczana jest faza ciągłą, natomiast z drugiej

gałęzi 307 złącza dostarczana jest faza rozproszona. Płyny dostarczane są przez wloty 308, 309 skierowane prostopadle do płaszczyzny, w której zorientowane są pozostałe kanały układu. Płyny dostarczane są ze stałymi prędkościami przepływu przy użyciu pomp strzykawkowych. Na złączu następuje oderwanie kropli-matki od całości fazy rozproszonej;

310 – pochylnia prowadząca krople-matki do emulsyfikatora 311. Pochylnia przedstawiona w korzystnym przykładzie wykonania była nachylona względem płaszczyzny układu pod kątem 2,5 stopnia, co niwelowało opory przepływu kropli-matki przez przewężenie emulsyfikatora;

312, 313 – kanały przetokowe doprowadzające fazę ciągłą do emulsyfikatora i odpychające od niego krople powstającej emulsji;

314, 315 – wloty do kanałów przetokowych;

311 – przewężenie emulsyfikatora i powstająca w nim biblioteka kropeł (302) ok. 400 kropli o objętości ok. 1 nl każda;

316 – złącze trójdzielne typu T, z którego gałęzi 317 dostarczana jest faza trzecia niemieszająca się z fazą ciągłą, w której to fazie ciągłej zawieszono emulsje, i oddzielająca od siebie nawzajem jako separator (318) kolejne formowane emulsje (303). Wylot z układu, oznaczony jako 319, prowadzący do przewodu wyprowadzającego (304, pogrubienie), którego ścianki zwilżane są przez fazę trzecią dostarczaną z gałęzi 317, skierowany jest prostopadle do płaszczyzny, w której zorientowane są pozostałe kanały układu;

W korzystnym przykładzie szerokość i wysokość głównego kanału wynosi 400 μm (w przekroju poprzecznym mają kształt kwadratowy). Kanały przetokowe oznaczone jako 312 i 313 mają wysokość 40 μm i szerokość 220 μm . Wloty do kanałów przetokowych oznaczone jako 314 i 315 mają szerokość 170 μm i wysokość 50 μm . Płytkie w stosunku do głównego kanału wloty do kanałów przetokowych uniemożliwiają kropli-matce wpłynięcie do kanału przetokowego i zmuszają ją do wpłynięcia na pochylnię prowadzącą do przewężenia emulsyfikatora.

Tworzenie emulsji i pomiar średnicy i objętości kropeł generowanych emulsji

Krople generowanej emulsji odrywane są od kropli-matki przy zbliżonych warunkach hydrodynamicznych dzięki wykorzystaniu kanałów przetokowych. Emulsja z tylnej części kropli-matki powstaje przy nieco innych warunkach fizycznych, między innymi ponieważ tylna część kropli matki jest na tyle mała, że zmienia się proporcja fazy ciągłej do fazy rozproszonej w przewężeniu

emulsyfikatora. Zatem krople emulsji otrzymanej z tylnej części kropli matki są wyraźnie większe lub mniejsze od pozostałych kropeł emulsji. Zwiększenie prędkości przepływu o 300% od 3 ml/h do 12 ml/h spowodowało średni wzrost średnicy kropli w emulsji o ok. 5%.

Monodispersyjność generowanych emulsji

Kropla-matka, wpływając na pochylnię, prowadzącą do przewężenia, napotyka coraz większy opór. Opór ten jest związany z panującym wewnątrz kropli-matki ciśnieniem Laplace'a, którego wartość zależy między innymi od promienia krzywizny kropli i napięcia powierzchniowego. Zwiększenie stężenia surfaktantu w fazie olejowej doprowadza do zmniejszenia napięcia powierzchniowego, a zatem do zmniejszenia ciśnienia Laplace'a w kropli-matce. Niższe ciśnienie Laplace'a oznacza mniejszy opór, który napotyka kropla-matka na pochylni, a zatem większą prędkość kropli-matki w przewężeniu emulsyfikatora. Wyższe stężenie surfaktantu powoduje pogorszenie monodispersyjności kropeł w emulsji, co jest przedstawione na fig. 6.

Monodispersyjność generowanych kolejno po sobie emulsji

Kolejno generowane w trójdzielny złączu T krople-matki są oddzielone od siebie nawzajem na tyle, by kropla-matka wpłynęła na pochylnię dopiero po tym, jak poprzednia kropla-matka zostanie całkowicie podzielona na emulsję. Dzięki temu każda emulsja powstaje w zbliżonych warunkach hydrodynamicznych, co zapewnia zbliżoną objętość kropeł w każdej kolejno generowanej emulsji. Wysoka monodispersyjność kropeł kolejnych emulsji jest przedstawiona na fig. 7, do którego w korzystnym przykładzie wykonania wynalazku wykorzystano przepływ z kanału 306 równy 0,9 ml/h, z kanału 307 równy 0,03 ml/h, stężenie surfaktantu w fazie ciągłej wynosiło 0,1 % wagowych, a wysokość przewężenia emulsyfikatora to 30 μm . Otrzymano emulsje składające się z 392 ± 9 kropli o przeciętnej średnicy 120 μm (około 900 pl). Całkowity współczynnik zmienności średnic kropeł dla ośmiu wygenerowanych emulsji składających się łącznie z 3134 kropeł wynosił około 4%. Około 5% kropli miało średnicę poniżej 115 μm (około 800 pl), te krople zawsze powstawały z tylnej części kropli-matki, czyli w innych warunkach hydrodynamicznych niż reszta emulsji. Nie wliczając tych kropli powstałych z tylnej części kropeł-matek, współczynnik zmienności średnic kropeł generowanych emulsji wynosił mniej niż 1%.

Izolacja poszczególnych bibliotek kropeł

Emulsje generowane w emulsyfikatorze są kierowane do trójdzielnego złącza, z którego jednej gałęzi dostarczana jest trzecia faza niemieszająca się z fazą ciągłą, w której to fazie ciągłej zawieszona jest emulsja, aby służyła jako separator emulsji, zgodnie ze schematem widocznym na fig. 8. Trzecia faza tworząca separator jest wtłaczana do złącza za każdym razem, gdy zemulsyfikowana zostanie kropla-matka. W korzystnym przykładzie wykonania wynalazku zastosowany został emulsyfikator bez kanałów przetokowych, co pozwoliło na znaczne ograniczenie zużycia fazy ciągłej, w której zawieszona została emulsja. Na fig. 9 widoczne są dwie emulsje kropeł zawieszonych w oleju perfluorowanym, oddzielonych od siebie nawzajem olejem mineralnym. Olej mineralny tworzący separator zwilża ścianki przewodu, w którym umieszczone są widoczne na fig. 9 emulsje.

Dyskusja

Dzięki sposobowi według wynalazku można było zastosować układ mikroprzepływowy do produkcji wielu emulsji – bibliotek kropeł o wysokim stopniu monodispersji, zarówno w odniesieniu do pojedynczej emulsji, jak i pomiędzy bibliotekami. Możliwe również jest odizolowanie od siebie i oznaczenie poszczególnych emulsji-bibliotek kropeł przez ich kolejność w sekwencji w przewodzie emulsji. Do tej pory generowanie emulsji z wielu postępujących po sobie kropeł w układach mikroprzepływowych opartych na MSE było utrudnione ze względu na konieczność użycia długich i płytkich kanałów, które generowały duże opory przepływu i utrudniały mieszanie wewnątrz kropeł. Zastosowanie pochylnej miejscowo spływającej kanał mikroprzepływowy rozwiązuje ten problem. Do tej pory wykorzystanie MSE do produkcji emulsji w układach horyzontalnych wiązało się z koniecznością użycia dodatkowego źródła ciśnienia lub wykorzystania ferrofluidów i magnesu do odpychania lub odciągania kropli powstających emulsji od emulsyfikatora. Zastosowanie kanałów przetokowych biegnących wzdłuż pochylnej pozwoliło na otrzymywanie wysoce monodispersyjnych emulsji bez konieczności użycia dedykowanych do usuwania kropeł z emulsyfikatora źródeł ciśnienia lub wykorzystania ferrofluidów i magnesu. Do tej pory przestrzenna izolacja emulsji wymagała manualnego umiejscowienia każdej emulsji w osobnej probówce lub dołku w płytce wielodołkowej. Wykorzystanie trzeciej fazy niemieszającej się z fazą ciągłą, w której zawieszona jest emulsja i doprowadzenie tej trzeciej fazy pomiędzy kolejne biblioteki kropeł po ich wygenerowaniu umożliwia oznakowanie kolejnych bibliotek kropeł przez znajomość ich sekwencji w przewodzie opuszczającym układ mikroprzepływowy.

Właściwości układu

Układ został wykonany z elastomeru poli(dimetylosiloksanu) Sylgard 184 (Dow Corning, USA) połączonego z płytką szklaną o grubości 1 mm przy użyciu plazmy (Harrick Plasma, USA). Powierzchnia kanałów została zmodyfikowana przy użyciu płynu Novec 1720 (3M, USA). Płyny do układu wtłaczano przy użyciu pomp strzykawkowych Nemesys (Cetoni, Niemcy). Do generacji emulsji użyto kropli wody jako fazy rozproszonej i oleju Novec HFE 7500 (3M, USA) jako fazy ciągłej. W fazie ciągłej rozpuszczony był surfaktant otrzymany według metody opisanej przez Holze *et al.* (*Lab Chip*, 2008, 8, 1632-1639). Jako separatora emulsji użyto oleju mineralnego (Sigma, Niemcy) lub w innym korzystnym przykładzie skwalanu (Sigma, Niemcy). Do przechowania izolowanych od siebie emulsji użyto przewodu z polietylenu (Becton Dickinson, USA).

Pomiar rozmiaru kropli generowanych emulsji

Proces tworzenia kropli był nagrywany przy użyciu szybkiej kamery (Photron, Japonia). Następnie, przy pomocy oprogramowania do analizy obrazu mierzona była powierzchnia przekroju kropli przechodząca przez środek kropli. Z tej powierzchni obliczano następnie średnicę kropli i jej objętość.