

Univerza v Ljubljani  
Fakulteta za elektrotehniko

Jaka Čemažar

# Dielektroforetsko ločevanje bioloških celic v mikropretočni komori

DOKTORSKA DISERTACIJA

mentor: izr. prof. dr. Tadej Kotnik

Ljubljana, 2013



---

## ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorju izr. prof. dr. Tadeju Kotniku za strokovne nasvete, vodenje, kritiko in pomoč pri nastajanju doktorske disertacije.

Najlepša hvala prof. dr. Damijanu Miklavčiču, ki mi je omogočil delo v prijetem in urejenem okolju ter za spodbudne besede in razumevanje.

Za izdelavo elektrod se zahvaljujem sodelavcem Laboratorija za mikrosenzorske strukture, še posebej prof. dr. Slavku Amonu in viš. znan. sod. dr. Danilu Vrtačniku.

Hvala sodelavcem Laboratorija za Biokibernetiko za koristne nasvete, prijetno družbo in zanimive pogovore.

Rad bi se zahvalil svojim staršem in družini. Brez njihove podpore in razumevanja mi ne bi uspelo.

Posebej se zahvaljujem svoji ženi Bojani za grafično oblikovanje te disertacije in za vso ljubezen in podporo.



---

# KAZALO

<b>Seznam okrajšav in simbolov .....</b>	<b>V</b>
<b>Povzetek.....</b>	<b>IX</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>XI</b>
<b>1. Uvod.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Pregled metod ločevanja celic.....</b>	<b>3</b>
1.1.1. Mehansko in hidrodinamično ločevanje celic.....	3
1.1.2. Optično ločevanje .....	4
1.1.3. Magnetno ločevanje.....	7
1.1.4. Ultrazvočno ločevanje .....	10
1.1.5. Električne metode ločevanja .....	13
1.1.6. Ostale sile na celico v suspenziji.....	15
<b>1.2. Dielektroforeza .....</b>	<b>18</b>
1.2.1. Model inducirane dipola.....	18
1.2.2. Manipulacija in ločevanje celic z dielektroforezo .....	25
<b>1.3. Elektroporacija in elektropermeabilizacija .....</b>	<b>38</b>
1.3.1. Transmembranska napetost .....	38
1.3.2. Mehanizmi elektroporacije .....	40
1.3.3. Vpliv dejavnikov na elektroporacijo .....	42
1.3.4. Področja uporabe elektroporacije .....	42
1.3.5. Elektroporacija celic v mikrokomorah.....	44
<b>1.4. Kombinacija dielektroforeze in elektroporacije .....</b>	<b>44</b>
<b>2. Metode .....</b>	<b>49</b>
<b>2.1. Teoretični izračuni, numerično modeliranje in načrtovanje komore .....</b>	<b>49</b>
<b>2.2. Izdelava komore za DEP-FFF .....</b>	<b>51</b>
<b>2.3. Poskusi na celicah .....</b>	<b>52</b>

---

<b>3. Rezultati in razprava .....</b>	<b>55</b>
<b>3.1. Izdelava komore za DEP-FFF in preizkus delovanja.....</b>	<b>55</b>
3.1.1. Članek I.....	57
3.1.2. Ločevanje mrtvih in živih celic pri različnih parametrih.....	65
<b>3.2. Ločevanje neporiranih, reverzibilno in ireverzibilno elektroporiranih celic..</b>	<b>67</b>
3.2.1. Članek II.....	69
3.2.2. Ločevanje elektroporiranih celic CHO pri različnih pogojih .....	77
3.2.3. Ločevanje elektroporiranih celic B16F1 pri različnih parametrih.....	81
<b>4. Zaključek .....</b>	<b>85</b>
<b>Izvirna prispevka k znanosti.....</b>	<b>87</b>
<b>Viri.....</b>	<b>88</b>
<b>Spletni viri .....</b>	<b>100</b>
<b>Izjava .....</b>	<b>101</b>

## SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV

oznaka	opis
FACS	Fluorescence-activated cell sorting – pretočna citometrija
DEP	dielektroforeza
DEP-FFF	dielektroforetsko ločevanje v mikropretočni komori
OT	optične pincete
OET	optoelektrične pincete
twDEP	dielektroforeza potujočega vala
ITO	iridij-kositrov oksid
PDMS	polidimetilsiloksan
MEMS	mikroelektromehanski sistem
PBS	fosfatni pufer
iDEP	izolatorska dielektroforeza
3-D	tridimenzionalni
$F$	sila:
$F_{OPT}$	optična
$F_M$	magnetna
$F_{UZ}$	ultrazvočna
$F_{EP}$	elektroforetska
$F_{DEP}$	dielektroforetska
$F_{SED}$	sedimentacijska
$F_{ST}$	pretoka tekočine
$F_G$	gravitacijska
$F_V$	vzgonska
$F_{HL}$	hidrodinamična dvižna
$F_{ZUN}$	zunanja
$F_{PC}$	tvorjenja verig
$P_l$	moč laserja
$n_l$	refrakcijski indeks
$Q_{opt}$	faktor učinkovitosti
$V$	prostornina (telesa, celice)
$\chi$	susceptibilnost
$B$	gostota magnetnega pretoka
$p_{uz}$	akustični tlak
$\beta$	stisljivost
$\lambda$	valovna dolžina

$\rho$	gostota
$x_v$	razdaja do vozlišča
$\sigma_s$	površinska gostota naboja
$E$	električno polje
$s$	dolžina stranice kocke
$R$	polmer (telesa, celice)
$g$	gravitacijski pospešek
$u$	hitrost pretoka
$u_0$	povprečna hitrost pretoka
$p$	tlak
$\mu$	dinamična viskoznost
$N_{Re}$	Reynoldsovo število
$X$	dolžina kanala
$Y$	širina kanala
$Z$	višina kanala
$x$	koordinata (horizontalna smer, smer gibanja tekočine)
$y$	koordinata (horizontalna smer)
$z$	koordinata (vertikalna smer)
$\Phi$	prostorninski pretok
$u_c$	hitrost celice, telesa
$m_c$	masa celice, telesa
$I$	enotska matrika
$\Omega_c$	kotna hitrost celice, telesa
$k_\mu$	koeficient upora
$k_g$	hidrodinamična geometrijska funkcija
$Q$	naboj
$d_t$	razdalja med delcema
$f$	frekvenca
$f_m$	mejna frekvenca
$\varepsilon$	dielektričnost
$\varepsilon'$	kompleksna dielektričnost
$\sigma$	prevodnost
$\omega$	krožna frekvenca (električnega polja)
$r, \theta, \varphi$	koordinate krogelnega koordinatnega sistema
$f_{CM}$	Clausius-Mossottijev faktor
$m_{dip}$	dipolni moment
$\varepsilon'_{ef}$	nadomestna kompleksna dielektričnost
$t$	čas
$D_m$	debelina membrane celice
$T_{ROT}$	elektrotoracijski navor
$C_{PC}$	konstanta tvorjenja verig
$T$	temperatura



$U$	napetost
$U_{TM}$	transmembranska napetost
$S_p$	površina elektroporiranega dela membrane
$c_0 \approx 3 \cdot 10^9 \text{ ms}^{-1}$	hitrost svetlobe v vakuumu
$\mu_0 = 4\pi \cdot 10^{-7} \text{ VsA}^{-1}\text{m}^{-1}$	indukcijska konstanta
$\epsilon_0 \approx 8.85 \cdot 10^{-12} \text{ AsV}^{-1}\text{m}^{-1}$	dielektričnost vakuuma
$R_G \approx 8.315 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$	plinska konstanta
$C_F \approx 9.649 \cdot 10^4 \text{ As mol}^{-1}$	Faradayeva konstanta
$\square_c$ (indeks)	celica
$\square_e$ (indeks)	okolica, medij
$\square_i$ (indeks)	notranjost celice
$\square_m$ (indeks)	celična membrana
$j$	imaginarna enota $j^2 = -1$
$\nabla$	nabla operator (gradient)



---

## POVZETEK

Za ločevanje celic se najpogosteje uporablja pretočni citometer, ki celice ločuje na podlagi optičnih lastnosti. Same celice se po teh lastnostih zelo malo razlikujejo, zato se uporabljajo fluorescentni markerji, ki se selektivno vežejo na celice. Takšne naprave so velike, zapletene in zelo drage, zato obstaja znaten interes za metode detekcije in ločevanja celic, ki bi bile uporabne kljub manjši in preprostejši zasnovi ter nižji ceni. Dielektroforetsko ločevanje celic je ena izmed perspektivnih metod, ločevanje pa poteka na podlagi njihovih električnih in geometrijskih lastnosti. Dielektroforeza je definirana kot gibanje polarizabilnih teles v nehomogenem izmeničnem električnem polju, uporablja pa se za selektivno manipulacijo in ločevanje različnih makromolekul (DNA, proteini), virusov in celic. Biološka celica je polarizabilna, saj je sestavljena iz prevodne citoplazme, obdaja pa jo neprevodna membrana. Pod vplivom električnega polja se naboji znotraj celice prerazporedijo in le-ta navzven deluje kot električni dipol, na katerega v nehomogenem električnem polju deluje dielektroforetska sila. Celice je mogoče ločevati z dielektroforezo, če pripadajo dvema skupinama, ki se dovolj razlikujeta v geometriji ali električnih lastnostih, predvsem električni prevodnosti in dielektričnosti.

Pri elektroporaciji se zaradi izpostavitve celice močnemu električnemu polju tvorijo pore v celični membrani, kar omogoči prehajanje molekul skozi sicer neprepustno membrano. Glede na jakost in trajanje električnega polja je lahko elektroporacija reverzibilna ali ireverzibilna. Pri reverzibilni poraciji se pore zapro in celica živi naprej, pri ireverzibilni poraciji pa so poškodbe celične membrane tako velike, da celica odmre. Elektroporacija se uporablja za vnos molekul v celico, zlivanje celic in lizo celic. Pri elektroporaciji nastanejo pore v celični membrani, zato se poviša električna prevodnost membrane in s tem izmenjava molekul med celico in okolico. Dielektroforetska sila je odvisna od prevodnosti celice, zato se načeloma sila na neporirano celico razlikuje od sile na porirano celico.

V doktorski disertaciji je opisan razvoj in uporaba mikropretočne komore za dielektroforetsko ločevanje neporiranih, reverzibilno elektroporiranih in ireverzibilno elektroporiranih celic. Uporabili smo princip ločevanja v tankoplastnem pretoku, kjer celice v suspenziji potujejo skozi plitev dolg kanal, ki ima paraboličen vertikalni profil hitrosti pretoka. Na dnu kanala so elektrode trakaste oblike, ki ustvarjajo nehomogeno električno polje predvsem v vertikalni smeri. Celice so bolj goste od medija, zato jih gravitacija vleče proti dnu komore, dielektroforetska sila pa je usmerjena navzgor in njena jakost pada z oddaljenostjo od elektrod. Celice na določeni višini zavzamejo svojo ravnotežno lego, zaradi paraboličnega profila hitrosti jih pretok nosi različno hitro, zato celice, katerih ravnotežne višine so bližje vertikalni sredini kanala, prispejo na izhod prej kot celice z ravnotežno višino bližje dnu ali vrhu kanala.

Pri razvoju komore za dielektroforetsko ločevanje celic smo z numeričnimi izračuni optimirali dimenzije elektrod in kanala in s teoretičnimi izračuni dielektroforetskega odziva določili začetne vrednosti jakosti in frekvence napetosti na elektrodah. Komora je izdelana iz plošče iz borosilikatnega stekla, na kateri so v tanki plasti zlata s postopkom fotolitografije in jedkanja izdelane elektrode. Pokrov je prav tako steklen, vmes pa je obojestranski lepilni trak, ki ima izrezano odprtino v obliki kanala. Lepilni trak določa dimenzije kanala in preprečuje iztekanje tekočine. Komora je prozorna in tanka, zato omogoča opazovanje pod mikroskopom. Lepilni trak v vroči vodi popusti, komoro je mogoče razstaviti, temeljito očistiti in ponovno sestaviti.

---

Pri razvoju postopka ločevanja smo uporabili toplotno obdelane celice CHO kot stabilen model elektroporiranih celic. Pri segrevanju na 50 °C se poveča električna prevodnost membrane in prepustnost za ione. Toplotna obdelava dolgoročno povzroči smrt celice, kratkoročno pa ta še vedno obdrži svojo obliko. Celice smo suspendirali v dielektroforetskem mediju – izosmolarnem fosfatnem pufri s prevodnostjo 27 mS/m. Pred poskusom smo neobdelane žive celice označili s fluorescentnim barvilom in jih zmešali z mrtvimi (toplotno obdelanimi) celicami v razmerju 1:1. Skozi komoro smo črpali medij s pretokom 30 µl/min, na elektrodah pa je bila napetost z amplitudo ±3 V in frekvenco 65 kHz. Celično suspenzijo smo vbrizgali v komoro ter na izhodu vsakih 60 s vzeli vzorec celic in določili razmerje označenih (živih) in neoznačenih (mrtvih) celic. Če na izhodu zbiramo celice do 12. minute, je razmerje med živimi in mrtvimi 25 % : 75 %, v sledečem intervalu pa 93 % : 7 %.

X

Pri nadaljnjih poskusih smo povečali hitrost pretoka na 60 µl/min, zmanjšali napetost na ±1.5 V in namesto fluorescentnega označevanja merili elucijski profil (število celic v časovni enoti na izhodu iz komore). Celice smo v kivetah izpostavili 8 elektroporacijskim pulzom dolžine 100 µs pri električnem polju 1200, 1600, 2000, 2400 in 2800 V/cm. Pri 1200 V/cm je bila večina celic reverzibilno poriranih, pri 2800 V/cm pa ireverzibilno. Izmerili smo elucijske profile pri frekvencah med 20 in 110 kHz. Pri frekvencah, nižjih od 50 kHz, so elucijski profili zelo podobni, zato ločevanje ni učinkovito. Pri 50 – 80 kHz se profili različno elektroporiranih celic najbolj razlikujejo, pri frekvencah nad 80 kHz pa je ločevanje celic še vedno mogoče, vendar zaradi pozitivne dielektroforeze, ki privlači celice k elektrodam, te frekvence niso optimalne.

Preučili smo možnost ločevanja neporiranih, reverzibilno poriranih in ireverzibilno poriranih celic pri začetnem razmerju med koncentracijami teh celic 1:1:1. Z zbiranjem v treh povezanih intervalih smo najboljše ločevanje dosegli pri 65 kHz, kjer je bilo v prvem intervalu 62 % ireverzibilno poriranih celic, v drugem 56 % reverzibilno poriranih in v tretjem 64 % neporiranih celic. Pri zbiranju celic v nepovezanih intervalih pa smo v prvem intervalu dosegli 87 % ireverzibilno poriranih celic, v zadnjem pa 80 % neporiranih celic.

Komoro za ločevanje smo preizkusili tudi s celicami B16F1 z enakim postopkom pri frekvencah med 20 in 65 kHz. Pri 20 kHz so se elucijski profili močno prekrivali, pri višjih frekvencah pa so se vrhovi profilov neporiranih in reverzibilno poriranih celic premaknili proti kasnejšim časom. Najboljše ločevanje ireverzibilno poriranih celic od ostalih dosežemo pri 65 kHz, ločevanje neporiranih celic od reverzibilno poriranih pa je manj učinkovito, saj se dielektroforetska sila na ta dva tipa celic v tem frekvenčnem območju bistveno ne razlikuje.

Pridobljeni rezultati kažejo, da je ločevanje ireverzibilno elektroporiranih celic od reverzibilno elektroporiranih in neporiranih kot ene skupine visoko učinkovito, ločevanje ireverzibilno elektroporiranih celic, reverzibilno elektroporiranih in neporiranih kot treh ločenih skupin pa manj učinkovito, a vseeno izvedljivo.

---

## ABSTRACT

The most widely used device for separation of cells is a flow cytometer, which distinguishes cells based on their optical properties. Cells mostly have similar optical properties, therefore they have to be labeled with fluorescent markers that selectively bind to certain cells. Flow cytometers are large, complicated and expensive, so there is significant demand for simple inexpensive devices for cell detection and separation. One promising method is dielectrophoretic separation, which is based on differences in electrical and geometrical properties of cells. Dielectrophoresis is the motion of uncharged polarizable particles in a nonuniform electric field. It is used for selective manipulation and separation of macromolecules (DNA, proteins), viruses and cells. Biological cell is a polarizable particle, consisting of conductive cytoplasm surrounded by a membrane with a very low conductivity. Under the influence of the external electric field, the charge inside the cell redistributes and the cell becomes an electric dipole, on which an inhomogeneous electric field exerts a dielectrophoretic force.

XI

Electroporation is formation of pores in the cell plasma membrane under the influence of a strong electric field, which enables transport of otherwise impermeant molecules through the membrane. Electroporation can be either reversible or irreversible, depending on the strength and duration of electric field pulses. In reversible electroporation the pores close after electric pulse delivery and the cell recovers, while in irreversible electroporation the cell remains damaged and loses its viability. Electroporation is used for transfer of molecules into the cell, cell fusion and lysis. Pore formation causes an increase in electrical conductivity of the membrane and in molecular transport across it. Generally, the dielectrophoretic force on porated and nonporated cell differs due to different conductivity of these cells.

This thesis describes the development, fabrication and testing of a microchamber for dielectrophoretic separation of nonporated, reversibly electroporated and irreversibly electroporated cells. In a dielectrophoretic field-flow fractionation chamber, cells flow through a long shallow channel, in which the flow velocity profile has a parabolic shape. Interdigitated electrodes at the bottom of the channel create an inhomogeneous electric field mainly in the vertical direction. Gravity pulls the cells down, while dielectrophoretic force repels them away from the electrodes in vertical direction. The cells thus acquire their equilibrium height, and cells at different heights flow through the channel with different velocities, therefore reaching the output of the chamber at different times.

Numerical computation of electric field was performed for optimization of electrode and chamber dimensions. Theoretical dielectrophoretic response of cells was calculated to determine the initial values of fluid flow and electric field. The chamber was constructed from a single Pyrex wafer with interdigitated Au electrodes, a spacer, and a top cover glass, making the events in the chamber observable under most optical microscopes. The electrodes were fabricated using photolithography and etching. A double-sided self-adhesive tape of 100  $\mu\text{m}$  thickness was used as a spacer, with an opening of 80 mm length and 20 mm width cut in its middle to form a channel of 100  $\mu\text{m}$  height, and with water-resistant acrylic glue of the tape holding the glass plates together and providing a tight seal. The glue loses its adhesive properties above 70  $^{\circ}\text{C}$ , allowing for easy disassembly of the chamber in hot water and its thorough cleaning.

---

For development of the separation method, we used heat-treated cells as a stable model of electroporated cells. Heat treatment at 50 °C causes an increase of membrane electrical conductivity and permeability for molecules. Cells lose their long-term viability but preserve their shape and appearance. For our experiments, the cells were suspended in a phosphate buffer saline with electrical conductivity of 27 mS/m. Before the experiments, we labeled non-treated cells with a fluorescent marker and mixed them with unlabeled non-treated ones in equal ratios. The buffer was pumped through the chamber with a fluid flow of 30  $\mu\text{l}/\text{min}$ , the voltage on electrodes was  $\pm 3$  V and the field frequency 65 kHz. We injected the cell suspension into the chamber, took samples of cells at the output every 60 s, and determined the ratio of non-treated and heat-treated cells in every batch. Collecting the cells at the output until 12<sup>th</sup> minute in first container yielded a 25 % : 75 % ratio of non-treated and heat-treated cells respectively, and after 12<sup>th</sup> minute a 93 % : 7 % ratio was obtained in the second container.

## XII

In the experiments that followed, we increased the fluid-flow to 60  $\mu\text{l}/\text{min}$  and decreased the voltage to  $\pm 1.5$  V to avoid unintended electroporation by the dielectrophoretic field. Instead of cell labeling, we measured elution profiles of each cell class at the output of the chamber. The cells were exposed to a train of 8 rectangular pulses 100  $\mu\text{s}$  long with amplitudes 1200, 1600, 2000, 2400 and 2800 V/cm. Most of the cells were reversibly porated at 1200 V/cm, and irreversibly porated at 2800 V/cm. We measured the elution profiles at flow of 60  $\mu\text{l}/\text{min}$ , voltage of  $\pm 1.5$  V and at frequencies from 20 and 110 kHz. Below 50 kHz the elution profiles were all rather similar, making fractionation inefficient. At 50 – 80 kHz the profiles were the most distinguished, while above 80 kHz fractionation was still feasible, but suboptimal due to the occurrence of positive dielectrophoresis that attracts the cells towards the electrodes.

We investigated the feasibility of fractionating nonporated, reversibly porated and irreversibly porated cells in initial concentration ratios of 1:1:1. By collecting the cells into containers in consecutive time intervals, the best results were achieved at 65 kHz, where the first interval yielded 62 % of irreversibly porated cells, the second 56 % of reversibly porated cells, and the third 64 % of nonporated cells. By collecting the cells in nonjoined intervals, the fractionation efficiency was improved up to 87 % of irreversibly porated cells in the first and 80 % of nonporated cells in the third interval.

The chamber was also tested on B16F1 cells, following identical procedure at frequencies from 20 to 65 kHz. At 20 kHz, the elution profiles differed only negligibly, while at higher frequencies the profile peaks of the nonporated and reversibly porated cells shifted considerably towards slower flow rates. Optimal separation of irreversibly porated cells was achieved at 65 kHz, while fractionation of nonporated from reversibly porated cells was much less efficient, reflecting a very similar dielectrophoretic force acting on both classes.

Our results show that separation of irreversibly electroporated cells from reversibly porated and nonporated cells treated as a single class can be performed with rather high efficiency, while fractionation of irreversibly electroporated, reversibly electroporated, and nonporated cells is much less efficient, but still feasible at a properly selected frequency.

# 1. UVOD

Ločevanje celic je v zadnjih letih aktualna raziskovalna tema, saj za najrazličnejše analize potrebujemo čim bolj homogeno populacijo celic v vzorcu. Dejansko pa so vzorci celic pogosto heterogeni, saj vsebujejo npr. žive in mrtve celice, zdrave in okužene celice, ali pa več različnih vrst celic (npr. v vzorcih krvi). Možnost ločevanja teh celic pred izvedbo poskusa je tako pogosto ključna za kakovost in zanesljivost rezultatov (Dainiak *et al.* 2007, Pappas and Wang 2007).

Primer ločevanja celic v klinični medicini je izolacija tumorskih celic iz krvi (Salmanzadeh *et al.* 2012). Te celice so zelo redke, lahko le ena na vsak mililiter krvi, vendar so pomembne za diagnozo rakavega obolenja in spremljanje poteka zdravljenja. Med drugimi pomembnimi primeri klinične uporabe sta še izolacija limfocitov T pri diagnozi in zdravljenju okužbe z virusom HIV (Cheng *et al.* 2007) in izolacija z malarijo okuženih celic (Gascoyne *et al.* 2004), za bazične študije pa je pomembno ločevanje različnih izvornih celic iz krvi na podlagi njihovih lastnosti (David *et al.* 2005).

Najpogostejši pristop pri določanju količine oziroma koncentracije celic je označevanje z markerji – molekulami, ki se selektivno vežejo le na te celice oziroma vstopajo vanje. Takšni markerji morajo imeti določeno lastnost, na osnovi katere jih je mogoče zaznati (npr. so magnetni ali fluorescirajo). Najbolj uveljavljena metoda prepoznave razlik med celicami temelji na označevanju celic s fluorescentnimi markerji. Zlati standard ločevanja celic je pretočni citometer z ločevalnikom – FACS, ki ločuje celice na podlagi optičnih lastnosti (Bhagat *et al.* 2010). Za takšno ločevanje je celice prej večinoma potrebno označiti s selektivnim fluorescentnim markerjem, ki se veže oziroma vstopa le v eno skupino celic, citometer z ločevalnikom pa nato ločuje posamezne celice glede na intenziteto oziroma valovno dolžino fluorescence, ki jo oddajajo. Takšne naprave so velike, zapletene in zelo drage, zato obstaja znaten interes za metode detekcije in ločevanja celic, ki bi bile uporabne kljub manjši in preprostejši zasnovi ter nižji ceni.

Ker markerji s svojo vezavo oziroma vstopom v celice pogosto vplivajo na njihovo delovanje, je smiselno tudi razvoj metod, pri katerih označevanje celic z markerji ni potrebno, saj ločevanje temelji na razliki v sili na celice. Med tovrstne metode sodijo centrifugiranje, ki omogoča ločevanje celic po gostoti, filtriranje, s katerim ločujemo celice po velikosti, in dielektroforetsko ločevanje, s katerim ločujemo celice predvsem glede na njihove električne lastnosti.

Dielektroforeza je definirana kot gibanje polarizabilnih teles v nehomogenem izmeničnem električnem polju (Pohl and Crane 1971, Morgan and Green 2003), uporablja pa se za selektivno manipulacijo in ločevanje različnih makromolekul (DNA, proteini), virusov in celic (Pamme 2007, Roda *et al.* 2009). Biološka celica je polarizabilna, saj večji del njene notranjosti tvori električno prevodna tekočina – citosol, ki mu skupaj s celičnimi organeli pravimo citoplazma, obdaja pa jo električno neprevodna plast – membrana. Pod vplivom električnega polja se naboji znotraj citosola prerazporedijo, del se jih nabere ob neprevodni membrani, skozi katero ne morejo. Celica zato navzven deluje kot električni dipol, na katerega v nehomogenem električnem polju deluje dielektroforetska sila. Celice je tako mogoče ločevati z dielektroforezo, če pripadajo dvema

---

skupinama, ki se dovolj razlikujeta v geometriji ali električnih lastnostih, predvsem električni prevodnosti in dielektričnosti (Voldman 2006). Če se celice različnih skupin dovolj razlikujejo po svojih električnih lastnostih, se razlikuje tudi dielektroforetska sila nanje, zato v komori oziroma sistemu elektrod, s katerim ustvarjamo polje, zavzamejo različne položaje.

Celice lahko ločujemo glede na predznak dielektroforetske sile pri določeni frekvenci izmeničnega polja, bolj občutljivi pa so pristopi, pri katerih ločevanje temelji na razlikah v velikosti te sile (Meighan *et al.* 2009). Elektrode, s katerimi v komori za ločevanje ustvarjamo nehomogeno električno polje, so lahko različnih oblik, lahko pa nehomogenost dosežemo tudi s postavitvijo neprevodnih struktur v sicer homogeno polje (Khoshmanesh *et al.* 2011). Med najbolj učinkovitimi metodami hitrega ločevanja celic, ki se razlikujejo po električnih lastnostih, je dielektroforetsko ločevanje v mikropretočni komori (ang. dielectrophoretic field-flow fractionation – DEP-FFF) (Huang *et al.* 1997, Marx *et al.* 1997, Yang *et al.* 1999, 2000, Holmes *et al.* 2003, Yu *et al.* 2007). V sistemih DEP-FFF na celico v vertikalni smeri delujeta dve sili: efektivna gravitacijska sila (razlika med težnostjo in vzgonom) ter dielektroforetska sila (Castellanos *et al.* 2003). Ker je gostota celice malo večja od gostote medija, je efektivna gravitacijska sila usmerjena navzdol in jo imenujemo tudi sedimentacijska sila. Elektrode se najpogosteje nahajajo na dnu komore, frekvenco polja pa izberemo tako, da deluje dielektroforetska sila v smeri navzgor, torej nasproti sedimentacijski sili (t.i. negativna dielektroforeza). Velikost dielektroforetske sile pada z razdaljo od elektrod, sedimentacijska sila pa je neodvisna od višine, zato celica na določeni višini nad elektrodami doseže svojo ravnotežno lego. Ker je dielektroforetska sila odvisna od električnih lastnosti celic, dosežejo celice, ki se električno razlikujejo, različne ravnotežne višine. V plitvem kanalu je pretok laminaren in ima po višini paraboličen hitrostni profil, z najnižjo hitrostjo na dnu in na vrhu kanala ter najvišjo na sredini (Huang *et al.* 1997). Celice na različnih višinah tako pretok nosi različno hitro, zato celice, katerih ravnotežne višine so bližje vertikalni sredini kanala, prispejo na izhod prej kot celice z ravnotežno višino bližje dnu ali vrhu kanala. Če celice na izhodu najprej zbiramo v eno posodo, ob določenem času pa jo zamenjamo z drugo posodo, lahko tako zberemo celice enega tipa v eni, drugega pa v drugi posodi in jih s tem ločimo. Ker sta tako dielektroforetska kot efektivna gravitacijska sila sorazmerni prostornini celice, je vpliv velikosti celic pri tovrstnem ločevanju zmanjšan. Z DEP-FFF tako ločujemo celice glede na velikost dielektroforetske sile, kar je bolj občutljiva metoda od ločevanja glede na predznak te sile.

V večini dosedanjih študij so razvijali sisteme DEP-FFF za ločevanje celic, katerih lastnosti se v času pretoka celic skozi kanal komore niso znatno spreminjale, zato velika dolžina kanala in počasen pretok celic nista bila problematična. Ločevanje elektroporiranih celic od neporiranih je načeloma težavnejše, saj reverzibilno elektroporirane celice okrevaajo in se tako s časom vse manj razlikujejo od neporiranih, zato je zelo pomembno tudi, da je postopek ločevanja čim hitrejši.



## 1.1. Pregled metod ločevanja celic

### 1.1.1. Mehansko in hidrodinamično ločevanje celic

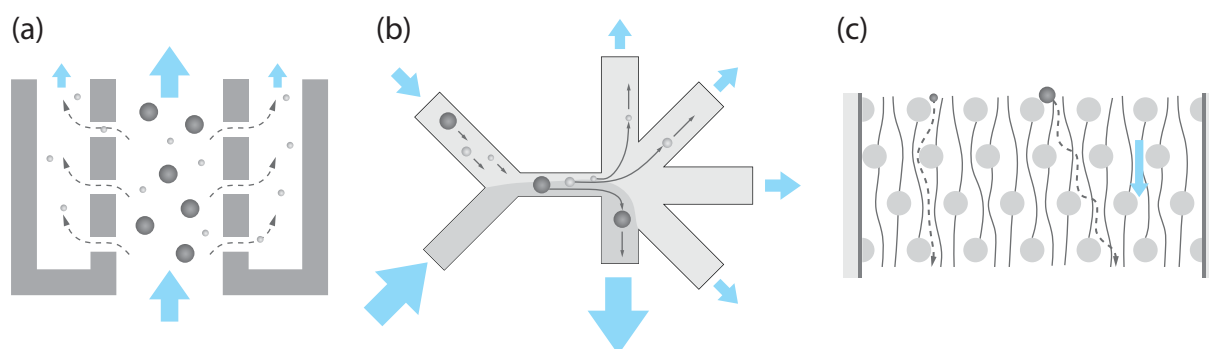
#### 1.1.1.1. Naprave za mehansko ločevanje celic

Najpreprostejši sistem ločevanja celic po velikosti je filtriranje. Filtri pa se lahko zamašijo, zato so bili razviti sistemi, ki odpravljajo to slabost, npr. difuzijski filtri, v katerih se celice ne ustavijo v filtru, temveč večje celice nadaljujejo pot z glavnim tokom, manjše celice pa skupaj z delom medija prehajajo skozi stranske odprtine v filtru proti drugemu izhodu (slika 1a).

Med mehanske metode ločevanja uvrščamo tudi centrifugiranje, ki celice ločuje glede na gostoto. Metoda je primerna za sočasno ločevanje velike količine celic, najpogosteje pa se uporablja pri krvnih celicah. Gravitacijo lahko kot silo ločevanja uporabimo tudi v mikropretočnih komorah, vendar je učinkovita gravitacijska sila zaradi nasprotno usmerjene vzgonske sile dokaj majhna, zato je takšno ločevanje manj uspešno kot pri uporabi dielektroforetske, magnetne ali ultrazvočne sile.

#### 1.1.1.2. Naprave za hidrodinamično ločevanje celic

Hidrodinamično ločevanje večinoma poteka v laminarnem pretoku in omogoča predvsem ločevanje na podlagi velikosti. Če suspenzijo, ki vsebuje različne velike celice, vbrizgavamo v kanal, katerega širina le malo presega velikost največjih celic, z druge strani pa v ta kanal z višjo hitrostjo vbrizgavamo še čist medij tako, da se medija med seboj ne mešata, bodo manjše celice ostale v svojem pretoku, večje pa bodo delno segale tudi v območje višjega pretoka, kar jih bo ob razširitvi kanala potegnilo v odtok, v katerega odteka medij z višjo hitrostjo (slika 1b) (Pamme 2007, Tsutsui and Ho 2009). V pretočni kanal je mogoče namestiti tudi ovire, ki jih oblikujemo tako, da manjše celice potujejo naravnost skozi kanal, večje celice pa se ob ovirah premaknejo v stran, s čimer dobimo ločeni populaciji, a se celice kljub temu ne morejo zatakni med ovirami (slika 1c).



Slika 1: Mehansko in hidrodinamično ločevanje celic po velikosti. (a) difuzijski filter, (b) ločevanje v zožitvi kanala z dvema pretokoma (ang. pinched flow fractionation), (c) ločevanje z ovirami (sivi okrogli stebrički) v pretoku. Prirejeno po (Tsutsui and Ho 2009).

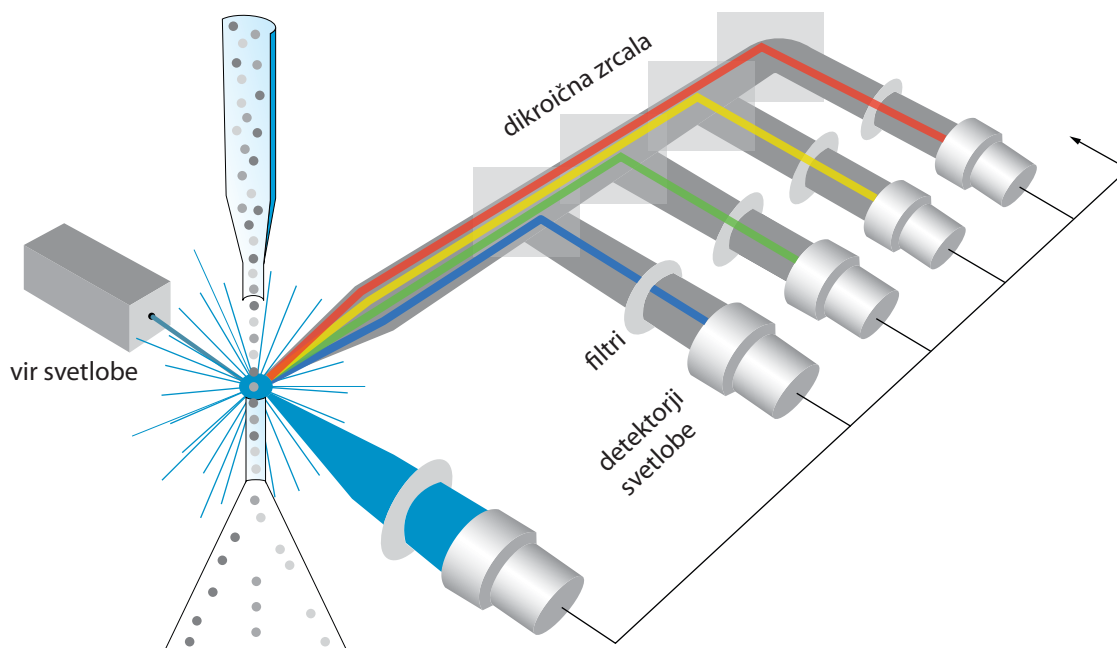
### 1. 1. 1. 3. Prednosti in slabosti mehanskega in hidrodinamičnega ločevanja celic

Pri mehanskih in hidrodinamičnih metodah ločevanja pogosto potrebujemo le pretok celične suspenzije brez drugih virov energije. Učinkovito ločevanje dosežemo z ustrezno obliko filtra ali kanala v komori. Kapaciteta takih naprav je precej velika, omejeni pa smo na ločevanje po velikosti celic. Slabost filtrov je tudi, da se lahko zamašijo, velikost odprtin pa je prilagojena točno določeni velikosti celic. Hidrodinamične metode so bolj prilagodljive, a pogosto zahtevajo uporabo več kot ene črpalke.

### 1.1.2. Optično ločevanje

#### 1. 1. 2. 1. Pretočni citometri

Med optične metode ločevanja uvrščamo pretočni citometer z ločevalnikom (ang. Fluorescence-activated cell sorting – FACS), ki velja za zlati standard identifikacije in ločevanja celic (Bhagat *et al.* 2010). Takšne naprave so že dolgo na trgu, so zanesljive, občutljive in imajo precej visoko zmogljivost ločevanja (do  $10^5$  celic/s), so pa dokaj velike in drage, potrebujejo usposobljeno osebo, ki upravlja z napravo, poleg tega pa je potrebno vzorce celic prej ustrezno pripraviti, preživetje celic po ločevanju pa ni vselej dovolj veliko. FACS ločuje celice glede na fluorescenco, zato je celice potrebno označiti z fluorescentnimi barvili. Izjemoma lahko z isto napravo ločujemo tudi neoznačene celice, če se dovolj razlikujejo po optičnih lastnostih (na primer količina sipane in emitirane svetlobe ali velikost). Naprava identificira celice, nato pa ločevalnik usmerja posamezne celice proti določenemu izhodu (slika 2).



Slika 2: Pretočni citometer z ločevalnikom (FACS). Prirejeno po (Semrock 2012).

Pred ločevanjem celice večinoma označimo s fluorescentnim barvilom, ki označi določeno vrsto celic. V pretočnem citometru celice v suspenziji potem potujejo ena za drugo skozi kanal, kjer jih osvetljujemo s svetlobo ustrezne valovne dolžine. Z detektorjem lahko merimo sipano ali pa emitirano svetlobo, ki jo nato razdelimo po valovnih dolžinah. Računalnik na podlagi meritev svetlobe določi, katere celice pripadajo določenemu tipu, ločevalnik pa potem identificirane celice razvrsti v ustrezne izhode. Pogosto se za premik celic proti ustreznemu izhodu uporablja električno polje, lahko pa tudi ultrazvočno valovanje.

### 1. 1. 2. 2. Optične pincete

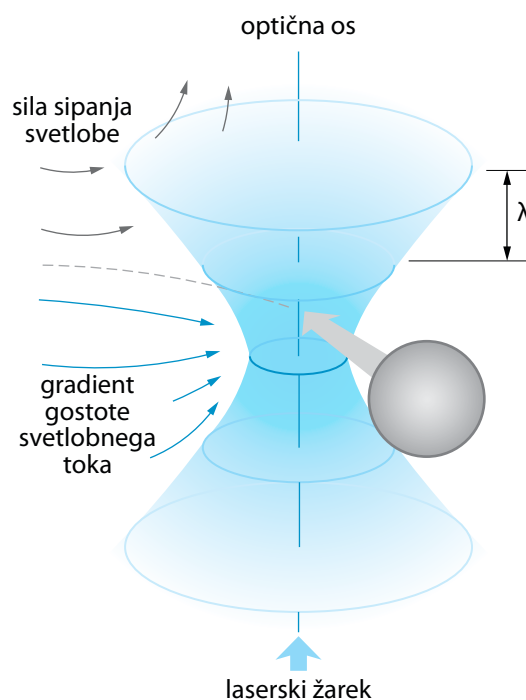
Pretočna citometrija izkorišča optične lastnosti celic le za identifikacijo celic, svetlobo pa lahko uporabimo tudi za generiranje sile na celice. Najbolj znana naprava te vrste je t.i. optična pinceta (ang. optical tweezers - OT), ki je bila prvič predstavljena leta 1986 (Jonáš and Zemánek 2008).

Optične pincete temeljijo na fokusirani svetlobi, s čimer dobimo področja večjega in manjšega svetlobnega toka. Če je refrakcijski indeks telesa višji kot indeks medija, telo vleče proti območju gorišča svetlobe (slika 3). V nasprotnem primeru pa sila na telo deluje v smeri proti manjšemu svetlobnemu toku, torej proč od gorišča. Sila nastane zaradi izmenjave gibalne količine fotonov in telesa. Za premik teles, velikih nekaj  $\mu\text{m}$ , potrebujemo mnogo fotonov in koherentno svetlobo, kar najlažje dosežemo z laserjem. Optične sila na telo je (Jonáš and Zemánek 2008)

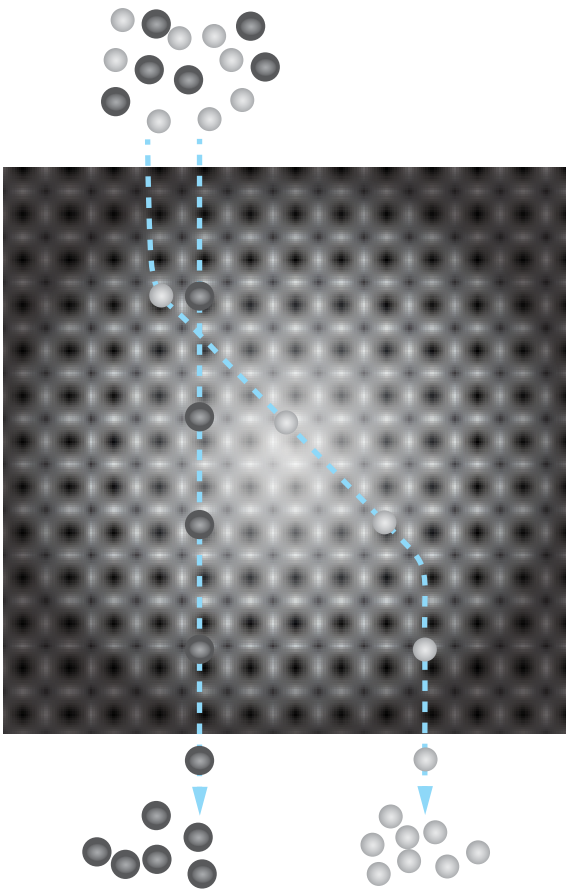
$$F_{\text{OPT}} = \frac{P_L \cdot n_1}{c_0} Q_{\text{OPT}}, \quad (1)$$

kjer je  $P_L$  moč laserja,  $n_1$  refrakcijski indeks medija,  $c_0$  hitrost svetlobe v vakuumu in  $Q_{\text{OPT}}$  faktor učinkovitosti, ki je odvisen od velikosti telesa, oblike, snovi in tudi od pozicije glede na laserski žarek, lahko pa doseže največjo vrednost 2. Običajno je velikost sile reda nekaj deset fN do nekaj pN. Izračun sile na mikrometerska telesa je zapleten, zato se sila običajno izračuna s pomočjo Maxwellovega tenzorja mehanskih napetosti, podobno kot za izračun elektromagnetne sile.

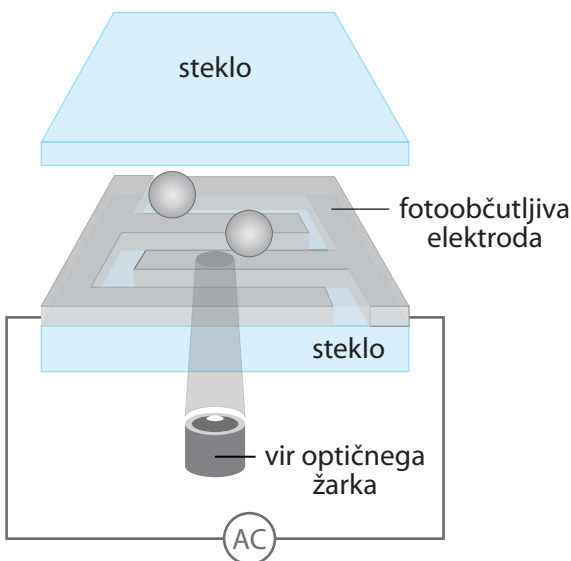
Metoda je zelo učinkovita za manipulacijo posameznih teles, če želimo manipulirati večje število teles hkrati, pa moramo ustvariti primerno nehomogeno polje fokusirane svetlobe. To lahko storimo z več izvori svetlobe, z modulacijo žarka ali pa z ustrežno masko, ki fokusira svetlobo le na določena področja.



Slika 3: Močno fokusirana svetloba potiska telesa proti fokusni točki ali stran od nje. Povzeto po (Grier 2003).



Slika 4: Ločevanje celic z optično mrežo fokusirane svetlobe. Optična sila na temno sive celice je majhna, zato se premikajo naravnost skozi komoro, sila na svetlo sive celice pa je večja, zato se premaknejo prečno glede na smer pretoka. Prirjeno po (Dholakia *et al.* 2007).



Slika 5: Lateralna optoelektrična pinceta z elektrodami na dnu komore, ki jih posamično in selektivno vključujemo in izključujemo s svetlobnim tokom. Povzeto po (Ohta *et al.* 2007).

Kontinuirano ločevanje celic je mogoče doseči z optično kromatografijo. V mikropretočni komori se celice gibljejo skupaj z medijem. Z laserjem lahko premaknemo celice, ki se razlikujejo po velikosti ali refrakcijskem indeksu, jim s tem spremenimo tirnico (trajektorijo) in jih tako usmerimo proti različnim izhodom iz komore. Pogosto se za ločevanje celic uporablja optična mrežo. Laserski žarek lahko razdelimo na več žarkov in s tem pokrijemo večje področje v komori za ločevanje, kar omogoča večjo kapaciteto ločevanja celic. Celice lahko nato ujamemo na področja fokusirane svetlobe ali pa jih le premaknemo prečno glede na smer pretoka (slika 4) (Dholakia *et al.* 2007).

### 1. 1. 2. 3. Optoelektrične pincete

Slabost optične manipulacije je potreba po relativno veliki gostoti svetlobnega toka, ki je potrebna za zagotovitev zadostne sile; pri laserski svetlobi mora ta znašati med  $10^5$  in  $10^7$  W/cm<sup>2</sup>, kar lahko povzroči segrevanje celice in vpliva na njihovo preživetje (Liu *et al.* 1995). Optične pincete dosežejo zelo visoko resolucijo, vendar je njihova učinkovitost visoka le pri delcih, manjših od premera žarka. Pri telesih velikosti nekaj mikrometrov, med katera sodijo tudi celice, tako nastopi težava s premajhnim območjem fokusirane svetlobe, ki težko pokrije celotno telo. Chiou s sodelavci je zato združil optično in dielektrično manipulacijo v t.i. optoelektrično pinceto – OET (Chiou *et al.* 2005), ki jo prikazuje slika 5.

Ena ali več elektrod optoelektrične pincete je narejena iz fotoobčutljivega materiala, nanjo pa dovajamo izmenično napetost. Če takšno elektrodo osvetlimo, postane prevodna in ustvarja nehomogeno električno polje, s katerim lahko dielektroforetsko ločujemo celice in manjše molekule. Zaradi prednapetosti na elektrodah je potreben precej manjši svetlobni tok kot pri klasičnih optičnih pincetah (med 0.1 in 100 W/cm<sup>2</sup>), ki ga lahko ustvarimo z LED svetili ali modificiranimi računalniškimi

projektorji. S takšnim sistemom lahko manipuliramo celice na površini več kot  $1 \text{ mm}^2$ , kar je vsaj 500-krat več kot pri navadnih optičnih pincetah, a kljub temu manj kot pri mnogih dielektroforetskih sistemih z nespremenljivimi elektrodami. Druga prednost OET pa je prilagodljivost elektrod, katerih aktivno površino lahko prilagajamo s spremembo vzorca osvetlitve.

#### 1. 1. 2. 4. Prednosti in slabosti optičnega ločevanja celic

Pretočni citometer (FACS) celice ločuje na podlagi analize optičnih lastnosti posamezne celice. Naprava je zlati standard za ločevanje celic, vendar je zahtevna za uporabo in vzdrževanje ter ima visoko ceno. Optične pincete ne potrebujejo markerjev, njihova slabost pa je velika zahtevana gostota svetlobnega toka, za kar potrebujemo laserski vir svetlobe, ta pa lahko povzroči znatno segrevanje celic. Optoelektrične pincete potrebujejo precej manjšo gostoto svetlobnega toka, ločevanje pa poteka z dielektroforezo. Težava pri uporabi optičnih in optoelektričnih pincet je tudi sedimentacija in prijemanje celic na podlago, podobno kot pri drugih sistemih za ločevanje celic. V primeru pretoka celic skozi komoro, kjer celice ločujemo s premiki prečno na smer pretoka, je prijemanja manj, če celice z optično silo ujamemo v komori, pa se lahko sprimejo med seboj ali na podlago. Prijemanje na podlago lahko zmanjšamo s premazi proti prijemanju ali z obdelavo površine, npr. s polietilenglikolom ali albumini (Lau *et al.* 2009).

7

#### 1.1.3. Magnetno ločevanje

Z magnetnim poljem lahko manipuliramo predvsem s feromagnetnimi in paramagnetnimi telesi, takšno manipulacijo pa imenujemo magnetoforeza. Biološke celice, z izjemo eritrocitov in nekaterih bakterij, imajo zanemarljiv magnetni moment (Gossett *et al.* 2010), zato jih moramo za ločevanje označiti s paramagnetnimi delci. Ti večinoma ne vplivajo na preživetje celic in njihovo funkcionalnost, razen pri najbolj občutljivih celicah, kot so izvirne celice, kjer vpliv markerjev na diferenciacijo ni izključen (Roda *et al.* 2009).

Na paramagnetno telo magnetna sila v homogenem magnetnem polju ne deluje, v nehomogenem polju pa znaša

$$F_M = \frac{V\chi}{\mu_0} \nabla |B|^2, \quad (2)$$

kjer je  $V$  prostornina telesa,  $\chi$  susceptibilnost,  $\mu_0$  indukcijska konstanta in  $B$  gostota magnetnega polja. Tako lahko magnetno ločujemo celice, ki se razlikujejo po velikosti ali po magnetni susceptibilnosti.

##### 1. 1. 3. 1. Magnetni delci za označevanje celic

Za označevanje celic se uporabljajo super-paramagnetni delci velikosti med 10 nm in 5  $\mu\text{m}$ . Velikost magnetne domene lahko izračunamo z enačbami kvantne mehanike, za železo je tipična velikost dimenzije domene 42 nm, zato so manjši super-paramagnetni markerji sestavljeni iz ene same magnetne domene, večji pa iz večih. Enodomenski delci postanejo super-paramagnetni, če je njihova magnetna energija, ki je enaka produktu prostornine delca in magnetna anizotropna konstanta, vsaj desetkrat manjša od termične energije. Za železno kroglico je pri sobni temperaturi ta pogoj izpolnjen, če znaša njen premer največ 12 nm (Gijs 2004).

Večinoma kroglice tvori paramagnetno jedro, obdano z ovojem iz materiala, ki omogoča vezavo na določeno mesto v celici oziroma na njeni membrani. Magnetni markerji tako hkrati omogočajo selektivno označevanje in manipulacijo celic v magnetnem polju. Za jedro se uporabljajo železovi oksidi, npr.  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , ki so v primerjavi s samim železom bolj odporni na oksidacijo, ovoj kroglice pa je običajno zgrajen iz polistirena, dekstrana, ipd, v katerega so vgrajene molekule, ki zagotavljajo vezavo na celico (najpogosteje imunski protitelesi). Magnetizacija enodomenskih delcev (premer med 5 in 100 nm) je brez histereze, kar omogoča preprosto vključevanje in izključevanje magnetnega polja. Ko na delce deluje magnetno polje, se lahko aglomerirajo (združujejo v večje skupke), a se ob izklopu polja ponovno suspendirajo. Večji magnetni delci, s premeri med 0.5 in 5  $\mu\text{m}$ , imajo jedro iz več domen, katerega magnetizacija poteka po histerezi. Po izključitvi magnetnega polja ostane remanentna magnetizacija, posledično pa se tudi aglomeracija delcev lahko delno ohrani.

Uspešnost ločevanja je najbolj odvisna od selektivnosti vezave izbranega magnetnega markerja na posamezen tip celic. Če želimo ločiti dva tipa celic, mora imeti eden od obeh tipov celic na membrani znatno več vezalnih mest za ta marker kot drugi. Komericalno je na voljo mnogo različnih magnetnih markerjev z različnimi protitelesi v ovoju, na primer DYNAL<sup>®</sup> Magnetic Beads (Invitrogen, ZDA) in MACS MicroBead (Miltenyi Biotec GmbH, Nemčija), ki se lahko uporabljajo v napravah za avtomatsko ločevanje omenjenih proizvajalcev, ali pa ročno s pipetiranjem ob prisotnosti magnetnega polja.

Magnetno ločevanje se pogosto uporablja za izolacijo eritrocitov, saj imajo ti zaradi hemoglobina, ki vsebuje železo, dovolj veliko magnetno susceptibilnost, da jih ni potrebno označevati z magnetnimi markerji. Primer takšne uporabe je izolacija okuženih eritrocitov pri obolenosti z malarijo; delež okuženih eritrocitov je praviloma nizek, zato je okužbo težko zaznati, a vsebujejo okuženi eritrociti znatno manj hemoglobina od zdravih, zato jih lahko z magnetnim ločevanjem učinkovito izoliramo (Zborowski and Chalmers 2008).

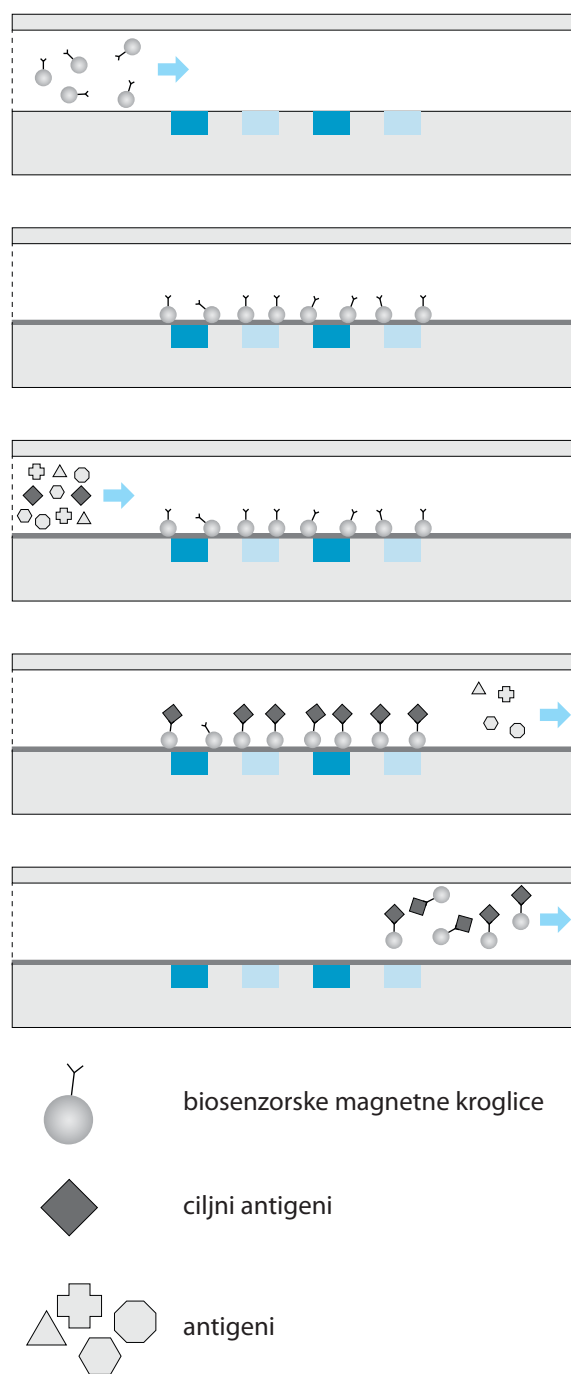
### 1. 1. 3. 2. Mikropretočne komore za magnetno ločevanje

Večje naprave za magnetno ločevanje celic so komercialno dosegljive že dlje časa, v zadnjih letih pa se pojavljajo tudi mikropretočne komore za magnetno ločevanje. Za takšno ločevanje potrebujemo pretočno komoro, v kateri je nehomogeno magnetno polje, in celice, selektivno označene z magnetnimi markerji. Zmogljivost kontinuiranega magnetnega ločevanja je nekaj deset tisoč celic na sekundo, pri ločevanju označenih in neoznačenih bakterijskih celic pa so poročali o uspešnosti do 90 % (Xia *et al.* 2006).

Prednost uporabe mikropretočnih komor je zelo visok gradient gostote magnetnega pretoka, ki ga zagotavljajo majhne dimenzije komore, to pa skladno z enačbo (2) povzroči veliko silo na magnetne delce. Z magnetnim poljem lahko v pretočni komori imobiliziramo celice z določenimi lastnostmi, ki se vežejo na magnetne kroglice s protitelesi (slika 6), v primeru kontinuiranega ločevanja pa povzročimo zadosten premik z magnetnimi markerji označenih in neoznačenih celic proti ustreznim izhodom (slika 7 in slika 8).

Po analogiji z metodo dielektroforetskega ločevanja v pretočni komori (DEP-FFF), ki smo jo omenili v uvodu in jo bomo podrobneje opisali v nadaljevanju, je bila razvita tudi metoda magnetnega ločevanja v pretočni komori, ki temelji na ravnotežju med gravitacijsko in magnetno silo. Za uspešno ločevanje 12.5 nm in 6.5 nm velikih  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  delcev s to metodo je potrebno magnetno polje z gostoto pretoka vsaj 0.08 T in gradientom vsaj 230 T/m (Zborowski and Chalmers 2008). Izboljšani sistem kontinuiranega ločevanja ima lahko več izhodov, kar omogoči tudi ločevanje glede na velikost magnetne sile na celice, saj večja sila povzroči večji odmik od toka nemagnetnih celic (slika 8). Tako lahko celice ločujemo na primer glede na število vezalnih mest za magnetna protitelesa, saj se na celico z več vezalnimi mesti pritrdi več magnetnih markerjev, zato je sila na tako celico večja.

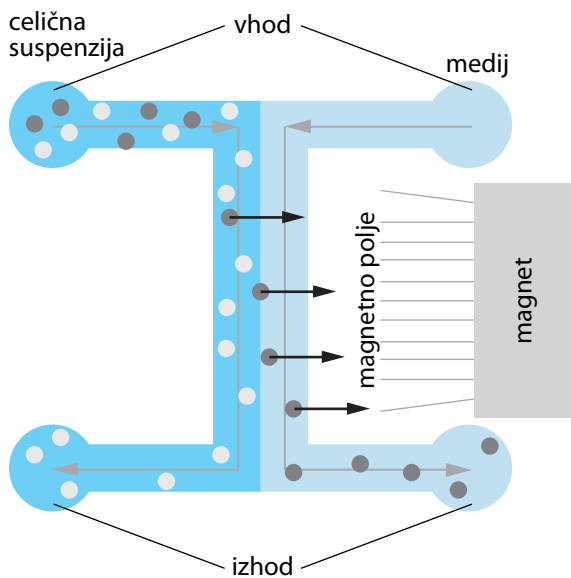
Najpomembnejša omejitev naprave za magnetno ločevanje je ustvarjanje dovolj nehomogenega polja, zaradi česar mora biti magnet zelo blizu kanala, v katerem se nahajajo celice, v nasprotnem primeru pa je potrebna tolikšna jakost polja, da lahko pride do znatnega segrevanja (Pamme 2007). S kanali v PDMS (polidimetilsiloksanu), zalitimi s tekočo kovino za spajkanje, ki ob strditvi postane vodnik za tok, so oddaljenost magneta od kanala uspeli znižati na le 10  $\mu\text{m}$  (Siegel *et al.* 2007). Največji gradient magnetnega polja je mogoče doseči s hibridnimi magneti, kjer kombinacija močnega velikega magneta zunaj mikropretočne komore in manjše strukture iz magnetnega materiala zelo blizu kanala lahko ustvari tudi do trikrat večji gradient gostote magnetnega pretoka kot sam zunanji magnet (Pamme 2007).



Slika 6: Princip šaržnega magnetnega ločevanja. (a) Vnos biosenzorskih magnetnih kroglic, (b) prijemanje ustreznih kroglic na površini kanala ob magnetu, (c) vnos vzorca, (d) imobilizacija celice s ciljnim antigenom, (e) izklop polja in sprostitvev kroglic s celicami. Prirejeno po (Choi *et al.* 2000).

### 1. 1. 3. 3. Prednosti in slabosti magnetnega ločevanja celic

Pri električnih metodah ločevanja, ki jih bomo podrobneje obravnavali v nadaljevanju, morajo biti elektrode v neposrednem stiku s celično suspenzijo, da se ustvari dovolj močno električno polje. Pri magnetnem ločevanju pa je magnet lahko izoliran od celične suspenzije, metoda pa je tudi neobčutljiva na pH, koncentracije ionov in površinske naboje. Slabost magnetnega ločevanja je potreba po označevanju celic (razen eritrocitov), saj večina celic ne izkazuje magnetnih lastnosti. Sila na magnetni delec je proporcionalna njegovi prostornini, zato je sila na posamezno paramagnetno kroglico majhna in v praksi ni mogoče premikati celic, na katere je vezana ena



Slika 7: Princip kontinuiranega magnetnega ločevanja. Suspendirane celice in medij prečrpavamo skozi kanal (sivi puščici), na začetku katerega so celice zbrane na njegovi levi strani, magnetno polje pa vleče označene celice proti desni. Na koncu kanala celice iz vsake polovice potujejo proti svojemu izhodu. Prirejeno po (Kim and Park 2005).

### 1.1.4. Ultrazvočno ločevanje

Ultrazvočna manipulacija s stoječimi valovi (ang. ultrasonic standing wave – USW) je enostavna metoda za premikanje, ločevanje in sedimentacijo večje količine majhnih teles. Nekateri jo po analogiji z magnetoforezo imenujejo tudi sonoforeza ali akustoforeza. Temelji na stojećem valovanju, kjer je tlačna sila, ki jo ustvarja ultrazvok (akustična oziroma zvočna sila), časovno nespremenljiva in običajno privlači telesa v območje najnižjega tlaka – na področje vozlišč valovanja.

sama taka kroglica, temveč le celice, na katere se pritrdi dovolj veliko število le-teh. Tudi v takšnih primerih je magnetna sila na celice tipično precej manjša od dielektroforetske sile, ki jo ustvarjamo z izmeničnim električnim poljem, temu primerno pa je nižja tudi zmogljivost oziroma hitrost ločevanja (Pamme 2007).

Učinkovitost magnetnega ločevanja je primerljiva s tisto, ki jo dosežemo s fluorescenčnim označevanjem celic in ločevanjem s pretočnim citometrom, na primer 96 % pri ločevanju celic glede na izražanje proteina CD34 (Zborowski and Chalmers 2008). Prednost magnetnega ločevalnika v primerjavi s pretočnim citometrom je ta, da je potrebno pri slednjem ustrezno identificirane celice individualno usmerjati z dodatno silo (mehansko, električno), pri magnetoforezi pa magnetni markerji že sami zagotovijo tako selektivno označevanje kot tudi ustrezno silo, ki celice razvrsti oziroma loči (Schneider *et al.* 2010).



Stacionarna akustična sila stoječega valovanja je posledica nelinearnega učinka časovnega povprečja zvočnega tlaka okrog telesa. Akustična sila na celico v tekočem mediju je:

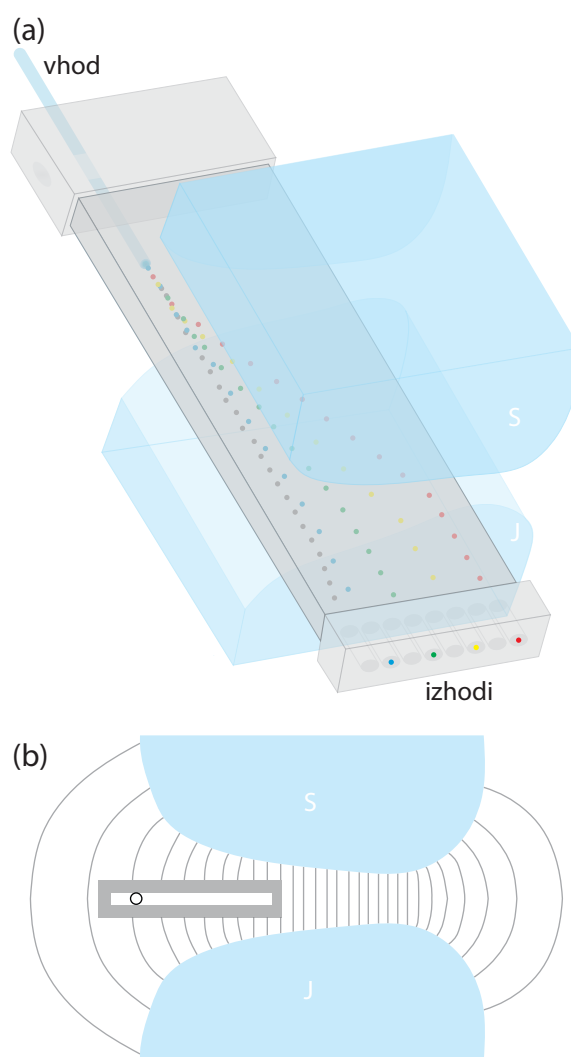
$$F_{\text{UZ}} = \left( \frac{p_{\text{UZ}} V \beta_e \pi}{2\lambda} \right) \left( \frac{5\rho_c - 2\rho_e}{2\rho_c + \rho_e} - \frac{\beta_c}{\beta_e} \right) \sin\left( \frac{4\pi x_v}{\lambda} \right), \quad (3)$$

kjer je  $p_{\text{UZ}}$  zvočni tlak,  $\beta_e$  stisljivost medija,  $\beta_c$  stisljivost celice,  $\rho_e$  gostota medija,  $\rho_c$  gostota celice,  $\lambda$  valovna dolžina in  $x_v$  razdaja do vozlišča.

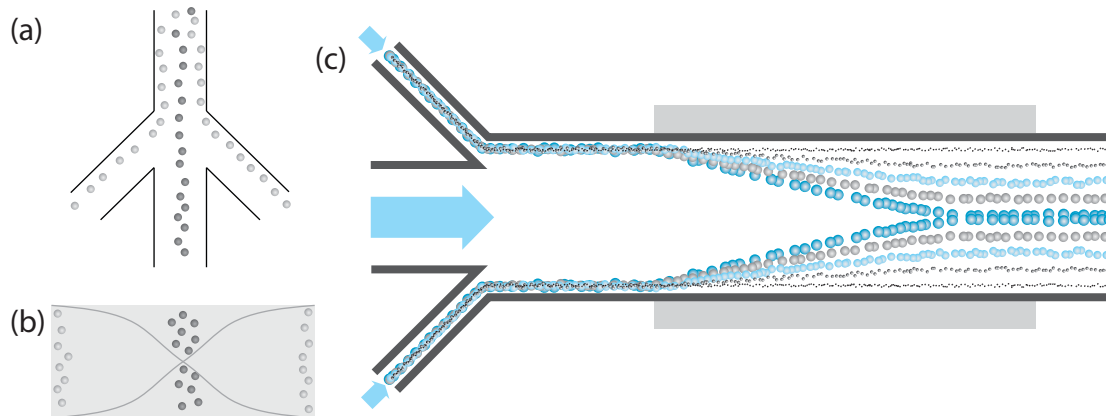
V večini primerov je izraz v drugem oklepaju v enačbi (3) pozitiven in celice se zbirajo na področju vozlišč, v nasprotnem primeru pa se celice zbirajo na področjih najvišje akustične sile.  $F_{\text{UZ}}$  je proporcionalna prostornini (pri sferičnih telesih sorazmerna z  $R^3$ , ker je  $V = 4/3\pi R^3$ ), zato velikost celic močno vpliva na zmožnosti njihove manipulacije. Tako je bistveno lažje ločevanje celic po velikosti kot po gostoti in stisljivosti.

#### 1. 1. 4. 1. Naprave za ultrazvočno ločevanje celic

Frekvenco ultrazvočnega valovanja izberemo tako, da je širina kanala z medijem mnogokratnik valovne dolžine, s čimer ustvarimo stoječe valovanje. Večina celic ima večjo gostoto kot medij, zato se zbirajo na področju vozlišč valovanja. Tako lahko ločujemo eritrocite od lipidnih veziklov, ki imajo manjšo gostoto (Laurell *et al.* 2007). S tem pristopom lahko ločujemo celice tako glede na predznak akustične sile (slika 9a,b) kot tudi glede na njeno velikost (slika 9c) (Kapishnikov *et al.* 2006, Petersson *et al.* 2007). V primeru ločevanja po velikosti akustične sile se celice v pretočni komori le pomaknejo proti vozliščem valovanja, pomik pa je odvisen od velikosti sile. Komora ima več izhodov, ki zbirajo celice glede na njihovo oddaljenost od vozlišč oziroma ravnine, v kateri se le-ta nahajajo. Ločevanje glede na velikost sile celic ima v primerjavi z metodo ločevanja glede na predznak sile načeloma večjo ločljivost, a je ta dosegljiva le ob predhodni optimizaciji hitrosti pretoka in jakosti valovanja.

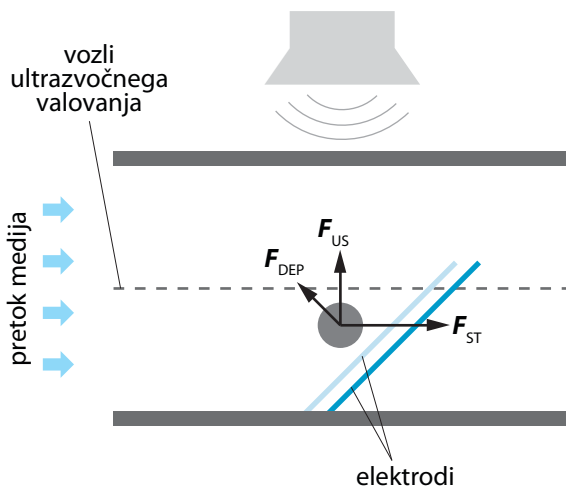


Slika 8: Izboljšana verzija kontinuiranega magnetnega ločevanja v mikropretočni komori. (a) Celična suspenzija vstopa ob zgornjem levem robu mikrokanala, magnetno polje celice med potovanjem vleče v smeri pravokotno na gibanje, na koncu kanala pa dosežejo enega izmed osmih izhodnih kanalov. (b) Prečni prezek naprave pravokotno na smer pretoka medija. S takšno komoro teoretično lahko ločujemo tudi več tipov magnetnih delcev naenkrat. Prirejeno po (Schneider *et al.* 2010).



Slika 9: Ultrazvočno ločevanje v mikropretočnih komorah. (a), (b): ločevanje celic v dve skupini na podlagi gostote; (c) razvrščanje celic po velikosti (ang. free flow acoustophoresis). Prirejeno po (Gossett *et al.* 2010).

12



Slika 10: Kombinacija ultrazvoka in dielektroforeze. Na celice delujejo tri glavne sile, ki jih lahko posamično spreminjamo: dielektroforetska, ultrazvočna in vlečna sila toka tekočine. Prirejeno po (Wiklund *et al.* 2006).

Ultrazvočno manipulacijo lahko kombiniramo z dielektroforezo v pretočni komori, v katero vgradimo piezoelektrični ultrazvočni oddajnik in elektrode za ustvarjanje dielektroforetske sile (Wiklund *et al.* 2006). Ultrazvok ima velik doseg in se uporablja za poravnavo in fokusiranje celic, dielektroforeza pa za njihovo razvrščanje, zgoščevanje in/ali ločevanje. V primeru na sliki 10 na celico poleg vlečne sile, ki jo ustvarja pretok, delujeta še akustična in dielektroforetska sila. Ob izklopu ultrazvoka se celice premikajo predvsem v smeri dielektroforetske sile, ob izklopu električnega polja pa v smeri akustične sile.

Ultrazvok se lahko uporablja tudi za zamenjavo medija, v katerem so celice suspendirane (Hawkes *et al.* 2004). Komora je zgrajena tako, da ima dva vhoda in dva izhoda, skozi katera tečeta dva različna medija, v notranjosti komore pa se zaradi laminarnega pretoka medija zelo malo mešata. Z ultrazvokom ustvarimo silo na celice, ki jih premakne iz prvotnega medija v nov medij (slika 11). Naprava omogoča kontinuiran pretok do 10 ml/min, celice pa se zadržujejo v področju velike ultrazvočne sile nanje največ nekaj sekund, kar je mnogo manj kot pri klasičnem postopku zamenjave medija s centrifugiranjem. Slabost pristopa je nižja učinkovitost oziroma izguba, saj le del celic preide v nov medij.

### 1.1.4.2. Prednosti in slabosti ultrazvočnega ločevanja celic

Prednost ultrazvočnega ločevanja je ločitev oddajnika od tekočine, zato pri izbiri materialov vira ultrazvočnega valovanja nismo omejeni. Poleg tega koncentracije ionov in površinski naboji ne vplivajo na ločevanje celic, akustična sila, ki zadošča za premikanje celic, pa je dovolj šibka, da jih ne poškoduje. Slabost naprave je segrevanje, saj se lahko zaradi absorpcije ultrazvoka temperatura celične suspenzije v komori poveča tudi za 10 °C, zato je pri občutljivih celicah potrebno uporabiti ustrezno šibkejši ultrazvočni vir (Tsutsui and Ho 2009).

### 1.1.5. Električne metode ločevanja

Na telesa z električnim nabojem delujejo v električnem polju sile, ki posledično lahko povzročijo premikanje teles oz. elektrokinetiko. Za ločevanje majhnih teles lahko uporabimo elektroforezo, elektroosmozo ali dielektroforezo.

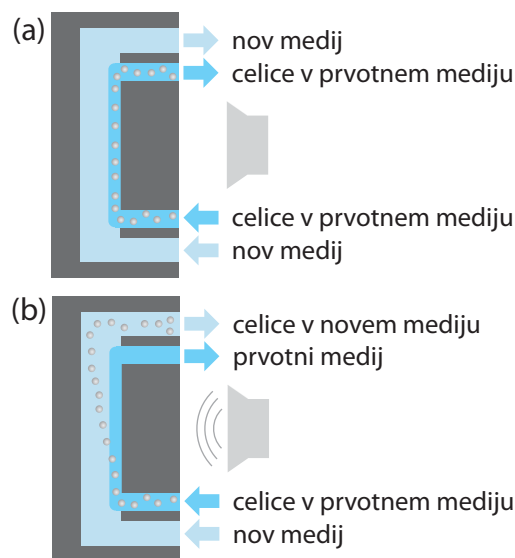
#### 1.1.5.1. Elektroforeza

Na nabita telesa deluje Coulombova sila. V enosmernem polju se telesa gibljejo proti pozitivnemu oziroma proti negativnemu polu, kar imenujemo elektroforeza. Elektroforetska sila na delec je ploskovni integral površinske gostota naboja  $\sigma_s$  in jakosti električnega polja  $E$  po površini telesa:

$$F_{EP} = \iint_S \sigma_s E dS. \quad (4)$$

Elektroforetsko silo je neposredno težko izmeriti, zato se kot lastnost telesa običajno meri elektroforetska mobilnost  $\mu_e = F_{EP}/(k_\mu E)$ , kjer je  $k_\mu$  koeficient upora. (Hsu *et al.* 2007).

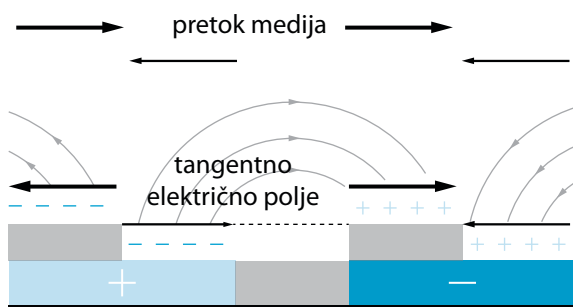
Elektroforeza je primerna metoda za ločevanje večjih električno polarnih molekul, kot na primer DNA in proteinov, za ločevanje celic pa ne (Wong *et al.* 2004, Voldman 2006). Molekule imajo namreč natančno definirane lege nabojev in se med seboj razlikujejo v elektroforetski mobilnosti, celice pa ne. Zato elektroforetsko ločevanje celic praviloma ni učinkovito in se uporablja le kot pomožna metoda pri aktivnih postopkih ločevanja, npr. v pretočni citometriji, kjer s kratkim elektroforetskim pulzom usmerimo celico proti ustreznemu izhodu.



Slika 11: Shema komore za ultrazvočno zamenjavo medija. a) Brez ultrazvoka celice potujejo v prvotnem mediju, saj se zaradi laminarnega pretoka medija skoraj ne mešata. b) Ultrazvok povzroči premik celic iz toka prvotnega medija v tok novega medija. Prirejeno po (Hawkes *et al.* 2004).

### 1. 1. 5. 2. Elektroosmoza

Tesno povezana z elektroforezo je elektroosmoza, kjer nabita telesa prehajajo skozi polprepustno membrano. Ioni se gibljejo na površini v t. i. dvojni plasti zaradi elektrokemičnega gradienta, v tangentsni smeri glede na elektrode. Zaradi viskoznosti ioni povzročijo gibanje medija, končni učinek pa je gibanje celotne tekočine skupaj s celicami. V primerjavi z dielektroforezo, ki jo bomo obravnavali nekoliko nižje, ima elektroosmoza relativno velik doseg, zato je uporabna za premikanje teles skozi naprave tipa *lab-on-a-chip*, kakršno prikazuje slika 12. Elektroosmoza deluje tako v enosmernem kot tudi v nehomogenem izmeničnem električnem polju (Kuo and Liu 2009).



Slika 12: Elektroosmotski tok tekočine, ki ga povzroča električno polje. Prirejeno po (Kuo and Liu 2009).

za njihovo prečrpavanje (Andersson and Van den Berg 2003).

V mikropretočnih napravah je vpliv elektroosmoze nekoliko zmanjšan v primerjavi z večjimi napravami za elektroforezo, zato je občutljivost na razlike v elektroforetski mobilnosti večja, z merjenjem elektroforetske mobilnosti posameznih celic pa lahko določimo njihove lastnosti, kot sta faza celičnega cikla ali apoptoza (Akagi and Ichiki 2008).

### 1. 1. 5. 3. Dielektroforeza

V nehomogenem izmeničnem polju pride do polarizacije celic in pojavi se dielektroforetska sila nanje. Sila je odvisna od električnih in geometrijskih lastnosti celic, zato je uporabna za ločevanje celic, ki se po teh lastnostih dovolj razlikujejo. Na tem pojavu temeljita tudi postopek in komora za ločevanje celic, razvita v okviru te disertacije, zato bo pojav dielektroforeze podrobno opisan in obravnavan v samostojnem podpoglavju 1.2.

### 1. 1. 5. 4. Izoelektrično fokusiranje

Metoda ločevanja, pri kateri velikost teles ne vpliva na ločevanje, se imenuje izoelektrično fokusiranje (Albrecht *et al.* 2007). Ločevanje poteka glede na naboj teles v komori, kjer je prisotno električno polje, in glede na gradient pH. Vsak delec ima svoj izoelektrični nivo – vrednost pH, kjer nima električnega naboja. Če se nahaja v delu komore, kjer se pH razlikuje od njegovega izoelektričnega nivoja, se pojavi naboj in elektroforetska sila premakne delec proti mestu, kjer je pH enak izoelektričnemu nivoju delca. Metoda je primerna za ločevanje molekul, poskušali so tudi z ločevanjem bakterij, za ločevanje evkariotskih celic pa se metoda ni izkazala za primerno (Pamme 2007).

### 1.1.5.5. Prednosti in slabosti električnega ločevanja celic

Električne metode načeloma omogočajo neinvazivno brezkontaktno ločevanje celic glede na njihove lastnosti brez uporabe markerjev, a se v praksi kot uporabna med temi metodami izkaže predvsem dielektroforeza. Njena prednost je možnost ločevanja glede na razlike tako v električnih (prevodnost in dielektričnost) kot geometrijskih lastnostih celic (predvsem njihovi velikosti). Dielektroforetske metode odlikuje precej visoka zmogljivost ločevanja, saj lahko kontinuirano ločujemo do nekaj tisoč celic na minuto (Doh and Cho 2005). Občutljivost na različne električne lastnosti lahko povečamo, če zmanjšamo vpliv velikosti, kar lahko dosežemo z uporabo metode dielektroforetskega ločevanja v pretočni komori (DEP-FFF). Slabost dielektroforeze pa je uporaba nizkoprevodnega medija; ta je potrebna za zadostno polarizacijo celic, izognemo pa se tudi segrevanju, vendar je zaradi nefiziološke sestave (predvsem nizkih ionskih koncentracij) takšnih medijev preživetje evkariotskih celic v njih omejeno na največ nekaj deset minut. Poleg tega lahko tudi električno polje, s katerim ustvarimo dielektroforetsko silo, poškoduje celice, zato to polje ne sme biti premočno. Ker so elektrode v komori v neposrednem stiku z medijem, jih je potrebno zgraditi iz materiala, ki se v mediju ne raztaplja in ne korodira, na primer iz zlata ali platine.

15

### 1.1.6. Ostale sile na celico v suspenziji

Pri vseh metodah ločevanja so celice suspendirane v tekočini, zato na njih vselej delujeta gravitacijska in vzgonska sila, pri gibanju tekočine pa še viskozna sila. Brownovo naključno gibanje je pri telesih, katerih velikost presega nekaj mikrometrov, že zanemarljivo.

V mikroskopskem svetu so razmerja med silami drugačna kot v makroskopskem, saj je površina telesa sorazmerna kvadratu ( $s^2$ ), prostornina pa tretji potenci ( $s^3$ ) njegove velikosti ( $s$ ). Skaliranje nekaterih fizikalnih količin prikazuje tabela 1. Pri majhnih telesih imajo tako sile, ki delujejo na prostornino, praviloma manjši vpliv kot sile, ki delujejo na površino. Gravitacija in vztrajnost ( $s^3$ ) sta denimo manj pomembni od površinske napetosti ( $s^1$ ), pretok tekočine skozi ozek kanal pa zahteva večjo tlačno razliko kot pretok skozi širši kanal ( $s^4$ ).

fizikalna količina	skaliranje
dolžina	$s^1$
površina	$s^2$
prostornina	$s^3$
prostornina/površina	$s^1$
površinska napetost	$s^1$
masa	$s^3$
elektrostatična sila	$s^2$
magnetna sila	$s^3$
gravitacijska sila	$s^3$
električna upornost	$s^{-1}$
električna napetost	$s^1$
električni tok	$s^2$
hidravlična upornost	$s^{-3}$
Reynoldsovo število	$s^2$
tlačna razlika v cevi	$s^{-3}$
prostorninski pretok	$s^4$
disipacija toplote	$s^2$

Tabela 1: Skaliranje nekaterih fizikalnih količin (Wautelet 2001).

---

### 1. 1. 6. 1. Gravitacija in sila vzgona

Gravitacijsko in vzgonsko silo določa enačba

$$\mathbf{F}_{SED} = \mathbf{F}_G - \mathbf{F}_V = V(\rho_c - \rho_e)\mathbf{g}. \quad (5)$$

Če je gostota celice večja od gostote medija, bo rezultanta sil delovala navzdol in celica bo potonila na dno (sedimentacija), v nasprotnem primeru pa bo celica splavala na površino. Najpogosteje je gostota celic malo večja od gostote medija, zato se celice počasi usedajo na dno.

### 1. 1. 6. 2. Sile pri gibanju tekočine

16

Pretok tekočine opisujeta Navier-Stokesov zakon za nestisljive kapljevine

$$\rho_e \left( \frac{\partial \mathbf{u}}{\partial t} + \mathbf{u} \cdot \nabla \mathbf{u} \right) = -\nabla p + \rho_e \mathbf{g} + \mu \nabla^2 \mathbf{u} \quad (6)$$

in kontinuitetna enačba

$$\nabla \cdot \mathbf{u} = 0, \quad (7)$$

kjer je  $\mathbf{u}$  hitrost pretoka,  $p$  tlak in  $\mu$  viskoznost kapljevine.

V mikropretočnih sistemih, kjer je hitrost praviloma manjša od 100  $\mu\text{m/s}$ , višina kanala pa je reda 100  $\mu\text{m}$ , lahko ocenimo, da je Reynoldsovo število

$$N_{\text{Re}} = \frac{\rho_e u Z}{\mu} \quad (8)$$

manjše od 0.1, kar pomeni, da je pretok zagotovo laminaren (Castellanos *et al.* 2003).

Enačbi (6) in (7) lahko rešimo za pretok medija skozi kanal širine  $Y$  in višine  $Z$ , pri čemer privzamemo  $Y \gg Z$ . Hitrost pretoka je parabolična funkcija

$$u = \frac{6u_0}{Z} z \left( 1 - \frac{z}{Z} \right), \quad (9)$$

kjer je pri volumskem pretoku  $\Phi$  povprečna hitrost pretoka  $u_0 = \Phi/(ZY)$  (Gascoyne 2009).

Pri gibanju telesa skozi tekočino se pojavi viskozna upornost. Če na telo z maso  $m_c$  deluje sila  $F$ , lahko po 2. Newtonovem zakonu zapišemo enačbo

$$m_c \frac{d\mathbf{u}_c}{dt} = \mathbf{F} + \oint \left[ -p\mathbf{I} + \mu \left( \nabla \mathbf{u} + (\nabla \mathbf{u})^T \right) \right] \cdot n dS, \quad (10)$$

kjer je  $\mathbf{u}_c$  hitrost telesa. Poleg translacijskega gibanja se zaradi strižnih sil lahko pojavi tudi rotacija telesa s kotno hitrostjo  $\Omega_c$

$$J \frac{d\Omega_c}{dt} = \oint (\mathbf{x} - \mathbf{x}_c) \times \left[ -p\mathbf{I} + \mu \left( \nabla \mathbf{u} + (\nabla \mathbf{u})^T \right) \right] \cdot n dS. \quad (11)$$

Silo, predstavljeno v ploskovnem integralu v enačbi (10), lahko razstavimo na vodoravno komponento v smeri pretoka (smer osi  $x$ ) in navpično komponento (smer osi  $z$ ), vodoravno komponento v smeri prečno na pretok (smer osi  $y$ ) pa lahko v kanalu, katerega širina je mnogo večja od višine, zanemarimo (Joseph and Ocando 2002, Jamnani 2009). Obe upoštevani komponenti sta sestavljeni iz viskoznega in tlačnega dela:

$$F e_x = \oint \left[ \rho_e \mu \frac{\partial u}{\partial n} e_z - p e_x \right] dS \quad (12)$$

$$F e_z = \oint \left[ \rho_e \mu \frac{\partial u}{\partial n} e_x + p e_z \right] dS \quad (13)$$

Če je  $R \ll Z$  in je telo dovolj oddaljeno od stene kanala, lahko rotacijski izraz, podan z enačbo (11), zanemarimo, enačba pa se poenostavi v

$$m_c \frac{du_c}{dt} = F + k_\mu (u_e - u_c) \quad (14)$$

kjer je za sferično telo  $k_\mu = 6\pi\mu R$ . Pri začetnem pogoju  $u_c(0) = 0$  se rešitev te enačbe glasi

$$u_c(t) = \left( \frac{F}{k_\mu} + u \right) \left( 1 - e^{-t \frac{k_\mu}{m_c}} \right); t \geq 0. \quad (15)$$

Ko prehodni pojav mine, se telo giblje s hitrostjo

$$u_c = \frac{F}{k_\mu} + u. \quad (16)$$

Karakteristična konstanta  $m_c/k_\mu$  je za telo velikosti celice velikostnega reda  $10^{-6}$  s, zato je prehodni pojav izredno hiter, nato pa se celica giblje s hitrostjo medija.

Oddaljenost od dna (vrednost  $z$ ) določa ravnotežje sil

$$F_G + F_V + F_{HL} + F_{ZUN} = 0, \quad (17)$$

kjer je  $F_G$  gravitacijska sila,  $F_V$  vzgonska sila,  $F_{HL}$  hidrodinamična dvižna sila,  $F_{ZUN}$  pa zunanja sila (na primer dielektroforetska sila  $F_{DEF}$ ). Velikost hidrodinamične dvižne sile lahko ocenimo z enačbo

$$F_{HL} = -\frac{6\mu u_0 R^3 k_g(u_c)}{Z z}, \quad (18)$$

kjer je  $k_g(u_c)$  hidrodinamična geometrijska funkcija, ki je odvisna od hitrosti celice v kanalu in zavzame vrednosti v območju med 0 in 1; npr. za celice DS19 je bila izmerjena maksimalna vrednost 0.11 (Gascoyne 2009).

Z enačbami (9), (17) in (18) lahko ocenimo tirnico potovanja celice skozi kanal mikropretočne komore, iz meritev časa prehoda celice skozi kanal pa lahko z izračunom ocenimo vrednosti fizikalnih lastnosti celice, ki nastopajo v teh enačbah.

Če se celice gibljejo blizu dna kanala, na njih delujejo močne strižne sile, ki povzročijo njihovo rotacijo (kotaljenje), lahko pa tudi deformacijo. Tirnice takšnih celic je potrebno izračunati numerično, kar je računsko zelo zapleteno; razvitih je bilo več enačb, ki opisujejo gibanje kroglice v laminarnem pretoku, vse pa imajo omejeno območje veljavnosti (Cherukat *et al.* 1999, Joseph and Ocando 2002).

## 1.2. Dielektroforeza

18

Dielektroforezo kot gibanje električno nevtralnih polarizabilnih teles v nehomogenem električnem polju sta prva razložila Pohl in Crane (Pohl and Crane 1971), ki sta jo tudi poimenovala. Gibanje teles v tekočini v prisotnosti električnega polja so sicer opazovali že pred več kot stoletjem, pred približno tremi desetletji pa se je začelo to področje intenzivneje razvijati. Iskanje znanstvenih člankov s ključno besedo »dielektroforeza« v bazi *Web of Science* tako pove, da je bilo leta 2000 objavljenih 25, leta 2011 pa že 279 takšnih člankov.

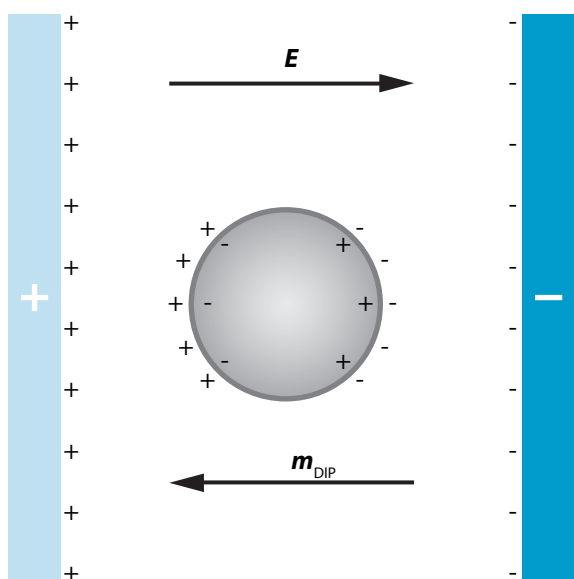
### 1.2.1. Model induciranega dipola

Vzemimo dve točkasti telesi z nabojem. Če sta naboja enakega predznaka, je sila med telesoma odbojna, v nasprotnem primeru pa privlačna. Enačba, ki določa silo med njima, je:

$$F = \frac{Q_1 \cdot Q_2}{4 \cdot \pi \cdot \epsilon_0 \cdot d_t^2} x, \quad (19)$$

kjer je  $Q$  naboj,  $\epsilon_0$  dielektričnost vakuumu,  $d_t$  razdalja med delcema in  $x$  smerni vektor. Če je delcev veliko, je izračunavanje sile med posameznimi delci nepraktično, zato vpeljemo pojem električnega polja  $E$ . Sila na nabit delec v električnem polju je enaka

$$F = Q \cdot E. \quad (20)$$



Slika 13: Razporeditev naboja na meji med polarizabilnim telesom in elektrolitom. V prikazanem primeru je telo manj polarizabilno kot medij.

Ko postavimo polarizabilno telo v električno polje, se naboj znotraj telesa prerazporedi, kot prikazuje slika 13. Zmožnost premikanja naboja skozi telo je določena s prevodnostjo snovi, iz katere je telo zgrajeno, zmožnost shranjevanja naboja v telesu pa z dielektričnostjo te snovi.

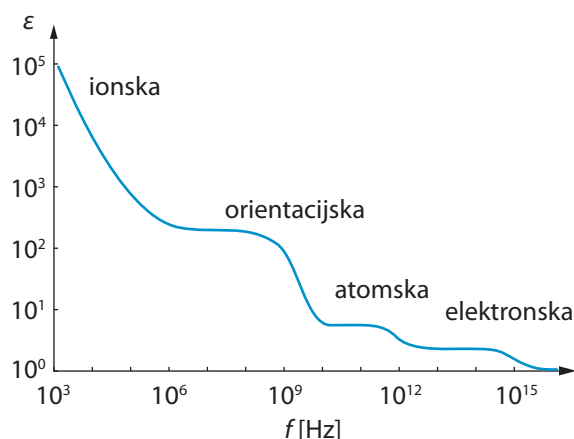
Polarizacija je proces prerazporeditve naboja v električnem polju. Prerazporeditev naboja traja nekaj časa, prav tako pa se naboj po tem, ko polje izgine, nekaj časa vrača v prvotno stanje. Prerazporeditev naboja v telesu imenujemo nastanek induciranega dipola, do njega pa pride tako pri majhnih kot pri makroskopskih telesih.



Povprečna polarizacija molekule je zmnožek njene polarizabilnosti in električnega polja, ki deluje nanjo (Hughes 2003, Morgan and Green 2003). Polarizabilnost celotnega telesa je vsota polarizabilnosti posameznih molekul, ki ga sestavljajo. Polarizacijo lahko razdelimo na elektronsko, atomsko, orientacijsko in ionsko, poleg tega pa lahko v telesih, zgrajenih iz več različnih področij, polarizacija nastane tudi na stičnih ploskvah med temi področji (slika 14). Znotraj atoma, na katerega ne deluje zunanje električno polje, sta težišči pozitivnega in negativnega naboja v povprečju na istem mestu, zato atom navzven deluje kot nevtralno telo. Elektronska polarizacija se pojavi ob prisotnosti električnega polja, ko se elektronski oblak izmakne iz skupnega težišča, pri atomski polarizaciji se spremeni povprečen položaj celotnega atoma v molekuli, orientacijska polarizacija pa je posledica poravnave permanentnih dipolov v polarnih dielektrikih. Ionska polarizacija nastane zaradi gibanja različno nabitih nosilcev naboja (najpogosteje v elektrolitih), če je območje gibanja nosilcev sestavljeno iz več področij z različnimi električnimi lastnostmi, pa lahko na stičnih ploskvah med temi snovmi pride še do stične polarizacije. Stična polarizacija nastopi tudi v celicah, izpostavljenih električnemu polju, ko nosilci naboja (ioni), ki se pod vplivom polja gibljejo po prevodnem citosolu, trčijo ob zelo nizko prevodno membrano, na takšni polarizaciji pa temelji tudi manipulacija celic z dielektroforezo.

Pri nizkih frekvencah zunanega izmeničnega polja imajo inducirani dipoli dovolj časa, da s svojim nastajanjem in izginjanjem sledijo polju. Z naraščanjem frekvence polja pa nastajanje in izginjanje dipola vse bolj zaostaja za spremembami samega polja, kar zaznamo kot upad polarizacije – snovno (Debye-jevo) relaksacijo. Ta nastopi v več korakih. Ionska polarizacija začne izrazito upadati že na področju kHz, saj ioni ne morejo več dovolj hitro spreminjati smeri gibanja, kar se kaže kot upad efektivne dielektričnosti ionske raztopine proti vrednosti dielektričnosti vode. Na področju med nekaj sto MHz in nekaj GHz spremembam polja postopoma preneha slediti tudi orientacija molekul vode, kar se kaže v dodatnem upadu dielektričnosti. Pri še višjih frekvencah upade še atomska in nato še elektronska polarizacija, s čimer se dielektričnost snovi izenači z dielektričnostjo vakuumu. Opisano frekvenčno odvisnost polarizacije in dielektričnosti ionski raztopin povzema slika 14. Velja omeniti, da izkazuje orientacijsko polarizacijo tudi lipidni dvosloj in s tem celična membrana, zaradi večjih dimenzij pa polarizacija molekul lipidov prične upadati že na frekvenčnem področju nekaj deset MHz (Klößen *et al.* 1996, Kotnik and Miklavčič 2000a).

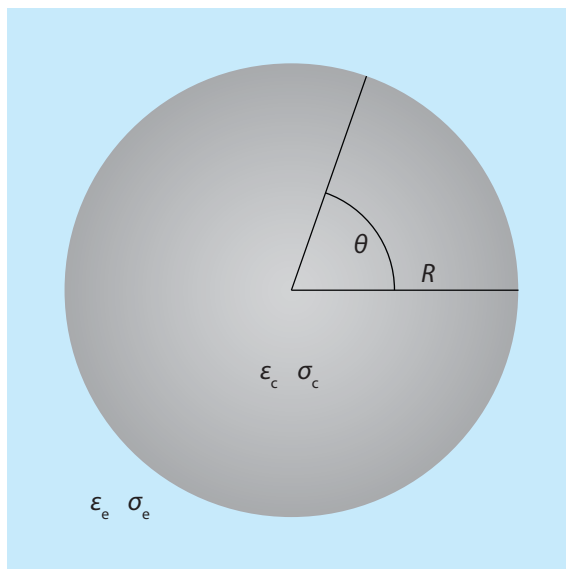
Tudi stična polarizacija je frekvenčno odvisna, in sicer prične upadati na področju nekaj sto kHz, kar imenujemo strukturna (Maxwell-Wagnerjeva) relaksacija. Na področju GHz se to upadanje ustavi, a je polarizacija na tem t.i. visokofrekvenčnem platoju več kot stokrat šibkejša kot pri nizkih frekvencah (Kotnik and Miklavčič 2000a, 2000b).



Slika 14: Vrste polarizacije vodne raztopine ionov in njihov učinek na frekvenčno odvisnost efektivne dielektričnosti te raztopine. Prirejeno po (Gabriel *et al.* 1996, Buchner *et al.* 1999).

Celico v raztopini lahko poenostavljeno modeliramo kot dielektrično kroglico, ki se nahaja v prevodnem tekočem mediju (slika 15). Natančneje pa velja, da sta kroglica in raztopina oba izgubna dielektrika – da imata torej oba določeno električno prevodnost  $\sigma$  in dielektričnost  $\varepsilon$ , ki ju lahko skupaj podamo kot kompleksno dielektričnost,  $\varepsilon' = \varepsilon + \sigma \cdot (j\omega)^{-1}$ . V električnem polju se naboj nabira na meji kroglice in medija.

Zaradi razlike med gostoto pozitivnega in negativnega naboja ob membrani se ta polarizira. Za kroglo s polmerom  $R$  in kompleksno dielektričnostjo  $\varepsilon_c$  lahko električni potencial v njej ( $V_c$ ) in njeni okolici ( $V_e$ ) izračunamo kot rešitev Laplaceve enačbe v sferičnih koordinatah  $(r, \theta, \varphi)$ , ki se glasi



Slika 15: Model celice kot homogene kroglice.

$$V_c(r, \theta, \varphi) = V_c(r, \theta) = \left( \frac{3\varepsilon_e'}{\varepsilon_c' + 2\varepsilon_e'} \right) ER \cos \theta, \quad (21)$$

$$V_e(r, \theta, \varphi) = V_e(r, \theta) = \left( \left( \frac{\varepsilon_c' - \varepsilon_e'}{\varepsilon_c' + 2\varepsilon_e'} \right) \frac{R^3}{r^3} - 1 \right) ER \cos \theta.$$

Potencial zunaj kroglice je torej superpozicija zunanega električnega polja in prispevka dipolnega momenta

$$m_{\text{dip}} = 4\pi\varepsilon_e \left( \frac{\varepsilon_c' - \varepsilon_e'}{\varepsilon_c' + 2\varepsilon_e'} \right) R^3 E. \quad (22)$$

Izraz v oklepaju imenujemo Clausius-Mossottijev faktor

$$f_{\text{CM}}(\omega) = \frac{\varepsilon_c' - \varepsilon_e'}{\varepsilon_c' + 2\varepsilon_e'} = \frac{(\varepsilon_c - \varepsilon_e)(\varepsilon_c + 2\varepsilon_e)\omega^2 + (\sigma_c - \sigma_e)(\sigma_c + 2\sigma_e)}{(\varepsilon_c + 2\varepsilon_e)^2\omega^2 + (\sigma_c + 2\sigma_e)^2} + j \frac{(\sigma_c - \sigma_e)(\varepsilon_c + 2\varepsilon_e)\omega^2 - (\varepsilon_c - \varepsilon_e)(\sigma_c + 2\sigma_e)}{(\varepsilon_c + 2\varepsilon_e)^2\omega^2 + (\sigma_c + 2\sigma_e)^2}. \quad (23)$$

Ta faktor tako podaja frekvenčno odvisnost polarizacije kroglice, katere dipolni moment lahko krajše zapišemo v obliki

$$m_{\text{dip}} = 4\pi R^3 f_{\text{CM}} E. \quad (24)$$

Če sta medij in kroglica enako polarizabilna, je njena notranjost električno nevtralna. Če je kroglica bolj polarizabilna od medija, se v njeni notranjosti pojavi presežek (pozitivnega) naboja, dipolni moment pa je soursmerjen z vektorjem jakosti električnega polja. Če je kroglica manj polarizabilna, pa se v njeni notranjosti pojavi primanjkljaj naboja, moment pa je usmerjen nasprotno od jakosti polja. Clausius-Mossottijev faktor ima nizkofrekvenčno in visokofrekvenčno limito

$$\lim_{\omega \rightarrow 0} f_{\text{CM}} = \frac{\sigma_c - \sigma_e}{\sigma_c + 2\sigma_e}, \quad (25)$$

$$\lim_{\omega \rightarrow \infty} f_{\text{CM}} = \frac{\varepsilon_c - \varepsilon_e}{\varepsilon_c + 2\varepsilon_e}.$$

Primer frekvenčne odvisnosti Clausius-Mossottijevega faktorja homogene kroglice prikazuje slika 16. Realni del tega faktorja, frekvenčni odvisnosti katerega pravimo tudi dielektroforetski spekter, lahko zavzame vrednosti med -0.5 in +1, imaginarni del pa med -0.75 in +0.75.

Frekvenci polja, pri kateri ima  $\text{Re}[f_{\text{CM}}]$  prvo ničlo, pravimo mejna frekvenca dielektroforetskega spektra ( $f_m$ ), podana pa je z izrazom

$$f_m = \frac{1}{2\pi} \frac{\sigma_c + 2\sigma_e}{\varepsilon_c + 2\varepsilon_e}. \quad (26)$$

Dejanske biološke celice vsebujejo mnogo različnih struktur. Z električnega vidika je zelo pomembna celična membrana, ki ima v primerjavi z notranjostjo celice (citosolom) precej nižjo električno prevodnost, zato lahko membrano v približku obravnavamo kot dielektrik, citosol pa kot prevodnik. Model celice kot homogene kroglice, ki je zelo poenostavljen in neustrezen za natančnejše preučevanje dielektroforeze, je zato smiselno razširiti v kroglico s homogeno prevodno notranjostjo, obdano s tanko dielektrično lupino (Irimajiri *et al.* 1979).

Če ima celica polmer  $R$  in njena lupina debelino  $D_m$ , je polmer njene prevodne notranjosti ( $R - D_m$ ). Označimo prevodnost te notranjosti  $\sigma_i$ , njeno dielektričnost  $\varepsilon_i$  (in posledično kompleksno dielektričnost  $\varepsilon'_i$ ), lupini membrani pa podobno pripišimo parametre  $\sigma_m$ ,  $\varepsilon_m$  in  $\varepsilon'_m$  (slika 17) Nadomestno (efektivno) kompleksno dielektričnost takšne kroglice z lupino podaja izraz (Morgan and Green 2003)

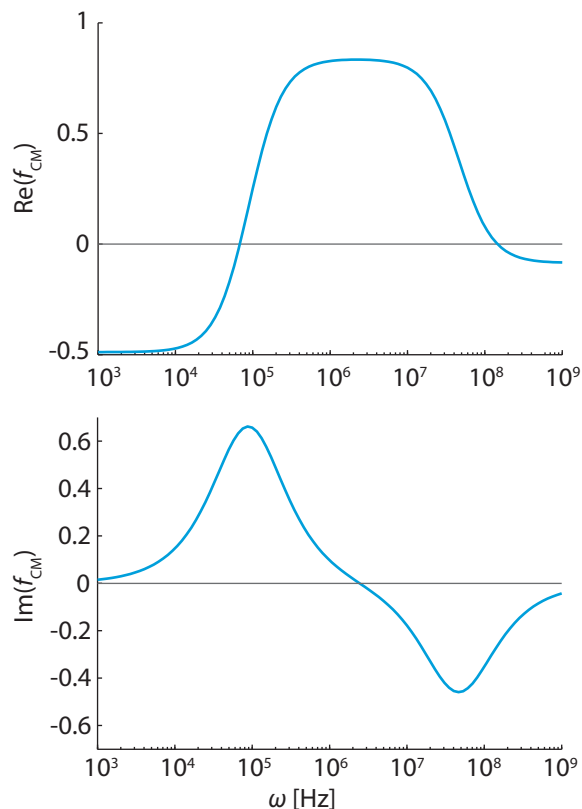
$$\varepsilon_{\text{ef}}' = \varepsilon_m' \frac{\left(\frac{R}{R - D_m}\right)^3 + 2 \frac{\varepsilon_i' - \varepsilon_m'}{\varepsilon_i' + 2\varepsilon_m'}}{\left(\frac{R}{R - D_m}\right)^3 - \frac{\varepsilon_i' - \varepsilon_m'}{\varepsilon_i' + 2\varepsilon_m'}}. \quad (26)$$

Iz nadomestne kompleksne dielektričnosti lahko po enačbi (23) izračunamo  $f_{\text{CM}}$  celotne kroglice z lupino v mediju, tako da namesto  $\varepsilon_c'$  uporabimo  $\varepsilon_{\text{ef}}'$ :

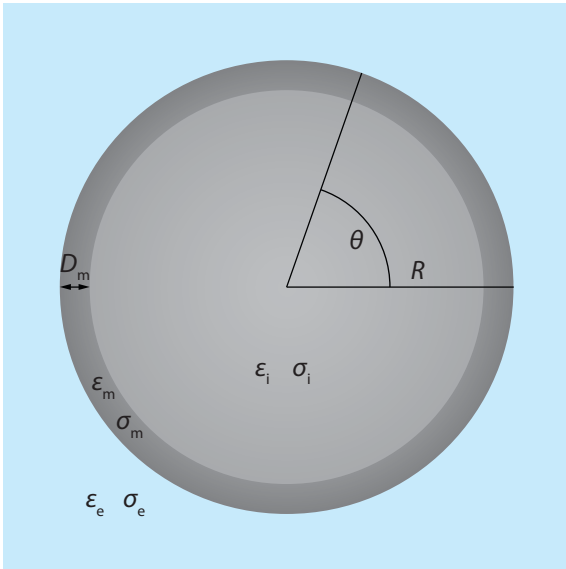
$$f_{\text{CM}}(\omega) = \frac{\varepsilon_{\text{ef}}' - \varepsilon_e'}{\varepsilon_{\text{ef}}' + 2\varepsilon_e'}, \quad (28)$$

iz česar sledi še

$$m_{\text{dip}} = 4\pi\varepsilon_e \left( \frac{\varepsilon_{\text{ef}}' - \varepsilon_e'}{\varepsilon_{\text{ef}}' + 2\varepsilon_e'} \right) R^3 E. \quad (29)$$



Slika 16: Frekvenčni odvisnosti realne in imaginarne komponente Clausius-Mossottijevega faktorja.



Slika 17: Model celice kot kroglice z lupino

Model lahko še razširimo na več koncentričnih lupin, ki lahko predstavljajo jedro membrano ali celično steno; najprej izračunamo nadomestno dielektričnost sfer najgloblje v notranjosti, nato pa nadaljujemo proti zunanosti (Morgan and Green 2003).

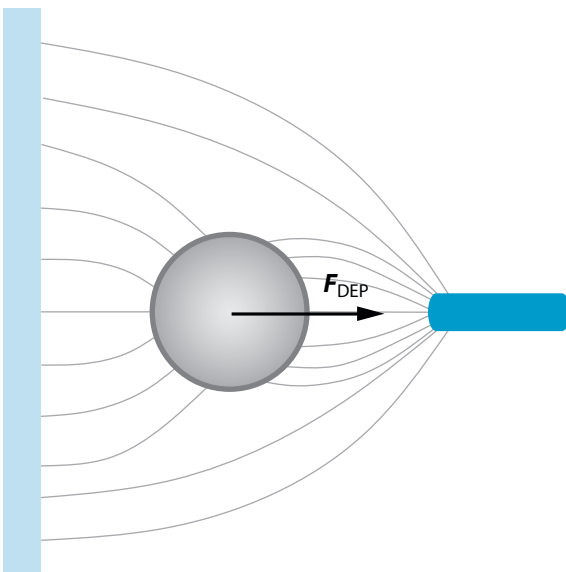
Z dielektroforezo lahko premikamo tudi telesa nesferičnih oblik (bakterije, nanocevke, ipd). Za analitični izračun njihovega dipolnega momenta jih opišemo kot cilindre, sferoide ali elipsoide, za še bolj zapletene oblike pa je potrebno numerično računanje. Pri zelo nehomogenih poljih je za zanesljive izračune dielektroforetske sile potrebno celico modelirati kot multipol (Jones 1985).

### 1.2.1.1. Dielektroforetska sila na inducirani dipol

Dielektroforeza se pojavi, če se nevtravno polarizabilno telo nahaja v električnem polju, ki je nehomogeno po amplitudi ali fazi. Če je polje homogeno, je sila na oba konca dipola enaka, zato je vsota vseh sil enaka nič, v nehomogenem polju pa se sili na pozitivni in negativni del dipola razlikujeta, njuno rezultanto (vektorsko vsoto) pa imenujemo dielektroforetska sila (slika 18).

Ko se telo polarizira, se težišči pozitivnega in negativnega naboja, ki brez polarizacije sovpadata, razmakneta. Zato dobi telo dipolni moment  $\mathbf{m}_{\text{dip}}$ , ki ga za primer homogene kroglice določa izraz (22), za kroglico z lupino pa izraz (29).

Če je električno polje časovno spremenljivo,  $\mathbf{E}(x, y, z, t)$ , se s časom spreminjata tudi  $\mathbf{m}_{\text{dip}}$  in dielektroforetska sila na telo, ki jo podaja enačba



Slika 18: Dielektroforetska sila.

$$\mathbf{F}_{\text{DEP}}(t) = (\mathbf{m}_{\text{dip}}(t) \nabla) \mathbf{E}(x_0, y_0, z_0, t) \quad (30)$$

kjer so  $(x_0, y_0, z_0)$  koordinate dipola. Ker dejansko noben dipol ni povsem točkast, je to približek, ki velja, če se vrednost  $\mathbf{E}$  na področju dipola ne spreminja preveč; če v celotni prostornini dipola velja

$$\frac{|\mathbf{E}(x_0, y_0, z_0, t)|}{|\nabla |\mathbf{E}(x_0, y_0, z_0, t)|| \cdot l} > 20, \quad (31)$$

kjer je  $l$  razdalja med težiščema pozitivnega in negativnega naboja, je napaka takšnega približka manj kot 3 % (Liu and Bau 2004).

V izmeničnem (sinusnem) polju, ki ga lahko zapišemo kot

$$\mathbf{E}(x, y, z, t) = (E_x \mathbf{e}_x + E_y \mathbf{e}_y + E_z \mathbf{e}_z) \cos(\omega t + \varphi(x, y, z)) \quad (32)$$

določa dielektroforetsko silo izraz (Hughes 2003)

$$\mathbf{F}_{\text{DEP}}(t) = \sum_{a=x,y,z} \left( m_{\text{dip}a}(t) \frac{\partial E_a(t)}{\partial a} \mathbf{e}_a + m_{\text{dip}y}(t) \frac{\partial E_y(t)}{\partial a} \mathbf{e}_y + m_{\text{dip}z}(t) \frac{\partial E_z(t)}{\partial a} \mathbf{e}_z \right), \quad (33)$$

katerega časovno povprečje znaša

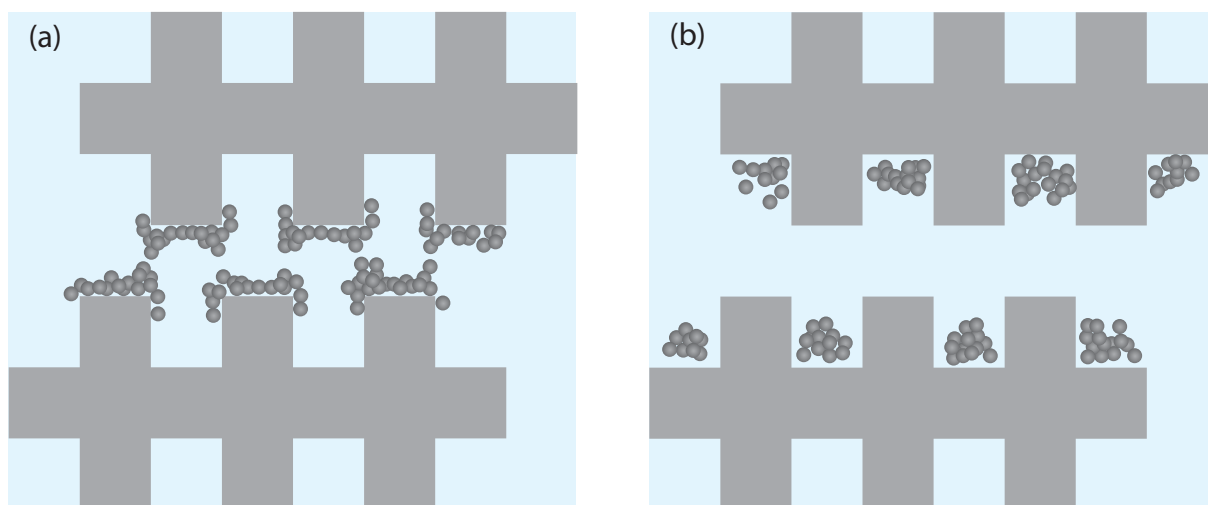
$$\langle \mathbf{F}_{\text{DEP}} \rangle = \pi \varepsilon_0 \varepsilon_e R^3 \left( \text{Re}[f_{\text{CM}}(\omega)] \nabla |\mathbf{E}^2| + 2 \text{Im}[f_{\text{CM}}(\omega)] (E_x^2 \nabla \varphi_x + E_y^2 \nabla \varphi_y + E_z^2 \nabla \varphi_z) \right). \quad (34)$$

Če ima takšno električno polje krajevno spremenljiv fazni zamik, t.j. če  $\varphi(x, y, z)$  ni konstanta, dobimo dielektroforezo potujočega vala, ki jo bomo obravnavali kasneje. Večinoma pa je v uporabi polje brez tovrstne spremenljivosti in enačba (34) se poenostavi v

$$\langle \mathbf{F}_{\text{DEP}} \rangle = \pi \varepsilon_0 \varepsilon_e R^3 \text{Re}[f_{\text{CM}}(\omega)] \nabla |\mathbf{E}^2|. \quad (35)$$

Dielektroforetska sila je torej odvisna od prostornine in polarizabilnosti telesa ter gradienta kvadrata električnega polja. Kot pove izraz,  $f_{\text{CM}}$  in s tem  $\langle F_{\text{DEP}} \rangle$  narašča z naraščanjem razlike ( $\varepsilon'_{\text{ef}} - \varepsilon'_e$ ), zato se morajo za učinkovito dielektroforezo električne lastnosti medija čim bolj razlikovati od efektivnih električnih lastnosti telesa. Zaradi tega, pa tudi v izogib segrevanju medija z električnim tokom, dielektroforezo pogosto izvajamo v nizkoprevodnih medijih.

Pozitivna dielektroforeza se pojavi, če je polarizabilnost telesa večja od polarizabilnosti medija, torej v primeru, ko je realni del  $f_{\text{CM}}$  pozitiven. Dielektroforetska sila je sousmerjena s smerjo naraščanja jakosti električnega polja. Na slika 19a se kroglice zbirajo na robovih elektrod (sivo), kjer je gradient električnega polja največji. Negativna dielektroforeza pa se pojavi, če je  $\text{Re}(f_{\text{CM}})$  negativen in telo se tedaj giblje v smeri padajoče jakosti polja, torej stran od robov elektrod (slika 19b).



Slika 19: Zbiranje celic na robovih elektrod v primeru pozitivne dielektroforeze (a) oziroma negativne dielektroforeze (b). Svetlo sivo področje predstavlja elektrode, svetlo modro pa medij med njimi.

Smer dielektroforetske sile je torej odvisna od geometrijskih in električnih lastnosti telesa. To pomeni, da deluje v splošnem na dve telesi, ki se po teh lastnostih razlikujeta, v istem mediju pri isti frekvenci električnega polja različna sila. Ta pomembna lastnost nam omogoča tudi ločevanje različnih tipov celic, če se ti tipi med seboj dovolj razlikujejo v geometrijskih in/ali električnih lastnostih. Frekvenčna odvisnost  $\text{Re}[f_{\text{CM}}]$  je pri celicah praviloma takšna, da je pri nizkih frekvencah dielektroforeza negativna, pri visokih pa pozitivna. Prehod se zgodi pri t.i. mejni frekvenci (ang. cross-over frequency), ki je prav tako odvisna od geometrijskih in električnih lastnosti telesa. Pri dveh različnih tipih celic tako na določenem frekvenčnem področju na prvi tip deluje pozitivna sila, da drugega pa negativna.

### 1.2.1.2. Navor na induciran dipol - elektrorotacija

24

Na dipol, katerega moment ni poravnan z zunanjim električnim poljem, deluje tudi navor, zaradi katerega prične dipol rotirati. Navor na dipol je podan z vektorskim produktom

$$\mathbf{T}_{\text{ROT}}(t) = \mathbf{m}_{\text{dip}}(t) \times \mathbf{E}(x_0, y_0, z_0, t), \quad (36)$$

njegovo časovno povprečje pa lahko zapišemo v obliki

$$\langle \mathbf{T}_{\text{ROT}} \rangle = -2\pi\epsilon_e R^3 \text{Im}[f_{\text{CM}}] \nabla |\mathbf{E}^2|. \quad (37)$$

Pri mejni frekvenci dielektroforetskega spektra ima imaginarna komponenta  $f_{\text{CM}}$  maksimum, zato lahko to frekvenco za opazovano telo dokaj natančno določimo z meritvami hitrosti njegove elektrorotacije (Arnold and Zimmermann 1982, Jones 2003).

### 1.2.1.3. Dielektroforeza potujočega vala

Kot smo že omenili, pride pri krajevno spremenljivem faznem zamiku električnega polja do dielektroforeze potujočega vala, dielektroforetsko silo pa v takšnih primerih določa enačba (34). V praksi takšno polje ustvarimo z večelektrodnim sistemom, na elektrode katerega dovajamo fazno zamaknjeno izmenično napetost (Huang *et al.* 1993).

Ker je dielektroforeza potujočega vala sorazmerna imaginarni komponenti  $f_{\text{CM}}$ , gibanje teles pod njenih vplivom opazimo le v frekvenčnem območju blizu mejne frekvence dielektroforetskega spektra.

### 1.2.1.4. Interakcije med telesi

Pri izračunih dielektroforetske sile običajno predpostavimo, da so telesa dovolj narazen, da lahko zanemarimo njihove medsebojne interakcije. Če so telesa zelo blizu skupaj, pa tak približek ni utemeljen, saj telesa vplivajo na električno polje v bližini sosednjih teles in s tem na dielektroforetsko silo, ki deluje nanje. Pri pozitivni dielektroforezi to privede do privlačne sile med telesi, ki povzroči nastajanje skupkov, predvsem verig teh teles (ang. pearl-chain formation). Telesa se med seboj približujejo, dokler ne prevladajo van der Waalsove odbojne sile. Silo, ki povzroča tvorjenje verig, podaja enačba

$$F_{PC} = -C_{PC}\pi\epsilon_e R^2 \operatorname{Re}[f_{CM}] |E|^2, \quad (38)$$

kjer je  $C_{PC}$  spremenljivka z vrednostjo med 3 in  $10^3$ , ki je odvisna od gostote teles in dolžine verige (Velev and Bhatt 2006).

Celice imajo na površini proteinske molekule, zaradi katerih je tvorba gruč še bolj izrazita, dielektroforetsko obnašanje gostih celičnih suspenzij pa nepredvidljivo.

## 1.2.2. Manipulacija in ločevanje celic z dielektroforezo

Dielektroforeza omogoča brezkontaktno neinvazivno manipulacijo majhnih polarizabilnih teles kot so makro molekule (DNA, proteini), kroglice iz umetne mase (lateks), nanodelci, pa tudi biološke celice (Chou *et al.* 2002, Peng *et al.* 2006, Meighan *et al.* 2009, Gagnon 2011). Z meritvijo dielektroforetskega spektra, kot ga prikazuje slika 16, in uporabo enačbe (23) lahko izračunamo ali vsaj ocenimo električne lastnosti celic. Z dielektroforezo lahko brez uporabe markerjev ločimo celice, ki imajo različne električne in geometrijske lastnosti. V primerjavi s pretočnim citometrom pri dielektroforetskem ločevanju ne potrebujemo markerjev in aktuatorjev, ki jih fizično ločijo, temveč dielektroforetska sila hkrati deluje kot sistem razpoznavanja in aktuator. Pri zlivanju (fuziji) celic potrebujemo dober stik med celicami, kar lahko dosežemo s pozitivno dielektroforezo, s katero tvorimo verige celic (Teissie and Rols 1998).

Razvitih je bilo mnogo sistemov za ločevanje celic, saj nehomogeno električno polje lahko dosežemo tako z obliko elektrod kot s postavitvijo izolacijskih struktur v sicer homogeno polje, poleg tega pa se sistemi razlikujejo glede na pretok medija, tehniko ločevanja in material ter postopek izdelave komore. Pri prvih poskusih z dielektroforezo so uporabljali dve koničasti elektrodi ali pa koničasto elektrodo in ploskev, med katerima so ustvarili nehomogeno električno polje (Pohl and Crane 1971). Kasneje se je za izdelavo mikrostruktur uporabljala prilagojena polprevodniška tehnologija, v zadnjem času pa se razvijajo tudi naprave na osnovi plastike in silikonov.

### 1.2.2.1. Materiali

Pri delu s celicami je potrebno zagotoviti biokompatibilnost uporabljenih materialov. Pogosto se uporabljajo steklo, zlato, platina in iridij-kositrov oksid (ITO), poleg tega pa tudi nerjaveče jeklo, aluminij, titan, silicij, silicijev dioksid in organski polimeri (PDMS, fotorezist SU-8, polimetilmetakrilat - PMMA, ...) (Martinez-Duarte 2012). Borosilikatno steklo se najpogosteje uporablja kot osnovna plošča, na kateri se izdelajo elektrode in druge strukture, z jedkanjem pa se v steklu lahko izdelajo kanali za pretok tekočine. To steklo ima visoko tališče, zelo majhen temperaturni koeficient raztezka in je prozorno za širok spekter svetlobe, njegova slabost pa je krhkost. Steklo lahko z anodnim bondiranjem vežemo na silicij, ki ima zelo podoben temperaturni koeficient raztezka, zato je kombinacija teh dveh materialov zelo pogosta. Čisti silicij je slabo prevoden ( $\sim 10^{-4}$  S/m), z dodajanjem primesi (dopiranjem) pa ga lahko naredimo za več velikostnih razredov bolj prevodnega, kar je primerno za izdelavo elektrod. Boljšo prevodnost, obstojnost in inertnost od silicija ima zlato, vendar smo bolj omejeni pri tehnologiji izdelave struktur. ITO je prevodna zmes kovine in je v tankih plasteh prozoren.

Polimeri so izolatorji, vendar jim z dopiranjem prevodnih nanodelcev prav tako lahko povečamo prevodnost, pri tem pa se jim le malo spremenijo druge fizikalne lastnosti. Če je koncentracija prevodnih delcev v polimeru zelo nizka, je razdalja med njimi velika, pri povečevanju koncentracije teh delcev pa se pri neki vrednosti električna prevodnost močno poveča, kar imenujemo prag perkolacije. Prevodni delci so takrat dovolj blizu skupaj, da tvorijo prevodno mrežo, preko katere teče električni tok. Mehanske lastnosti dopiranih polimerov se spremenijo v manjši meri kot električne. Prevodni delci so lahko srebrovi, ogljikovi ali nanocevke. Pri dodajanju srebrovih delcev v PDMS pride do perkolacije, ko prostorninski delež teh delcev doseže 19 %, s čimer se električna prevodnost poveča iz  $2.5 \cdot 10^{-14}$  S/m na  $6.2 \cdot 10^3$  S/m (Cong and Pan 2009). Srebrovi nanodelci so lahko zdravju škodljivi. Ogljikovi nanodelci (»carbon black«) spremenijo prevodnost polimera že pri nižji koncentraciji, pri 25 % deležu teže prevodnost doseže vrednost do 15 S/m (Niu *et al.* 2007). Polimerom se poveča prevodnost tudi pri postopku pirolize (segrevanja na visoko temperaturo), pri dodajanju PDMS v porozno snov iz bakterijske celuloze pa prevodnost že pri 0.3 % prostorninskem deležu doseže vrednost okoli 40 S/m, pri tem pa struktura ostane prožna (Liang *et al.* 2012).

Za dielektroforetsko ločevanje se pogosto uporabljajo pretočne naprave, zato je potrebno elektrode zgraditi v mikropretočni komori. Kanali takšnih komor se lahko jedkajo v steklo, lahko se med pokrov in ploščo z elektrodami vstavi folija (teflon, lateks, ...) in komoro stisne z zunanjim okvirjem, ali pa se plošča z elektrodami pokrije s pokrovom iz polimernega materiala, najpogosteje PDMS. Letega se očisti in aktivira s kisikovo plazmo, površina se iz hidrofobne spremeni v hidrofilno in ob stiku s steklom se tvorijo vezi.

Težava mikropretočnih komor je sprijemanje delcev, ki jih ločujemo v kanalu komore, s površinami kanala, kar je še posebej opazno pri uporabi pozitivne dielektroforeze na kovinskih elektrodah. Steklo in kovinske elektrode omogočajo čiščenje z detergentom ali celo acetonom, polimere pa je težje očistiti, zato se PDMS običajno po vsaki uporabi zamenja.

Prednost uporabe kovinskih elektrod je nizka napetost, ki jo moramo dovajati na elektrode, da dosežemo ustrezno dielektroforetsko silo; pri tipični medelektrodni razdalji pod 100  $\mu\text{m}$  za to zadošča napetost  $\pm 5$  V, ki jo lahko ustvarimo s široko dostopnimi funkcijskimi generatorji. Pri elektrodah iz polprevodnikov, dopiranih polimerov ali pri izolatorski dielektroforezi je padec napetosti v samih elektrodah velik ali pa so elektrode bolj razmaknjene, zato je potrebna višja napajalna napetost, kar zahteva uporabo napetostnih in tokovnih ojačevalnikov.

Materiali imajo različne površinske lastnosti, steklo in kovine imajo hidrofilno površino, polimeri pa najpogosteje močno hidrofobno, kar lahko v določeni meri spremenimo z različnimi premazi in oblikami površinske obdelave.

#### 1.2.2.2. Tehnologija izdelave

Starejši dielektroforetski sistemi so bili izdelani z mehanskimi postopki, kot je vrtnanje, rezkanje, ulivanje in lepljenje, zaradi majhnih dimenzij pa se je kasneje uveljavila tehnologija izdelave struktur, ki temelji na metodah izdelave polprevodniške elektronike (Hsu 2008, Chollet and Liu 2009). Izdelava klasičnih elektronskih komponent, ki ne vsebujejo ne gibljivih delov, ne pretoka tekočin, je dokaj enostavna, pri mikroelektromehanskih sistemih (MEMS), med katere sodijo tudi

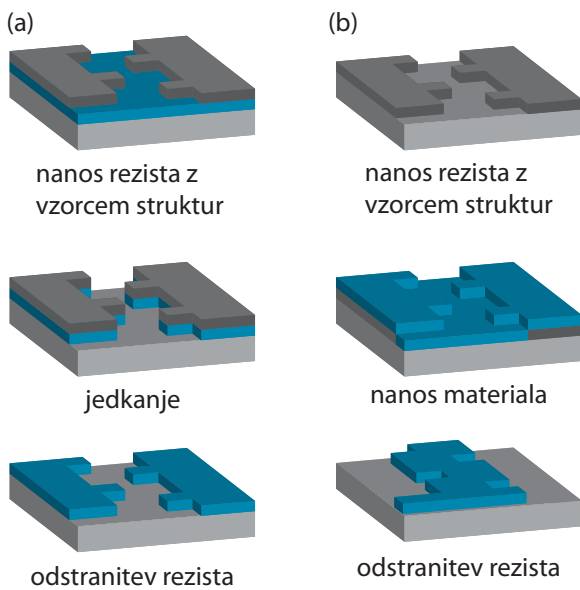


mikropretočne komore, pa je potrebno celoten postopek izdelave prilagoditi sestavljanju elektrod v napravo, skozi katero se pretaka celična suspenzija. V zadnjih letih se izdelava MEMS odmika od polprevodniške tehnologije, uporabljajo se drugačni materiali (predvsem plastika in steklo), mikropretočne naprave pa se tudi vse redkeje izdelujejo na rezinah silicija, zato je industrijska proizvodnja takšnih komor precej drugačna. Priključki za cevke zahtevajo popolnoma drugačen način izdelave kot na primer električni priključki za elektrode, obnašanje posameznih komponent je potrebno obravnavati celostno, modeliranje MEMS pa je zahtevno, saj obstaja malo metod verifikacije modela. Standardizacije na tem področju še ni vzpostavljene. Pogosto se naprave dimenzionirajo glede na polprevodniške polizdelke (rezina silicija, stekla) ali objektno steklo in mikrotitersko ploščo, ki ustrezata nosilec na mikroskopih. Do sedaj je bilo razvitih malo t.i. *LOC* (ang. lab-on-a-chip) ali *μTAS* (ang. micro total analysis) sistemov, ki za svoje delovanje ne potrebujejo perifernih naprav (črpalka, funkcijski generator, ipd), zato je potrebno tipične naprave MEMS povezati s sistemi, ki so prilagojeni bistveno večjim prostorninam tekočin oziroma vzorcev. Naprave MEMS imajo določene prednost pred večjimi napravami ravno zaradi svojih dimenzij in skaliranja fizikalnih količin (glej tabelo 1 v poglavju 1.1.6). Za analizo vzorcev je majhna prostornina prednost, saj se pri tem porabi bistveno manj reagentov in barvil, za proizvodnjo snovi ali pripravo homogenega vzorca celic, ki se potem uporabijo za nadaljnje poskuse, pa je majhna količina slabost, zato je potrebno poiskati zgornjo mejo zadovoljive funkcionalnosti, v primeru, da to ne zadošča, pa je potrebno sistem paralelizirati.

Za maloserijsko izdelavo komore z elektrodami je glede na natančnost izdelave, ponovljivost ter električne in kemijske lastnosti najbolj primeren material steklo s tanko plastjo zlata, tipičen postopek izdelave takšnih komor pa povzema slika 20. Zlato se ne sprime neposredno na steklo, zato se na ploščo iz borosilikatnega stekla s postopkom naprševanja najprej nanese tanka plast kroma ali titana, potem pa še plast zlata. Naprševanje poteka v inertnem plinu (najpogosteje argonu), kjer z električnim poljem pospešimo molekule plina do visokih kinetičnih energij, te pa iz kovinskega substrata izbijajo ione, ki se kondenzirajo na osnovni plošči. Proces poteka pri nizki temperaturi v primerjavi z drugimi tehnikami nanosa, tipično pa lahko dosežemo debelino zlate plasti do nekaj 100 nm. Na kovinski sendvič se s postopkom fotolitografije nanese vzorec struktur, tako da se najprej nanese plast fotorezista, ki se ga nato osvetli skozi masko z vzorcem elektrod. Nato se presvetljeni fotorezist raztopi, čemur sledi jedkanje kovine na področjih, ki niso zaščitena s plastjo fotorezista. Mokro jedkanje je lahko izotropno ali anizotropno, uporabljajo se pa različne raztopine. Pri suhem jedkanju pa plazma bombardira površino, ki ni zaščitena s fotorezistom, in izbija molekule kovine. Na koncu sledi čiščenje preostalega fotorezista (Hsu 2008).

Druga možnost izdelave elektrod je t.i. žrtvovalni proces z dvigom filma (ang. *lift-off*), pri katerem se na osnovno ploščo iz stekla s postopkom fotolitografije nanese plast fotorezista. Nato se površina prekrije s plastjo kovine, npr. s postopkom neparjevanja kovine z elektronskim topom (electron beam evaporation), kjer v vakuumu ozek žarek upari majhno količino kovine na anodi. Atomi kovine nato prekrijejo osnovno ploščo, neposredno s steklom pa se spojijo le na področju, kjer ni fotorezista. Sledi jedkanje, ki odstrani fotorezist, s tem pa se odstrani oz. dvigne tudi plast odvečne kovine.

Vzorec elektrod lahko oblikujemo tudi z lasersko ablacijo, pri kateri laser točkovno segreva kovino, ta pa potem odstopi od plošče. Pri tem postopku ne potrebujemo fotolitografije in jedkanja.



Slika 20: Izdelava vzorca elektrod. a) Jedkanje vzorca struktur v plast kovine, b) Žrtvovalni proces z dvigom filma. Prirejeno po (Chollet and Liu 2009).

Z uveljavljenimi postopki fotolitografije in jedkanja lahko naredimo le površinske elektrode debeline do  $1\ \mu\text{m}$ , kar je bistveno manj od premera celic. Dielektroforetska sila z oddaljenostjo od elektrod hitro upade, kar omejuje višino kanala v komori in s tem zmogljivost ločevanja celic. Uporabno višino v kanalu lahko povečamo s tridimenzionalnimi elektrodami, če dodamo še eno ploščo z elektrodami kot pokrov komore, ali pa z dovolj visokimi elektrodami, kar zahteva uporabo zapletenih postopkov galvanizacije zlata (Voldman *et al.* 2003, Wang *et al.* 2007).

Tridimenzionalne elektrode najpogosteje izdelujemo iz nekovinskih materialov, ki omogočajo nalaganje debelejših plasti. Z dopiranjem silicija lahko izdelamo elektrode debeline nekaj  $10\ \mu\text{m}$  s prevodnostjo velikostnega reda  $1\ \text{S/m}$  (Iliescu *et al.* 2006).

Plast silicija določa obliko kanala, na vrhu in na dnu pa je obdana s plastjo stekla, v kateri so odprtine za pretok tekočine skozi komoro. Proces izdelave vključuje vrtnanje stekla, anodno bondiranje silicija in stekla, globoko ionsko reaktivno jedkanje (DRIE), tanjšanje stekla in metalizacijo. DRIE je anizotropno suho jedkanje, kjer se z izmenjevanjem procesa jedkanja in pasivacije (Boschev proces) lahko izdelajo navpične stene kanalov globokih več kot  $100\ \mu\text{m}$ . Material je obstojen, gradient električnega polja je velik po celotni višini kanala, napetost je manjša od  $\pm 12\ \text{V}$ , komora pa zelo dobro tesni zaradi bondiranja stekla in silicija. Izdelava je precej zapletena, ponovljivost izdelanih komor pa velika (Iliescu *et al.* 2006).

Nehomogeno električno polje lahko ustvarimo tudi z postavitvijo izolacijskih struktur v sicer homogeno polje, kar imenujemo izolatorska dielektroforeza (iDEP). Električno polje generiramo z makroelektrodami iz žice ali s tankima ploščama z medelektrodno razdaljo od nekaj  $10\ \mu\text{m}$  do nekaj cm. Potrebna napajalna napetost je višja kot pri kovinskih mikroelektrodah, pogosto preko  $100\ \text{V}$  (Martinez-Duarte 2012). Prednost iDEP je manjša površina kovine v stiku s celično suspenzijo, zato se lahko uporabijo cenejši materiali, kot je nerjaveče jeklo ali aluminij. Izdelava komore je cenejša, pogosto se uporablja ulivanje plastike, rezkanje, lepljenje ali pa postopki iz mikroelektronike, pri katerih je debelina strukturirane plasti bistveno večja kot debelina kovinskih mikroelektrod. Najbolj enostaven primer je komora, napolnjena s steklenimi ali polimernimi kroglicami, elektrodi iz žice pa sta potopljeni v rezervoarjih na začetku in koncu kanala. Bolje definirano strukturo lahko dosežemo z zožitvami v kanalu, vijugami, palicami oz. stebrički, ipd (Cummings and Singh 2003, Lapizco-Encinas *et al.* 2004).

Proces LIGA (nem. Lithographie, Galvanoformung, Abformung) se uporablja za izdelavo visokih tridimenzionalnih struktur. Na prevodno ploščo nanese debelo plast fotorezista, nato se s fotolitografijo prenese vzorec elektrod in metalizira področja brez fotorezista. S tem postopkom

dobimo zelo natančno izdelane debele kovinske elektrode, strošek izdelave pa je visok, saj je za presvetlitev maske pri fotolitografiji potreben močan izvor paralelnih rentgenskih žarkov, za kar praviloma uporabimo sinhrotron (Chollet and Liu 2009).

Namesto klasičnih elektrod lahko s svetlobo ustvarimo tudi optoelektrično pinceto, opisano v poglavju 1.1.2.3, s katero generiramo učinkovito obliko elektrod. Svetloba močno poveča prevodnost plasti ITO, s tem pa nastanejo navidezne elektrode, s katerimi generiramo električno polje, ločevanje pa poteka podobno kot na drugih tankoplastnih elektrodah. Prednost takšnih elektrod je prilagodljiva geometrija, a je njihova prevodnost bistveno nižja kot pri kovinskih elektrodah, zato mora biti prevodnost medija nizka. Površina področja elektrod je tudi dokaj majhna, saj je omejena s širino optičnega žarka.

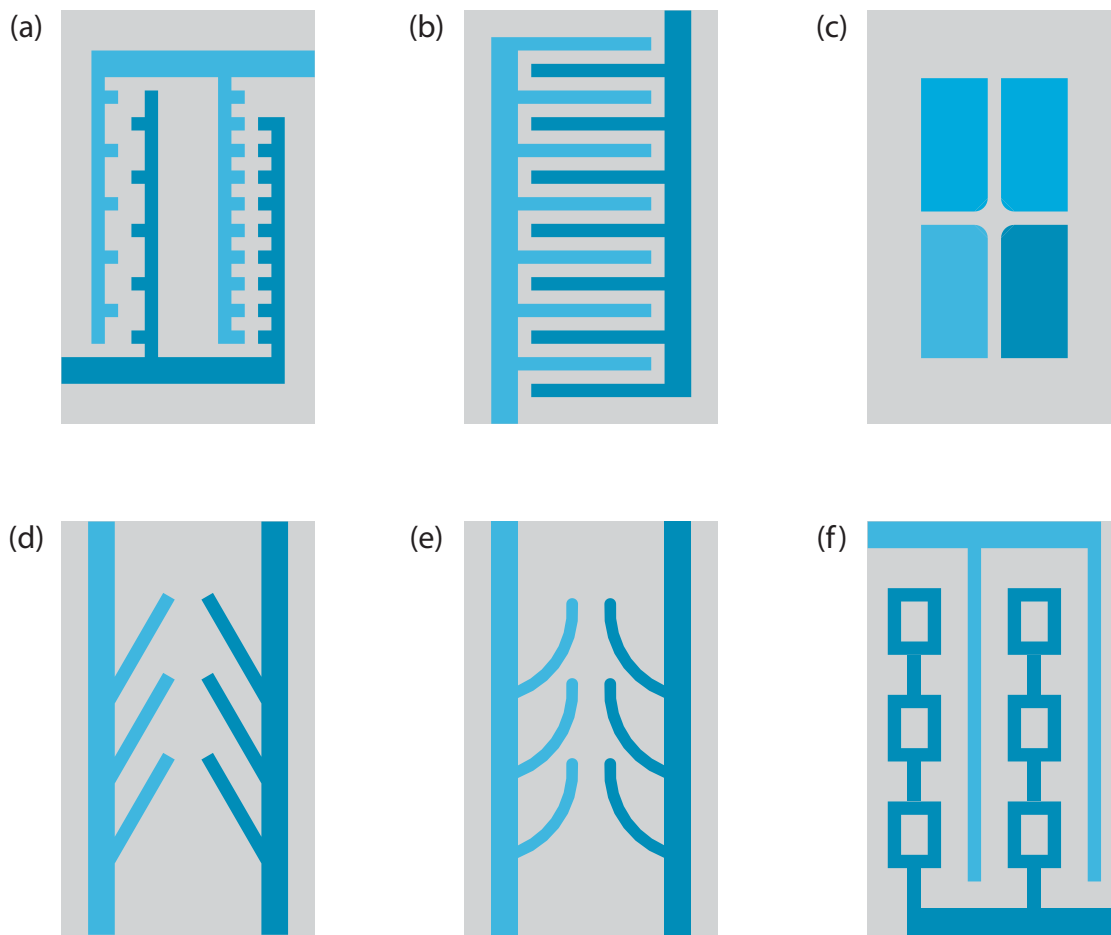
### 1. 2. 2. 3. Oblika elektrod

Glede na obliko (Khoshmanesh *et al.* 2010) so elektrode lahko paličaste oz. iz trakov (ang. *indere-digitated*) (Gascoyne *et al.* 1997, Markx *et al.* 1997, Yang *et al.* 1999, Holmes *et al.* 2003, Li and Bashir 2004, Hawkins *et al.* 2011), kronaste (Falokun *et al.* 2003, Oblak *et al.* 2007), ukrivljene (Khoshmanesh *et al.* 2010), četveropolne (Voldman *et al.* 2003, Jang *et al.* 2009), poševne (Kim *et al.* 2007) ali matrične (Frenea *et al.* 2003). Vse naštetne oblike povzema slika 21, najpogosteje pa so izdelane s fotolitografijo in jedkanjem iz tanke plasti kovine na steklu.

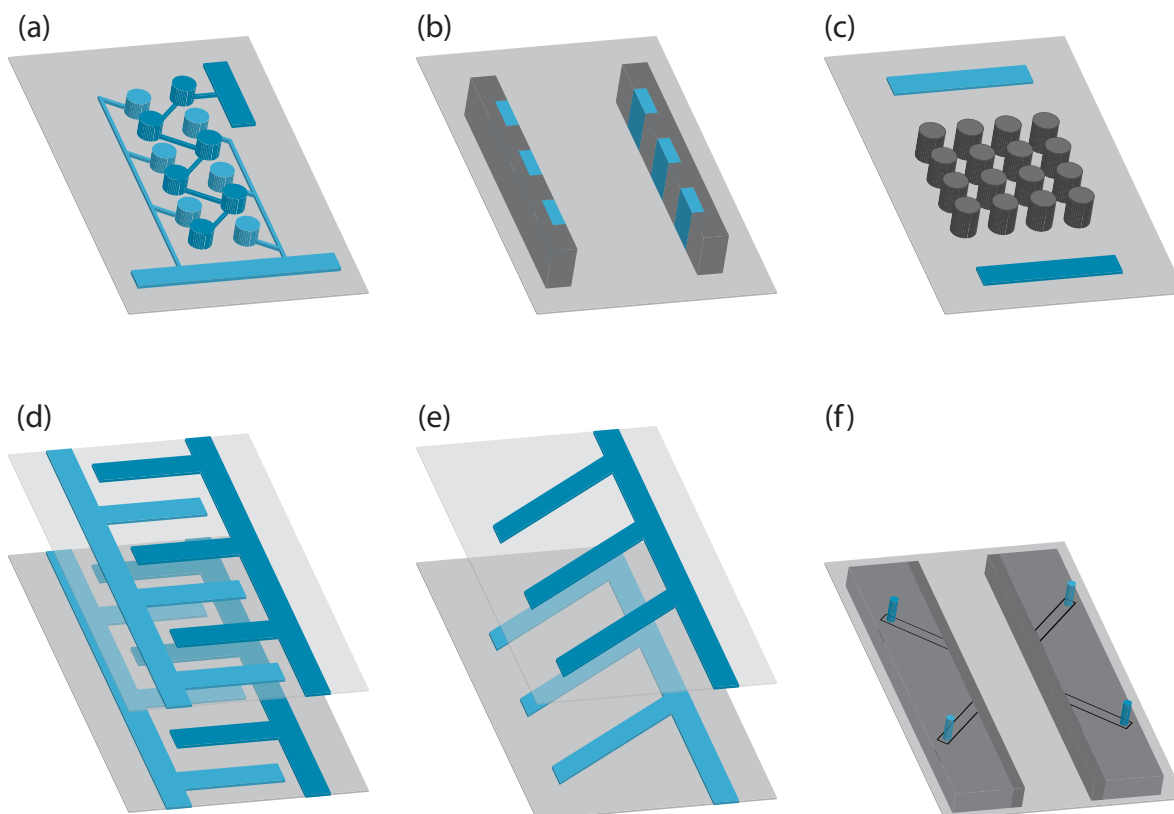
V tridimenzionalnih elektrodah (slika 22) se lahko kovina z ustreznim vzorcem nahaja tudi ob strani kanala (Wang *et al.* 2007), komora pa ima lahko tudi stranske kanale, ki služijo kot električni prevodnik do glavnega kanala, v katerem plavajo telesa, ki jih ločujemo (Shafiee *et al.* 2010). Za zagotavljanje napetosti na takšnih elektrodah pogosto zadošča funkcijski generator, v nekaterih primerih pa je potrebno uporabiti še ojačevalnik.

Z elektrodami ob strani kanala lahko generiramo homogeno električno polje, ki ga potem z izolacijskimi strukturami spremenimo v sistem iDEP (Cummings and Singh 2003, Lapizco-Encinas *et al.* 2004), ta metoda pa je uporabna tudi z enosmernim električnim poljem (Masuda *et al.* 1989, Srivastava *et al.* 2010). Za iDEP, ki se praviloma izvaja v sorazmerno velikih komorah, je temu primerno potrebno zagotoviti precej višjo napetost na elektrodah, pri nekaterih izvedbah celo do nekaj 100 V. To je lažje dosegljivo pri enosmerni iDEP, a sta slabosti le-te elektrolitska kontaminacija suspenzije zaradi odnašanja elektrodnega materiala in nezmožnost nastavljanja frekvence polja, zaradi česar je ta metoda omejena predvsem na ločevanje celic po velikosti.

V zgoraj opisanih tridimenzionalnih sistemih so tako pri izvedbi s kovino kot z izolatorji elektrode še vedno v neposrednem stiku s celično suspenzijo. Pri elektrodah s slepimi kanali je možnost kontaminacije celične suspenzije z elektrodnim materialom manjša zaradi večje razdalje suspenzije do elektrod. Elektrode pa lahko od suspenzije tudi povsem ločimo, če jih prekrijemo s PDMS v dovolj tanki plasti, da zadosten del napetosti na elektrodah še vedno dostopa do suspenzije (Salmanzadeh *et al.* 2012); ta pristop prikazuje slika 23.



Slika 21: Dvodimenzionalne elektrode različnih oblik. Prirejeno po (Khoshmanesh *et al.* 2011).



Slika 22: Tridimenzionalne elektrode različnih oblik. Prirejeno po (Khoshmanesh *et al.* 2011).

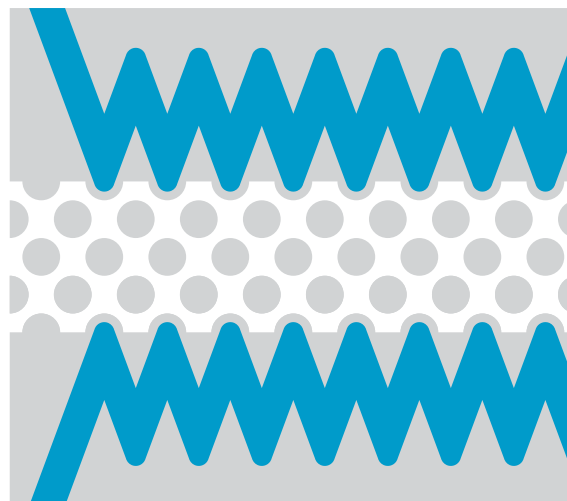
#### 1.2.2.4. Izvedbe in načini delovanja

Na celice lahko v nizkoprevodnem mediju odvisno od frekvence električnega polja deluje negativna ali pozitivna dielektroforeza (glej poglavje 1.2.1.1). Če se električne in geometrijske lastnosti dveh tipov celic dovolj razlikujejo, imata ta tipa različni mejni frekvenci in ju lahko ločimo glede na predznak dielektroforetske sile.

Za opazovanje dielektroforetskega odziva pretočna komora ni potrebna, v kanal postavimo kapljico celične suspenzije in pod mikroskopom opazujemo smer premikanja celic glede na položaj elektrod (Oblak *et al.* 2007, Fatoyinbo *et al.* 2008). Z opazovanjem celic lahko določimo smer njihovega gibanja pri različnih frekvencah polja, s katerim generiramo dielektroforetsko silo, s čimer dobimo celotni dielektroforetski spekter oziroma frekvenčno odvisnost Clausius-Mossottijevega faktorja  $f_{CM}$  (Gagnon 2011), z optimizacijo prilaganja teoretične krivulje spektra meritvam pa lahko nato ocenimo dejanske električne lastnosti membrane in citoplazme. Pri poskusih na kvasovkah, suspendiranih v deionizirani vodi, so tako izmerili, da segrevanje celic nad 60°C zniža mejno frekvenco iz 45 MHz na 5 MHz, in na osnovi tega ocenili, da se prevodnost citoplazme zniža iz 0.2 S/m na 0.02 S/m v celični suspenziji z začetno prevodnostjo  $6 \cdot 10^5$  S/m, podoben pa je bil tudi učinek dodanega 0.4 % izooktanola (Patel *et al.* 2008). Z meritvami mejne frekvence so ugotovili, da so električne lastnosti eritrocitov odvisne od njihove starosti, da imajo elektroporirane celice višjo mejno frekvenco od neporiranih ter da določene mutacije bakterije *E. coli* vplivajo na njen dielektroforetski spekter (Gagnon 2011).

Takšni poskusi lahko služijo kot osnova za izbiro strategije ločevanja. Bolj uporabno je ločevanje celic v pretoku medija, kjer celice tudi fizično ločimo. Pri pretočnih komorah ločimo šaržni in kontinuirani način ločevanja. V šaržnem načinu mešanica celic vstopa v komoro, dielektroforeza selektivno usmeri celice proti visokemu ali nizkemu električnemu polju, celice pa posledično potujejo skozi komoro z različnimi hitrostmi, oziroma se en tip celic ustavi v komori. Na izhod tako najprej prispejo celice enega tipa, nato pa še druge. V kontinuiranem načinu celice s pretokom medija potujejo po določeni tirnici, s pozitivno in negativno dielektroforezo pa jih odklonimo iz začetne tirnice proti več izhodom (glej sliko 26).

Dielektroforetske sisteme lahko razdelimo tudi po tem, ali ločevanje poteka le glede na predznak dielektroforetske sile ali pa tudi glede na njeno velikost. Ločevanje glede na predznak poteka na podlagi različne polarizabilnosti celic, frekvenco ločevanja pa izberemo tako, da na en tip celic deluje pozitivna, na drugega pa negativna dielektroforeza, kar pomeni, da se v enačbah (23) in (35) ta dva tipa celic razlikujeta po predznaku  $f_{CM}$ . Sorazmernost dielektroforetske sile s tretjo potenco polmera celice kaže, da velikost celice močno vpliva na velikost te sile, pa tudi na mejno frekvenco spektra.



Slika 23: DEP komora z izoliranimi elektrodami. S sivo je označen PDMS in z modro elektrode. Prirejeno po (Salmanzadeh *et al.* 2012).

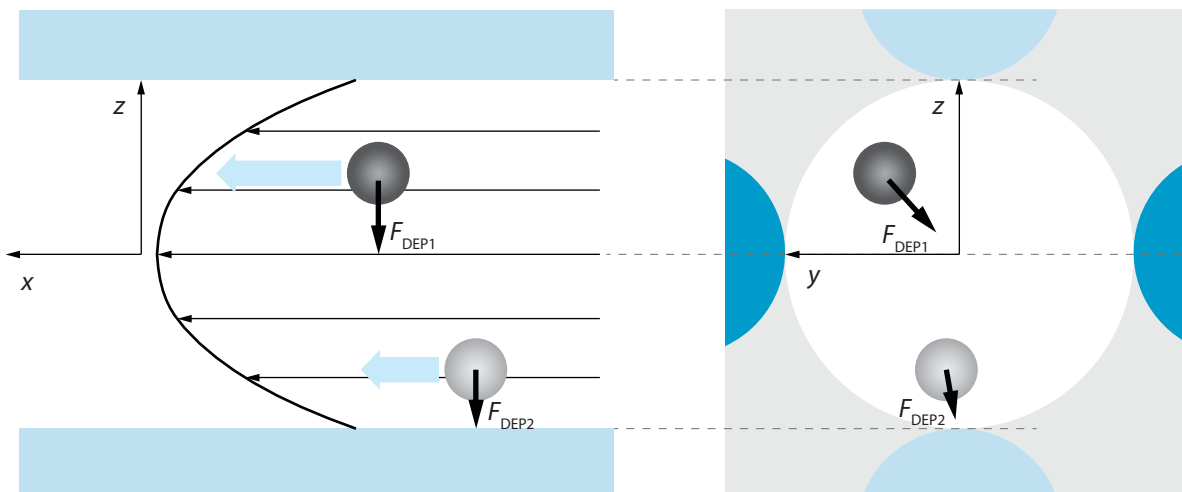
Za ločevanje glede na velikost dielektroforetske sile pa v komori načeloma potrebujemo pretok, ločevanje pa temelji na različnih spremembah tirnic celic, ki nastopijo kot posledica te sile. Pri kontinuiranem načinu takšnega ločevanja celice z različnimi tirnicami nadaljujejo pot proti različnim izhodom, pri šaržnem načinu pa ločevanje temelji bodisi na lovljenju celic s posamezno tirnico v t.i. pasti, ali pa na različnih časih, ob katerih celice z različnimi tirnicami dosežejo izhod kanala komore.

Pasti (ang. dielectrophoretic traps) lahko izdelamo s tankoplastnimi (Ramadan *et al.* 2006, Thomas *et al.* 2010, Macqueen *et al.* 2012) ali tridimenzionalnimi elektrodami (Voldman *et al.* 2003), ali pa z iDEP strukturami (Müller *et al.* 1999, Cummings and Singh 2003, Suehiro, Zhou, *et al.* 2003, Lapizco-Encinas *et al.* 2004). Pogosto se pasti uporabljajo za ločevanje oz. izolacijo celic, ki v vzorcu predstavljajo zelo majhen delež, lovljenje v pasti pa najpogosteje temelji na pozitivni dielektroforezi.

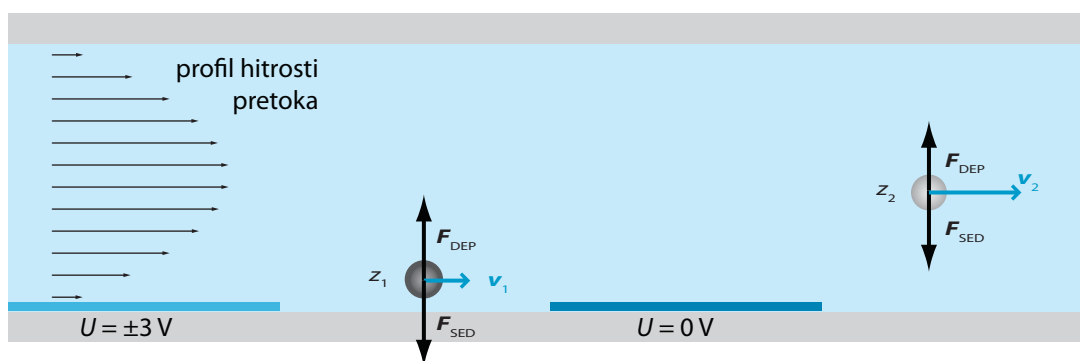
32

Dielektroforeza načeloma ne zmanjša preživetja celic, zaradi nehomogenega polja pa lahko električno polje na določenih območjih povzroči elektroporacijo celic ali lokalno prekomerno segrevanje. Pri uporabi pasti se celice ujamejo ravno na teh kritičnih območjih, zato je potrebno izračunati maksimalno električno polje in primerno omejiti napetost na elektrodah. Poleg tega uporaba pozitivne dielektroforeze lahko privede do tvorbe skupkov, saj se celice v stiku med seboj sprijemajo. Te težave odpravimo z uporabo pretočnih komor, kjer dielektroforetska sila povzroča le odmike celic iz začetne tirnice gibanja, ki ne privedejo do stika celic z elektrodami ali drugimi trdnimi strukturami v komori, temveč vse celice nadaljujejo pot s pretokom medija proti izhodu komore.

Ločevanje celic v tankoplastni pretočni komori (ang. field-flow fractionation – FFF) je metoda ločevanja celic v plitvem kanalu, kjer na večje celice deluje drugačna dvižna hidrodinamična sila kot na majhne celice (glej enačbo (18)), zato en tip celic doseže izhod iz komore prej kot drugi. Za ločevanje celic po električnih lastnostih pa potrebujemo dodatno silo, ki jo generiramo z električnim poljem. Komore za DEP-FFF imajo na dnu kanala tanke elektrode, ki ustvarjajo nehomogeno polje predvsem v vertikalni smeri, kanal pa je dolg in plitev, zato je pretok medija v njem laminaren in ima paraboličen vertikalni hitrostni profil. Komoro DEP-FFF lahko v primeru pozitivne dielektroforeze uporabimo kot pasti, v tem primeru se celice ujamejo na robovih elektrod. Težavi takšnega pristopa sta sprijemanje celic z elektrodami in tvorjenje gruč, ti težavi pa lahko zmanjšamo, če je električno polje dovolj šibko, da se zaradi dielektroforetske sile en tip



Slika 24: DEP-FFF v cevi. Prirejeno po (Tsukahara *et al.* 2001).



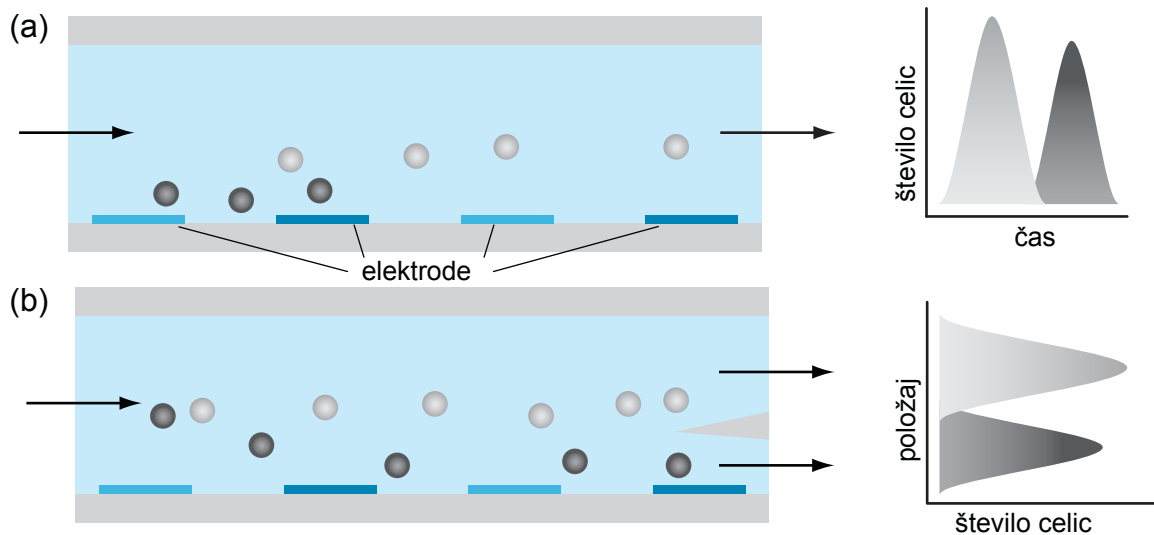
Slika 25: Komora DEP-FFF.

celic premakne bližje steni, kjer se celice ne ujamejo, ampak počasi potujejo skozi komoro, drugi tip celic na sredini kanala pa hitro pride na izhod iz komore. Elektrode se lahko nahajajo na obodu cevi, tako da njihov prečni prerez predstavlja četveropol (slika 24). Pri ustrezni izbiri frekvence deluje na en tip celic pozitivna dielektroforeza, ki jih priteguje proti steni cevi, kjer je hitrost pretoka nizka, na drug tip celic pa deluje negativna dielektroforeza, ki jih potiska proti sredini kanala, kjer je hitrost pretoka večja (Tsukahara *et al.* 2001).

Pogosteje pa uporabljamo ločevanje celic z negativno dielektroforezo, ki celice potiska navzgor, stran od elektrod. Takšno ločevanje temelji na ravnotežju med dielektroforezo in sedimentacijo v vertikalni smeri, v horizontalni smeri pa zaradi parabolničnega profila pretoka celice na različnih višinah potujejo proti izhodu z različnimi hitrostmi in posledično njihova pot skozi komoro traja različno dolgo (slika 25). Gravitacijska in vzgonska sila sta konstantni ne glede na položaj celice v komori, dielektroforetska sila pa pada z oddaljenostjo od dna kanala, kjer so elektrode. Različne celice tako zavzamejo različne ravnotežne vertikalne položaje, pri katerih je rezultanta omenjenih sil enaka nič. Če so celice nekaj  $\mu\text{m}$  oddaljene od dna komore, je ravnotežna višina skoraj neodvisna od hitrosti pretoka, saj je hidrodinamična dvižna sila bistveno manjša od dielektroforetske, gravitacijske in vzgonske sile (Yang *et al.* 1999).

V šaržnem načinu celice, na katere deluje večja dielektroforetska sila, potujejo bližje navpični sredini komore in zato pridejo na izhod iz komore prej kot celice, na katere deluje manjša dielektroforetska sila in so zato v kanalu nižje. V kontinuiranem načinu ima komora dva izhoda (ali več) na različnih oddaljenosti od dna komore; skozi zgornji izhod komoro zapuščajo celice z višjo ravnotežno lego, skozi izhod bližje dnu pa tiste z nižjo (slika 26).

V pretočni komori lahko elektrode postavimo tudi tako, da dielektroforetska sila še vedno deluje prečno na smer pretoka, a v vodoravni ravnini (Zhou *et al.* 2005, Han and Frazier 2008, Lewpiriyawong *et al.* 2011). Komora ima pri takšnem pristopu dva pritoka, skozi enega priteka le medij, skozi drugega pa celična suspenzija, s čimer dosežemo hidrodinamično fokusiranje celic v pretoku (glej tudi poglavje 1.1.1.2). Celice tečejo skozi komoro s tokovnicami pretoka, z dielektroforetsko silo pa nato lateralno premaknemo en tip celic, tako da zapustijo komoro skozi ustrezen izhod. Dielektroforetsko silo lahko generiramo s poševnimi tankoplastnimi elektrodami na dnu komore (slika 21d) ali pa z debelimi elektrodami ob robu kanala.

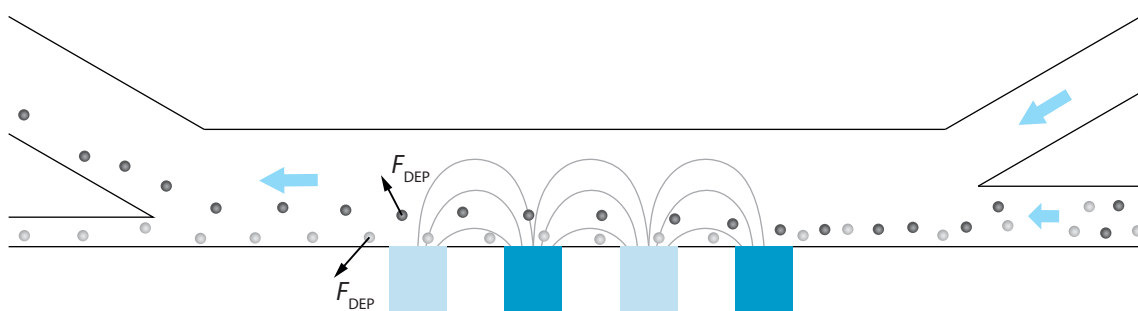


Slika 26: (a) Šaržno in b) kontinuirano ločevanje v DEP-FFF komori.

Dielektroforetske komore lahko služijo tudi za selektivno označevanje celic s protitelesi. Površina kanala z elektrodami se prekrije s protitelesi, frekvenco električnega polja pa izberemo tako, da na celice, ki jih želimo označiti, deluje pozitivna dielektroforeza. Dielektroforetska sila v tem primeru ni dovolj močna, da bi se celice ujele na elektrode, temveč se le kotalijo po površini in tako lažje najdejo primerno vezalno mesto (Shew *et al.* 2010).

Ker ima vsaka od zgoraj opisanih dielektroforetskih metod ločevanja celic svoje prednosti in slabosti, je izbira posamezne metode ločevanja odvisna predvsem od specifičnih zahtev eksperimenta oziroma področja uporabe (Hughes 2002). Dielektroforetske pasti so najbolj uporabne za ločevanje celic, ki jih je zelo malo in se po električnih ali geometrijskih lastnostih precej razlikujejo od ostalih celic. Omejitev je hitrost pretoka, ki mora biti dovolj nizka, da celice ostanejo ujele v komori, dokler je prisotna napetost na elektrodah. Večjo kapaciteto in hitrost ločevanja načeloma omogoča DEP-FFF, pri tem pa hitrost pretoka omejuje čas, ki je potreben, da celice dosežejo ravnotežno lego. Pri šaržnem načinu mora biti poleg tega komora še dovolj dolga, da dosežemo zadostno razliko med časi prihoda celic različnih tipov do konca kanala, kar omogoči izmenjavo posodic, v katere zbiramo posamezne tipe celic.

Na splošno velja, da je ločevanje celic učinkovitejše, če je električno polje močnejše, medij, v katerem so celice suspendirane, pa ima znatno nižjo električno prevodnost od fiziološke. V takšnih medijih jousko segrevanje ni izrazito, a lahko previsoko električno polje kljub temu povzroči elektroporacijo membran celic, ki jih poškoduje in bi predstavljalo v samem ločevanju



Slika 27: Kontinuirano lateralno DEP ločevanje celic. Povzeto po (Lewpiriyawong *et al.* 2011).



celic nezaželen učinek. Zato je potrebno najvišjo jakost električnega polja omejiti na največ 200 do 300 V/cm, saj lahko jakosti nad 400 V/cm že privedejo do elektroporacije (Čemažar and Kotnik 2012). Nezaželen učinek je tudi elektroosmoza (premikanje medija s celicami zaradi delovanja električne vlečne sile), ki ga zasledimo pri poljih s frekvenco do približno 10 kHz (Wong *et al.* 2004); ta učinek je mogoče uporabiti za črpanje brez zunanje črpalke, a se mu skušamo praviloma izogniti, zato se za dielektroforezo uporabljajo višje frekvence polja.

Dielektroforeza kot pojav je znana že več desetletij, a je prišlo do njene širše uporabe in komercializacije šele po letu 2000; vloženi je bilo mnogo patentov za različne oblike elektrod in strategije ločevanja, kljub temu pa večina naprav še ni primerna za prodajo na trgu (Hughes 2002). Eden od razlogov je specifičnost naprav, ki so primerne za posamezne aplikacije, saj je na primer potrebno za vsak tip celic prilagoditi vsaj frekvenco električnega polja, za optimalne rezultate pa tudi hitrost pretoka ter električno prevodnost in sestavo medija. Druga težava je nizka robustnost metode v smislu natančnosti, zanesljivosti in ponovljivosti ločevanja, saj je biološka raznovrstnost celic velika; lahko so različno velike, v različnih fazah celičnega cikla, v nizkoprevodnih medijih, ki jih najpogosteje uporabljamo za učinkovito dielektroforezo, pa pride tudi do sprememb fizioloških lastnosti celic in njihovega postopnega odmiranja. Težavna, a pogosto potrebna, je tudi integracija dielektroforetskih sistemov z drugimi napravami, saj je ločevanje celic le del analize ali priprave za nadaljnjo obdelavo. Dielektroforetsko ločevanje bo tako pridobivalo uporabnost v praksi, ko bodo tudi druge, »makro« laboratorijske naprave miniaturizirane in s tem združljive v eno samo napravo »na čipu«.

#### 1.2.2.5. Eksperimentalni rezultati ločevanja celic z dielektroforezo

Pri razvoju naprav za dielektroforetsko ločevanje celic se kot model celice pogosto uporabljajo kroglice iz lateksa, silike, polistirena ali drugih dokaj nizkoprevodnih polimerov. Premer takšnih kroglic je nekaj  $\mu\text{m}$ ; tako so po velikosti podobne celicam, a precej bolj uniformne po fizikalnih in geometrijskih lastnostih, lažja pa je tudi priprava za poskuse.

Kljub temu pa je učinkovitost naprave mogoče potrditi šele z njeno uporabo pri ločevanju pravih celic. Pri ločevanju bakterij in drugih celic nesesalcev je najpogostejši cilj ločevanja izolacija oziroma povišanje koncentracije celic, ki imajo v začetnem vzorcu nizko koncentracijo. Pri ločevanju sesalčjih celic je pogost cilj pridobiti čim bolj homogeno populacijo celic, največ pozornosti pa se namenja ločevanju rakastih celic iz krvi.

Tabela 2 podaja pregled dosedanjih eksperimentalnih rezultatov ločevanja celic.

vrsta celic	parameter ločevanja	tip DEP naprave	medij, prevodnost	zmogljivost	učinkovitost	referenca
bakterije	Listeria innocua	DEP pasti; zlate elektrode na steklu	voda, 2 mS/cm	vzorec 10 <sup>5</sup> celic/ml	90 % iz 50 %	(Li and Bashir 2002)
	E. coli	DC iDEP; steklo in PDMS	voda 2.25 mS/m	vzorec 10 <sup>5</sup> celic/ml	>99%	(Lapizco-Encinas et al. 2005)
	B. subtilis	iDEP, DEP pasti; polimer Zeonor 1060	voda, KCl 2 mS/m	vzorec 10 <sup>6</sup> celic/ml,	do 1000× povečanje koncentracije	(Sabouchi et al. 2008)
kvasovke	E. coli	iDEP; polimer SU-8	voda, 0.5 mS/m	10 <sup>3</sup> celic/min	93 %	(Cho et al. 2009)
	kvasovke	iDEP; steklene kroglice med elektrodama	voda; 0.2 mS/m	pretok 1 ml/min	-	(Suehiro, Zhou, et al. 2003)
	kvasovke	lateralni odklon tirnice; zlate elektrode na steklu	voda, 1.5 mS/m	2-10 <sup>6</sup> celic/min	80 % iz 50 %	(Li et al. 2007)
	celice korenja	DEP-FFF; tanki plast kovine na steklu	voda, manitol 1 mS/m	pretok 100-500 µl/min	90 % iz 50 %	(Falokun et al. 2003)
človeške celice	MDA-231	DEP pasti; zlate elektrode na steklu	voda, saharoza 56 mS/m	6-10 <sup>4</sup> celic/min	95 % iz 25 %	(Becker et al. 1995)
	HL-60	DEP-FFF; zlate elektrode na steklu	voda, saharoza; 10 mS/m	2,4-10 <sup>6</sup> celic/šaržo	-	(Huang et al. 1997)
	MDA435	DEP-FFF; zlate elektrode na steklu	voda, saharoza 56 mS/m	5-10 <sup>4</sup> celic/šaržo	-	(Yang et al. 1999)
	MDA-435	DEP-FFF; zlate elektrode na steklu	voda, saharoza; 10 mS/m	5-10 <sup>4</sup> celic/šaržo	-	(Wang et al. 2000)
	MDA-435 CD34+ levkociti	DEP-FFF; zlate elektrode na steklu	voda, saharoza; 10 mS/m	5-10 <sup>4</sup> celic/šaržo	92-99 %	(Wang et al. 2000)

vrsta celic	parameter ločevanja	tip DEP naprave	medij, prevodnost	zmogljivost	učinkovitost	referenca
	človeške celice					
THP-1	različne fizikalne lastnosti	DEP-FFF; tanki plast kovine na steklu	voda, saharoza, Ficoll400; 26 mS/m	pretok 17 $\mu$ l/min	-	(Holmes <i>et al.</i> 2003)
MDA-231	ločevanje glede na celični cikel $G_1$ in $G_2/M$	lateralni odklon tirnice; zlate elektrode na steklu	PBS	3-10 <sup>4</sup> celic/min	96 % iz 83 %	(Kim <i>et al.</i> 2007)
A549-luc-C8	žive/mrtve celice	DEP pasti zlate elektrode na steklu, PDMS pokrov	7.2 ali 0.5 mS/m	240 celic/min	81 - 84 %	(Tai <i>et al.</i> 2007)
levkociti, celice raka dojk	ločevanje po velikosti	DC-iDEP lateralni odklon tirnice	-	vzorec 10 <sup>6</sup> celic/ml	-	(Kang <i>et al.</i> 2008)
MCF7 MCF10A	rakave celice od normalnih	lateralni odklon tirnice; 3-D zlate elektrode s kanalom v steklu	PBS	pretok 290 $\mu$ m/s	do 87 % in 99 % iz 50:50 %	(An <i>et al.</i> 2009)
MDA-435, MDA468, MDA231	ločevanje rakavih celic od levkocitov	DEP-FFF; zlate elektrode na upogljivem polimidu (Kapton)	voda, KCl, saharoza; 30 mS/m	2-10 <sup>5</sup> -2-10 <sup>7</sup> celic/ šaržo	do 92 % iz 0.1 %	(Gascoyne 2009)
HeLa	povečevanje koncentracije	zlate elektrode na steklu, 3-D strukture iz SU8	voda, saharoza 1.76 mS/m	-	-	(Jen and Chen 2009)
THP-1	žive/mrtve celice	iDEP, DEP pasti; PDMS komora s tekočimi elektrodami	voda, saharoza; 11 mS/m	-	95 %	(Shafiee <i>et al.</i> 2009)
HCT116, HEK293; (E.coli)	ločevanje HCT od HEK celic in E.coli	lateralni odklon tirnice; elektrode iz ITO v akrilni komori	PBS, 79 mS/m	~ 0.1 $\mu$ l/min	95 % iz 57 %	(Yang, Yang, <i>et al.</i> 2010)
PC3	tumorski potencial	iDEP; izolirane elektrode v PDMS	10 mS/m	pretok 3.3 $\mu$ l/min	do 70%	(Salmanzadeh <i>et al.</i> 2012)

Tabela 2: Pregled nekaterih DEP sistemov za ločevanje celic ali povečevanje njihove koncentracije.

---

Kot lahko vidimo, se poročani rezultati razlikujejo tako po načinu delovanja komor kot po uporabljenih materialih in številu celic, ki jih posamezni pristop lahko loči v časovni enoti. Učinkovitosti ločevanja je zelo težko primerjati, saj so začetne koncentracije različne, poleg tega pa je učinkovitost ločevanja močno odvisna od razlik v lastnostih ločevanih celic.

### 1.3. Elektroporacija in elektropermeabilizacija

Elektroporacija je pojav, pri katerem se zaradi izpostavitve celice močnemu električnemu polju tvorijo pore v celični membrani, kar omogoči prehajanje molekul skozi sicer neprepustno membrano (Neumann *et al.* 1982). Elektroporacija v ožjem pomenu besede označuje pojav, ko se zaradi izpostavitve celice električnemu polju tvorijo hidrofilne pore v celični membrani, elektropermeabilizacija pa splošneje označuje povišano prevodnost membrane zaradi izpostavitve močnemu električnemu polju, a tudi temu splošnejšemu pojavu pogosto pravimo kar elektroporacija (Weaver and Chizmadzhev 1996, Kotnik *et al.* 2005).

38

Glede na jakost in trajanje električnega polja je lahko elektroporacija reverzibilna ali ireverzibilna. Pri reverzibilni poraciji se pore zapro, membrana se popravi in celica živi naprej, pri ireverzibilni poraciji pa so poškodbe celične membrane tako velike, da celica odmre. Pri še višjem električnem polju pride tudi do termičnega uničenja celice, saj skozi celico in medij v okolici teče električni tok, ki povzroči segrevanje (Miklavčič and Puc 2006).

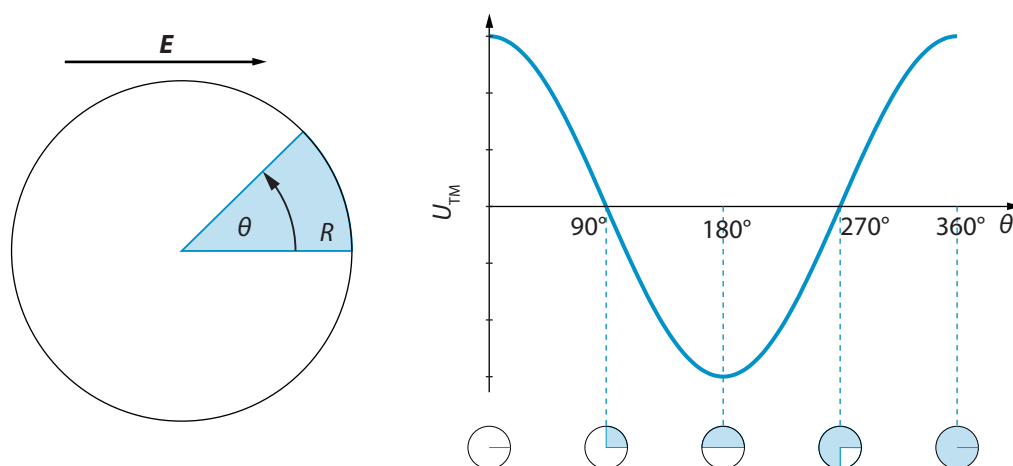
#### 1.3.1. Transmembranska napetost

Celična membrana je sestavljena iz lipidnega dvosloja in proteinov, vgrajenih vanj. Hidrofilne glave lipidov dvosloja so obrnjene proti molekulam vode na zunanji in notranji strani membrane, hidrofobni repi lipidov v obeh plasteh pa so obrnjeni navznoter, drugi proti drugim. Celična membrana ne prepušča nobenih snovi razen tistih, za katere je v membrano vgrajen mehanizem transporta; ioni najpogosteje prehajajo membrano skozi proteinske kanale in črpalke, manjše in srednje velike molekule pa z endocitozo in eksocitozo.

Koncentracija ionov v citoplazmi je drugačna kot v okolici celice. Črpanje  $\text{Na}^+$  in  $\text{K}^+$  ionov poteka z  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  črpalko, ki v enem črpalnem ciklu prenese dva iona  $\text{K}^+$  v celico in tri ione  $\text{Na}^+$  iz nje, poleg tega pa  $\text{K}^+$  ioni pasivno odtekajo iz celice še skozi kanale. To povzroči nastanek razlike električnih potencialov citoplazme in zunajcelične tekočine, kar imenujemo transmembranska napetost. Ta v fiziološkem stanju znaša med -40 in -90 mV (Kotnik *et al.* 2005), če celico izpostavimo zunanemu električnemu polju, pa se naboji prerazporedijo in pojavi se dodatna komponenta transmembranske napetosti, t.i. vsiljena transmembranska napetost ( $U_{TM}$ ). V statičnem približku to napetost opisuje Schwanova enačba

$$U_{TM} = -\frac{3}{2}RE \cos\theta, \quad (39)$$

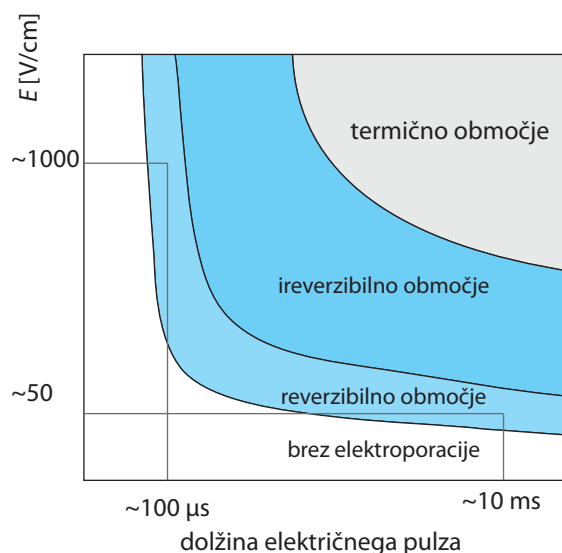
kjer je  $\theta$  kot med smerjo vektorja jakosti električnega polja ter vektorjem normale, ki povezuje središče celice in obravnavano točko na membrani (slika 28).



Slika 28: Vsiljena transmembranska napetost

Enačba (39) pove, da je velikost vsiljene transmembranske napetosti sorazmerna absolutni vrednosti električnega polja ter velikosti celice in se spreminja z lego opazovane točke na membrani. Enačba velja za sferično celico z membrano z neskončno upornostjo. Pri realni membrani je prisoten prehodni pojav akumulacije naboja, zato  $U_{TM}$  narašča nekoliko počasneje kot napetost na elektrodah. Ko med dovajanjem pulza  $U_{TM}$  na delu površine membrane preseže kritično vrednost, ki znaša med 0.2 in 1 V, se na tem delu prevodnost membrane močno poveča zaradi nastanka strukturnih sprememb - hidrofilnih por v lipidnem dvosloju (Neumann *et al.* 1982, Teissie and Rols 1993, Weaver and Chizmadzhev 1996, Delemotte *et al.* 2008). Pore se najprej začno pojavljati na anodnem polu celice ( $\theta = \pi$ ), nato pa še na drugem polu, kar so pokazali pri poskusih na celicah CHO v suspenziji, kjer so opazovali barvili propidijev jodid in etidijev bromid, ki ne prehajata skozi nepoškodovano membrano, vstopata pa skozi elektroporirano membrano (Gabriel and Teissié 1997). Pragovna napetost je odvisna od dolžine pulza in jakosti električnega polja, kot kaže slika 29.

Med elektroporacijo električno polje povzroči prehajanje vodnih in drugih molekul skozi pore v hidrofobnem dvosloju membrane. Pore ostanejo odprte, dokler je vsiljena transmembranska napetost nad pragom, nakar se v nekaj nanosekundah zapro. Dlje časa odprte pore povzročijo preveliko izgubo snovi iz celične notranjosti in posledično celično smrt.



Slika 29: Učinki električnega polja pri različnem trajanju in jakosti električnih pulzov. Prirejeno po (Marjanovič and Miklavčič 2011).

---

### 1.3.2. Mehanizmi elektroporacije

Razvitih je bilo več teorij, ki skušajo razložiti povečano prepustnost membrane ob izpostavitvi celice električnemu polju. Nekatere teorije so trdile, da naj bi zaradi vpliva električnega polja prišlo do denaturacije membranskih kanalov, tvorbe razpok med mikropodročji v fosfolipidnem dvosloju ali do elektrokompresije membrane, vendar nobene izmed teh teorij niso uspeli potrditi z eksperimentalnimi študijami (Weaver and Chizmadzhev 1996). Danes je najbolj uveljavljena razlaga elektroporacije tvorba vodnih (hidrofilnih) por v membrani (Weaver and Mintzer 1981, Glaser *et al.* 1988), ki je stohastičen pojav (Chen *et al.* 2006).

Z običajnimi slikovnimi tehnikami neposredno opazovanje nastajanja por ni mogoče predvsem zaradi majhnih dimenzij, saj znašajo premeri tipičnih metastabilnih vodnih por največ nekaj nanometrov, kar je za mehke snovi pod ločljivostjo elektronskih mikroskopov, s kristalizacijo membrane pa vanjo vnesemo preveč artefaktov, da bi lahko ločili med njimi in dejanskimi porami, nastalimi pred kristalizacijo. Zato so eksperimentalni argumenti v prid teoriji elektroporacije predvsem posredni in temeljijo bodisi na opazovanju transporta, ki je posledica nastanka por, ali pa na simulacijah molekularne dinamike. Te simulacije omogočajo opis obnašanja membrane ob izpostavitvi električnim pulzom, pokazale pa so, da dovolj veliko zunanje električno polje že v nekaj ps povzroči premik molekul vode z obeh strani membrane v notranjost lipidnega dvosloja. Na mestih, kjer so vdori vodnih molekul najgloblji, se skozi dvosloj vzpostavijo hidrofobni vodni kanali. Nato se takšni kanali razširijo do premera 1-3 nm in stabilizirajo v hidrofilno obliko. Pore ostanejo odprte, dokler je med obema stranema dvosloja dovolj velika električna napetost, kasneje pa se postopoma stohastično zapirajo.

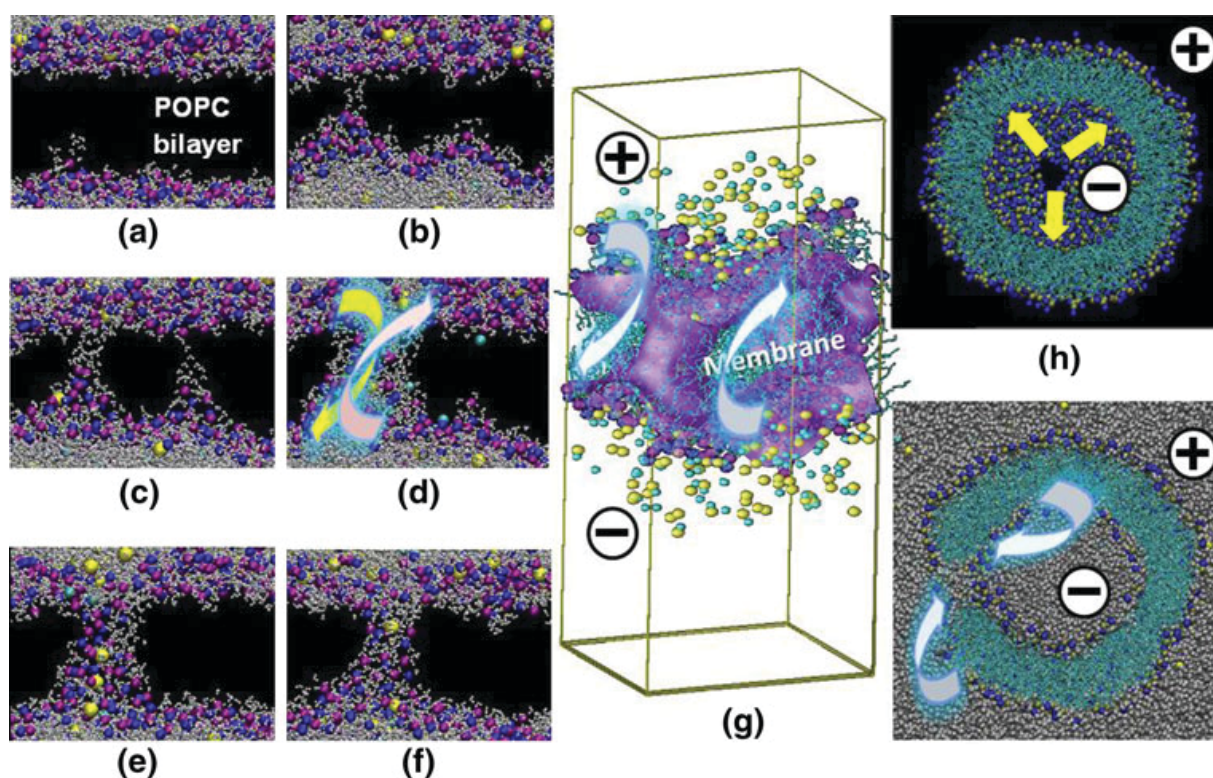
Čeprav celična membrana poleg lipidnega dvosloja vsebuje tudi številne proteine, so pokazali, da se elektroporacija dogaja podobno tudi v čistih lipidnih dvoslojih in je tako očitno omejena predvsem na dvosloj v membrani (Weaver and Chizmadzhev 1996).

Ob koncu električnega pulza se pore zapro. Okrevanje membrane je sestavljeno iz več stopenj, prva stopnja reorganizacije molekul traja le nekaj  $\mu$ s, sledi pa več faz popravljanja membrane v fiziološko, neporirano stanje, ki lahko trajajo tudi do nekaj 10 min po koncu dovajanja pulzov. Molekule tako lahko vstopajo v celico še nekaj minut po koncu izpostavitve celice električnim pulzom (Kandušer *et al.* 2005, Pucihar *et al.* 2008). Elektroporacija lahko povzroči tudi strukturne spremembe v lipidih, ki se počasi spreminjajo nazaj v fiziološko stanje (nekaj min), v tem času pa nekatere molekule lahko prehajajo membrano (Lis *et al.* 2011, Pakhomova *et al.* 2012).

Prenos molekul skozi elektroporirano membrano opisuje Nernst-Planckova enačba

$$\frac{V}{S_p} \frac{dc}{dt} = -D \frac{QEC_F}{R_G T} c - D \nabla c, \quad (40)$$

kjer je  $V$  prostornina celice,  $S_p$  površina elektroporiranega dela membrane,  $c$  koncentracija snovi,  $D$  difuzivna konstanta,  $Q$  naboj molekul,  $C_F$  Faradayeva konstanta,  $T$  temperatura in  $R_G$  plinska konstanta. Prvi izraz na desni predstavlja elektroforetski transport kot posledico električnega polja, drugi pa difuzijo. Transport snovi poteka, dokler je membrana prepustna in je prisotna razlika v koncentraciji snovi. Med pulzom je elektroforetski transport več velikostnih razredov hitrejši od difuzije, a je čas trajanja zelo majhen v primerjavi s časom okrevanja membrane, zato prenos majhnih molekul poteka večinoma z difuzijo (Puc *et al.* 2003).



Slika 30: Model molekularne dinamike nastanka pore (a-f) Zaporedje dogodkov na lipidnem dvosloju iz POPC molekul v primeru neravnotežja naboja. Z rumeno so prikazani  $\text{Na}^+$  ioni, s turkizno  $\text{Cl}^-$ , s škrlatno fosfatna skupina in z modro dušikova skupina atomov lipidov. Puščice označujejo tok ionov skozi membrano. (g) in (h) prikazujeta topologijo hidrofilne pore planarnega lipidnega dvosloja in liposoma. Povzeto po (Delemotte and Tarek 2012) z dovoljenjem založbe Springer.

Vnos velikih molekul, kakršna je npr. DNA, v celico s pomočjo električnih pulzov še vedno ni popolnoma pojasnen. Ključni dejavnik je uspešno permeabilizirana celična membrana, na katero se veže DNA, čemur sledi prenos DNA skozi membrano, migracija DNA po citoplazmi celice do celičnega jedra, prenos skozi jedrno ovojnico in nato izražanje gena. Po najpreprostejšem predlaganem mehanizmu naj bi se DNA prenesla v celico skozi pore na membrani z elektroforetsko silo (Teissie and Tsong 1981). Po drugem predlaganem mehanizmu naj bi DNA tvorila začasen kompleks s fosfolipidi v membrani, in sicer ob robu hidrofilnih por, nastalih zaradi dovajanja električnih pulzov (Golzio *et al.* 2002b).

Pri elektroporaciji celic v mediju, ki ima prevodnost mnogo nižjo od fiziološke vrednosti, ioni in večje molekule iz notranjosti celice odteka v okolico in prevodnost citoplazme se zniža. Na bakterijah in kvasovkah so izmerili vnos PI (propidijevega jodida) v celico in odtekanje ATP iz celic v okolico. Pri 10 kV/cm je koncentracija PI znotraj celice dosegla polovico vrednosti v primerjavi z izpostavitvijo polju 15 kV/cm ali več, medtem ko je bilo pri 10 kV/cm v okolici celic 15 % celotnega števila molekul ATP (Aronsson *et al.* 2005). Pri ireverzibilni elektroporaciji je odtekanje ionov zelo izrazito, povzroči znižanje prevodnosti citoplazme in s tem spremenjen DEP odziv celic v področju pozitivne dielektroforeze (Mernier *et al.* 2012).

---

### 1.3.3. Vpliv dejavnikov na elektroporacijo

Na uspešnost elektroporacije vplivajo številni dejavniki, kot so parametri električnih pulzov, lastnosti elektroporacijskega medija in lastnosti celic. Za uspešen vnos molekul v celico s pomočjo elektroporacije sta potrebna primerna izbira parametrov električnih pulzov, da dosežemo uspešen vnos, in čim večje preživetje celic. Zato morajo biti parametri izbrani tako, da dosežemo oziroma presežemo pragovno vrednost vsiljene transmembranske napetosti, ki privede do reverzibilne elektroporacije, hkrati pa ne presežemo vrednosti, pri kateri pride do ireverzibilne elektroporacije.

Delež celic, v katere uspešno vnašamo molekule z elektroporacijo, je odvisen od izbranih parametrov električnih pulzov, kot so število električnih pulzov, trajanje posameznega pulza, jakost električnega polja in ponavljalna frekvenca. S povečevanjem števila pulzov, podaljšanjem trajanja električnega pulza in s povečevanjem jakosti električnega polja narašča tudi delež uspešno elektroporiranih celic, lahko pa zaradi ireverzibilne elektroporacije upade preživetje celic. S povečevanjem frekvenca pri enakem trajanju in številu pulzov ne vplivamo bistveno na delež uspešno permeabiliziranih celic (Wolf *et al.* 1994, Maček-Lebar and Miklavčič 2001, Pucihar *et al.* 2002). Poleg parametrov električnih pulzov na elektropermeabilizacijo celic lahko vplivajo tudi številni drugi dejavniki, kot so temperatura, osmotski tlak, celični cikel in prevodnost elektroporacijskega medija (Pucihar *et al.* 2001, Golzio *et al.* 2002a, Barrau *et al.* 2004, Kandušer *et al.* 2008).

42

Za elektroporacijo se najpogosteje uporabljajo električni pulzi eksponentne ali pravokotne oblike. Zaradi boljše definiranih parametrov pulza se običajno uporabljajo pulzi pravokotne oblike, dolžina takšnih pulzov pa je od nekaj ms do nekaj ns ali celo manj kot 1 ns (Wolf *et al.* 1994, Pakhomov *et al.* 2007). Sicer se lahko uporabljajo tudi bipolarni pravokotni pulzi in pulzi trikotne ali sinusne oblike, za uspešno elektroporacijo pa je pomembno predvsem trajanje pulza pri napetosti nad pragom, ki povzroča elektroporacijo membrane (Kotnik *et al.* 2003).

Za izpostavitve celic električnemu polju se uporablja generator napetosti – elektroporator, ki omogoča dovajanje kratkih visokonapetostnih pulzov preko za ta specifičen namen prilagojenih elektrod. Razdalja med elektrodami je običajno nekaj mm, zato je za elektroporacijo potrebna napetost od nekaj 10 V do nekaj 1000 V. Za elektroporacijo celic v suspenziji se pogosto uporabljajo kivete, ki imajo dve vzporedni elektrodi iz aluminija, električno polje med njima je precej homogeno, omogočajo pa elektroporacijo nekaj 10 do nekaj 100  $\mu$ l suspenzije naenkrat. Za elektroporacijo pritrjenih celic in tkiv pa se uporabljajo ploščate in igelne elektrode.

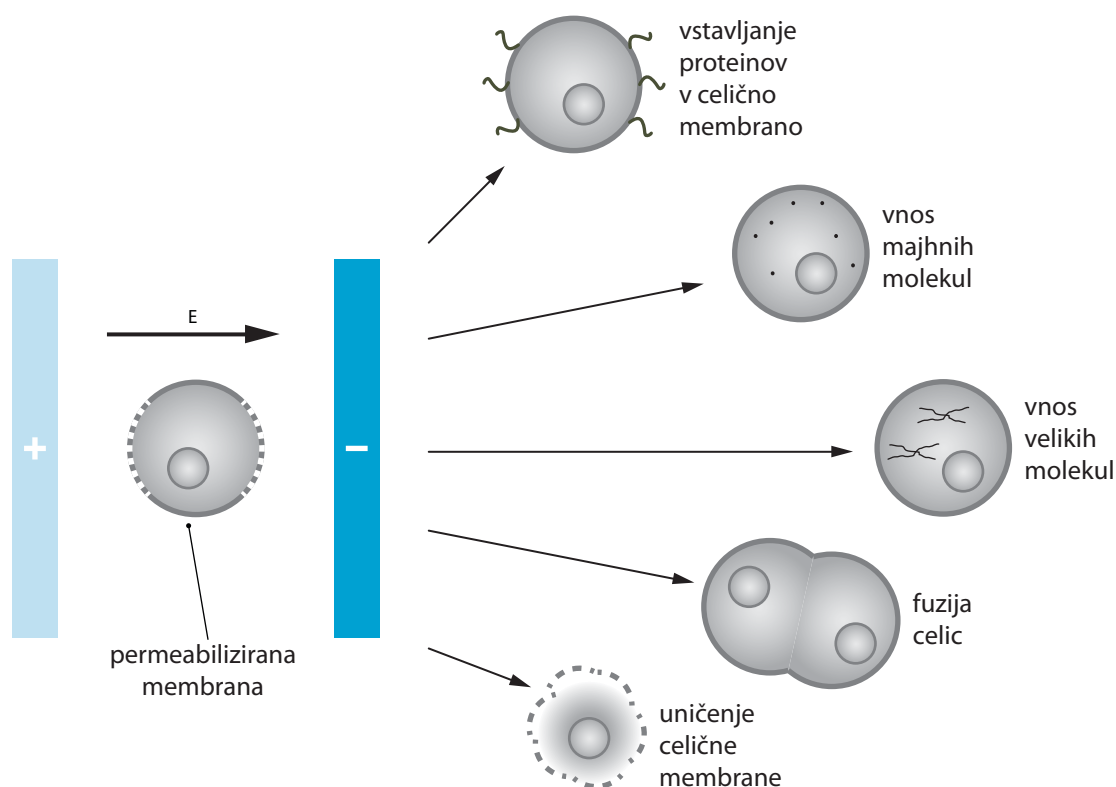
### 1.3.4. Področja uporabe elektroporacije

Za vnos molekul v celico ima permeabilizacija membrane, povzročena z električnim poljem, nekaj prednosti pred drugimi biokemičnimi metodami: lahko jo uporabimo na vsaki celici, je specifična za plazmalemo in v primeru reverzibilne elektroporacije ne prizadene membran celičnih organelov in povzroči le minimalne motnje membranskih funkcij.



Elektroporacija se uporablja v medicini, biotehnologiji, okoljevarstvu in energetiki (slika 31) (Miklavčič 2012):

- **Medicina:** Elektrokemoterapija je metoda zdravljenja rakavih obolenj na koži, pod kožo in v nekaterih organih, temelji pa na učinku, ko z lokalno izpostavitvijo tkiva električnim pulzom povečamo prepustnost celične membrane za kemoterapevtike. S tem se močno poveča učinkovitost kemoterapevtika (npr. bleomicin, cisplatin) ob zmanjšanih stranskih učinkih (Marty *et al.* 2006, Serša *et al.* 2008). Elektroporacija se uporablja tudi za gensko transfekcijo (André and Mir 2004, Kim, Hwang, *et al.* 2011) in zlivanje celic, na primer za proizvodnjo monoklonskih protiteles (Abidor and Sowers 1992, Trontelj *et al.* 2008). Poleg tega lahko z elektroporacijo vnašamo zdravila skozi kožo (Pavšelj and Preat 2005). Ireverzibilna elektroporacija se uporablja za netermično odstranjevanje tkiva (Davalos *et al.* 2005, Lee *et al.* 2010).
- **Biotehnologija:** Z elektroporacijo lahko podaljšamo življenjsko dobo živil, pri čemer se ohrani okus, uničijo pa se mikroorganizmi. Pomaga pri ohranjanju živil pri zamrzovanju (Phoon *et al.* 2008). Z elektroporacijo povečamo ekstrakcijo olja ali sladkorne raztopine iz rastlin (Sack *et al.* 2010).
- **Okoljevarstvo:** V vodi lahko z elektroporacijo uničimo mikroorganizme (Rieder *et al.* 2008) ali pa povečamo proizvodnjo bioplina iz blata (Biogasmax 2010).



Slika 31: Uporaba elektroporacije. Prirejeno po (Miklavčič and Puc 2006).

---

### 1.3.5. Elektroporacija celic v mikrokomorah

Elektroporacija z mikroelektrodami se je prvič pojavila okoli leta 1994 (Murakami *et al.* 1994, Lee and Deng 2012). V primerjavi z običajnimi makroelektrodami omogoča bolj natančno izpostavitve celic električnemu polju, potrebna napetost električnih pulzov pa je nižja zaradi manjše razdalje med elektrodama. Elektroporacija v mikrokomorah omogoča elektroporacijo posameznih celic ali nekaj mikrolitrov celične suspenzije, v primeru pretočnih elektroporacijskih sistemov pa lahko poriramo tudi večjo količino celic.

Komore so pogosto izdelane s postopkom fotolitografije, jedkanja in lepljenja prozornega ohišja, kot je steklo ali PDMS, kar omogoča opazovanje celic pod mikroskopom (Fox *et al.* 2006). Material elektrod je pogosto zlato (Choi *et al.* 2000), ki je inertno in biološko kompatibilno, uporablja se tudi silicij, nerjaveče jeklo, platina ali prevodne umetne mase, kot je na primer PDMS z dodatkom srebrovih ali ogljikovih mikro- ali nanodelcev (Niu *et al.* 2007). Elektrode so nekaj  $\mu\text{m}$  narazen, zato so napetosti običajno manjše od 100 V. Elektroporacija v mikrokomorah se najpogosteje uporablja za analizo celic, transfekcijo DNA, elektrozlivanje ali pasterizacijo (Fox *et al.* 2006).

44

## 1.4. Kombinacija dielektroforeze in elektroporacije

Kombinacija elektroporacije in dielektroforeze se večkrat pojavi v člankih zadnjih let, najpogosteje pa je dielektroforeza uporabljena za manipulacijo celic v določeno lego, ki ji sledi elektroporacija z namenom genske transfekcije (MacQueen *et al.* 2008, Kim, Hwang, *et al.* 2011), lize celic (Lee and Tai 1999, Lu *et al.* 2005, Ramadan *et al.* 2006, de la Rosa *et al.* 2008, Mernier *et al.* 2012), merjenja impedance (Suehiro, Shutou, *et al.* 2003) ali zlivanja (Zimmermann *et al.* 2000, Sukhorukov *et al.* 2006, Cao *et al.* 2008, Yang, Zhao, *et al.* 2010, Hu *et al.* 2011).

Pri genski transfekciji uporabljamo dielektroforezo za pozicioniranje celic v področje visokega električnega polja, nato sledi elektroporacija, ki omogoči prehajanje DNA v celico. Do vnosa DNA je prišlo že pri napetosti na elektrodah manj kot 10 V, pri čemer je znašalo razmerje napetosti z razdaljo med elektrodama 2 kV/cm (dolžina pulzov 20  $\mu\text{s}$ ) (MacQueen *et al.* 2008).

Celice lahko liziramo z dovolj visokim električnim poljem, ki povzroči ireverzibilno poracijo. Medtem ko želimo za reverzibilno poracijo čim bolj homogeno polje, je za lizo celic polje lahko nehomogeno, kar pomeni, da lahko s pozitivno dielektroforezo premaknemo celice na območja največjega polja, kjer se ireverzibilno porirajo (Lu *et al.* 2005). Celice lahko ujamemo tudi v t.i. mikrozalive, tako da je v vsakem mikrozalivu ena celica in odprtino zapremo. Nato jo ireverzibilno elektroporiramo in citoplazma se razlije znotraj mikrozaliva. Potem lahko pod mikroskopom s pomočjo fluorescentnih barvil spremljamo encimsko aktivnost posameznih celic, ali pa material uporabimo na primer za identifikacijo DNA (Kim, Yamamoto, *et al.* 2011).

Z dielektroforezo lahko zbiramo celice iz redke suspenzije, na primer bakterije iz vode. S pozitivno dielektroforezo pritegnemo celice med elektrodi in merimo njihovo impedanco (slika 32). Iz izmerjene vrednosti in števila celic, ki se približajo elektrodam, lahko sklepamo, kakšna populacija bakterij je v vzorcu. Elektroporacija bakterij pred meritvami impedance zaradi odtekanja ionov

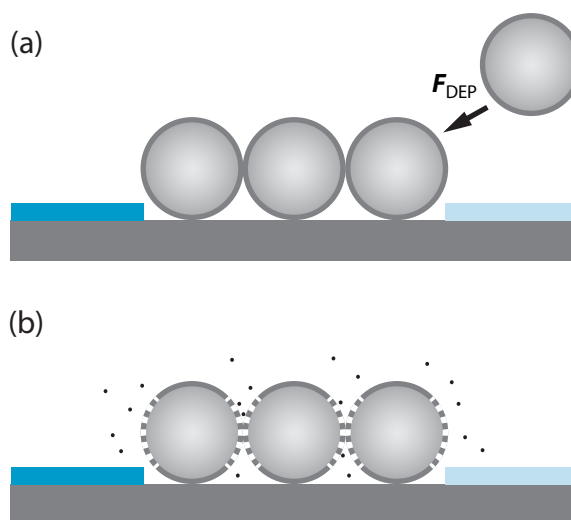
iz celic poveča občutljivost za dva velikostna razreda (Suehiro, Shutou, *et al.* 2003).

Elektroporacijo uporabljamo tudi za elektrozlivanje celic (ang. electrofusion). Zlivanje celic je pojav, ki ga živi organizmi uporabljajo med razvojem in za regeneracijo tkiv. V živih organizmih zlivanje vodijo različni proteini in proteinski kompleksi, poteka pa namensko.

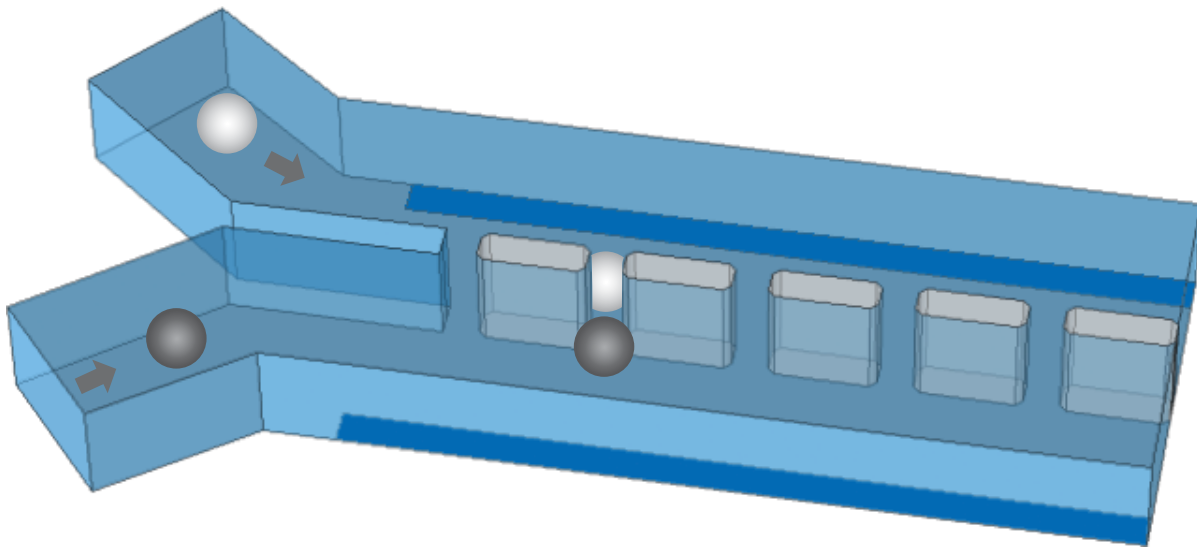
Sposobnost celic, da se zlivajo nenamensko zaradi zunanega povzročitelja, kot je npr. električno polje, pa omogoča pridobivanje celice, ki ima želene lastnosti obeh prvotnih celic. Elektrozlivanje je učinkovita nevirusna in nekemična metoda zlivanja celic, pri kateri elektroporiramo membrane celic, ki jih želimo zlivati. Elektrozlivanje je razmeroma preprosta metoda, omogoča nadzor in hkratno zlivanje velike količine celic. Postopek je zelo uporaben tudi za klinične aplikacije, saj gre za varno metodo, ki ne vključuje nobenih dodatnih, za telo tujih snovi, kar je velika prednost pred biološko - kemijskimi metodami. Zato se elektrozlivanje uporablja tudi za zlivanje celic pri pripravi hibridnih celičnih cepiv za imunoterapijo rakavih obolenj.

Za elektrozlivanje so zelo uporabne mikropretočne naprave, s katerimi lahko zagotovimo nadzorovano zlivanje različnih celic. Omogočajo zlivanje od samo enega para celic do več tisoč ali milijonov celic (Yang, Zhao, *et al.* 2010). Pogoj za uspešno zlivanje je tudi dober stik med membranama celic, za kar uporabljamo tudi sile, ki so opisane v poglavju 1.1. Stik med celicami lahko povzroči sedimentacija, ko se celice v suspenziji usedajo na dno komore in ena na drugo. En tip celic lahko pritrdimo na podlago, nato se nanje usedejo celice drugega tipa, s čimer povečamo pravilno kombinacijo celic za zlivanje. Celice lahko privedemo v medsebojni stik z optičnimi pincetami. Pare celic lahko zberemo tudi hidrodinamično, ko najprej en tip celic zberemo na strukturah v mikropretočnem kanalu, potem obrnemo smer pretoka in dodamo še drug tip celic (Skelley *et al.* 2009). Tudi pozitivna dielektroforeza povzroča stik med celicami, saj se v električnem polju tvorijo verige celic (ang. pearl chain formation) (Hu *et al.* 2011). Pri elektrozlivanju posameznega para celic pa le-te lahko v mikrokomori precizno pozicioniramo z dielektroforezo, nato elektroporiramo z bipolarnimi pulzi in z dielektroforezo vodimo naprej po mikrokomori (Kirschbaum *et al.* 2012).

Dielektroforeza je zelo perspektivna metoda zgoščevanja celic, saj iste elektrode lahko uporabimo za elektroporacijo. Za elektroporacijo želimo homogeno električno polje, za dielektroforezo pa nehomogeno, zato je pri elektrozlivanju potrebno najti kompromis. Tankoplastne kovinske elektrode za elektroporacijo niso primerne, uporabljajo se tridimenzionalne elektrode iz debelejših plasti kovine ali drugega prevodnika, kot je prikazano na slika 22b (Hu *et al.* 2011). Komora omogoča elektrozlivanje velike količine celic naenkrat, se pa celice naključno zbirajo na elektrodah, zato je mnogo parov celic neuporabnih.



Slika 32: (a) Pozitivna DEP premakne celico med elektrodi, kjer je električno polje največje. (b) Elektroporacija celic in iztekanje molekul iz celic. Prirejeno po (Suehiro, Shutou, *et al.* 2003).



Slika 33: Fuzija parov celic med izolatorskimi strukturami v pretočnem kanalu. Elektrode so na dnu komore, označene s temnomodro barvo. Prirejeno po (Mottet *et al.* 2012).

Lahko pa uporabimo komore, ki so podobne komoram za iDEP (slika 33). Ob robu kanala so ravne elektrode, na sredini pa izolatorske strukture, ki spremenijo obliko električnega polja. Najpogosteje je na sredini kanala med elektrodama izolativna membrana z luknjami malo manjšimi od velikosti celice, tako da se ob luknji pojavi nehomogeno električno polje, ki s pozitivno dielektroforezo pritegne celico, le-ta pa ne gre zlahka skozi, saj je luknja premajhna. Enako se zgodi na drugi strani membrane in tako dobimo par celic iz dveh ločenih skupin celic. Ob dovajanju močnejših električnih pulzov se celici še porirata in nastopi elektrozlivanje. Na odprtinah v membrani tako dobimo mnogo ustreznih parov zlitih celic.

Pri prvih poskusih ločevanja neporiranih in elektroporiranih celic so na kronastih elektrodah opazovali dielektroforetsko premikanje celic B16F1 v medijih PBS s prevodnostjo 174 mS/m oziroma 1.2 mS/m (Oblak *et al.* 2007). Predpostavili so, da se celicam pri elektroporaciji poveča električna prevodnost in zmanjša debelina membrane ter poveča polmer celice. S pomočjo modela kroglice z lupino so izračunali, da je pri prevodnosti medija 174 mS/m mejna frekvenca neporiranih celic pri 0.4 MHz, elektroporiranih pa 0.2 MHz. Pri poskusih na celicah se je mejna frekvenca neporiranih celic ujemala s teoretičnim modelom; pri frekvencah do 0.4 MHz je na celice delovala negativna DEP, pri višjih frekvencah pa pozitivna. Na elektroporirane celice je negativna DEP delovala do 10 MHz. Avtor predvideva, da je model kroglice z lupino preveč enostaven, ali pa so uporabljene vrednosti parametrov napačne. Vrednosti parametrov lahko spremenimo, tako da se ujemajo z eksperimentalnimi rezultati na območju do 10 MHz, avtor predlaga zmanjšanje dielektričnosti celične membrane za faktor 10, kar pa fizikalno ni mogoče, saj bi bila dielektričnost celične membrane tedaj manjša od dielektričnosti vakuuma. Kljub neujemanju rezultatov modela in eksperimentov se smer dielektroforetske sile pri frekvencah nad 2 MHz spremeni, kar nakazuje možnost dielektroforetskega ločevanja elektroporiranih in neporiranih celic. Tudi z modelom dveh koncentričnih lupin ne moremo pojasniti obnašanja celic, saj prevodnost membrane vpliva predvsem na nizkofrekvenčni del  $f_{CM}$ , kjer naj bi na neporirane celice delovala negativna, na porirane pa pozitivna dielektroforeza (Hu *et al.* 2009). Pri reverzibilni poraciji je prevodnost membrane močno povišana le med dovajanjem pulzov, potem se že v nekaj  $\mu$ s začne okrevanje, ki se zaključi v nekaj minutah (Pucihar *et al.* 2008).

Za ločevanje celic, elektroporiranih pri različnih jakostih električnega polja, je potrebno izdelati pretočno komoro, ki bo omogočala ne le opazovanje, ampak tudi fizično ločitev celic, ki bi jih lahko uporabili v nadaljnjih običajnih postopkih preučevanja celic. Med elektroporacijo se poviša prevodnost membrane, kar vpliva na dielektroforetsko silo pri nizkih frekvencah, kjer na celice običajno deluje negativna dielektroforeza, zato se poleg morebitne spremembe mejne frekvence lahko izkoristi tudi razliko v velikosti dielektroforetske sile. Pri obstoječih postopkih ločevanja celic je poudarek predvsem na točnosti in zmogljivosti ločevanja, pri ločevanju elektroporiranih celic od neporiranih pa je pomemben tudi čas, ki preteče od elektroporacije do konca postopka ločevanja celic.



## 2. METODE

### 2.1. Teoretični izračuni, numerično modeliranje in načrtovanje komore

Ločevanje elektroporiranih celic od neporiranih temelji na povišanju prevodnosti celične membrane zaradi elektroporacije. Glede na enačbo (35) je dielektroforetska sila ( $F_{\text{DEP}}$ ) odvisna od celice, medija in od električnega polja. Za preučevanje vpliva lastnosti celic na  $F_{\text{DEP}}$  smo v programskem paketu Matlab 2007 (Mathworks, Natick, MA, ZDA) izračunali dielektroforetski spekter celic, t.j. frekvenčno odvisnost Clausius-Mossottijevega faktorja ( $f_{\text{CM}}$ ), za različne kombinacije vrednosti parametrov.

Nehomogenost električnega polja omogoča razločevanje celic in hkrati povzroča fizični premik le teh, zato mora biti nehomogenost za učinkovito dielektroforezo čim večja. Za načrtovanje mikropretočne komore z elektrodami smo uporabili programski paket Comsol Multiphysics 3.5 (Comsol AB, Švedska) z modulom »AC/DC Module: Quasi-Statics, Electrics«. Programski paket je namenjen numeričnemu računanju po metodi končnih elementov za različne fizikalne in inženirske aplikacije in se pogosto uporablja za računanje sklopljenih pojavov, na primer električnega polja, pretoka tekočin in segrevanja skupaj, omogoča tudi računanje sklopljenih parcialnih diferencialnih enačb. Uporabljen modul pa je namenjen izračunu električnih in magnetnih polj ter drugih povezanih veličin v električnih motorjih, senzorjih in drugih napravah. V primeru izračuna električnega polja v napravah za dielektroforetsko ločevanje lahko magnetno polje zanemarimo, saj pri tipičnih razmerah za dielektroforezo električno in magnetno polje nista sklopljeni in rešujemo Laplacevo enačbo

$$\nabla^2 U = 0. \quad (41)$$

Program iterativno določa najboljši približek električnega potenciala  $U$  v vsakem oglišču elementa.

Comsol Multiphysics omogoča tudi računanje sil z Maxwellovim tenzorjem mehanskih napetosti. Leta povezuje interakcijo med elektromagnetnimi silami in mehanskimi momenti. Sile, ki delujejo na celico v električnem polju, izračunamo s ploskovnim integralom po površini telesa z enačbo

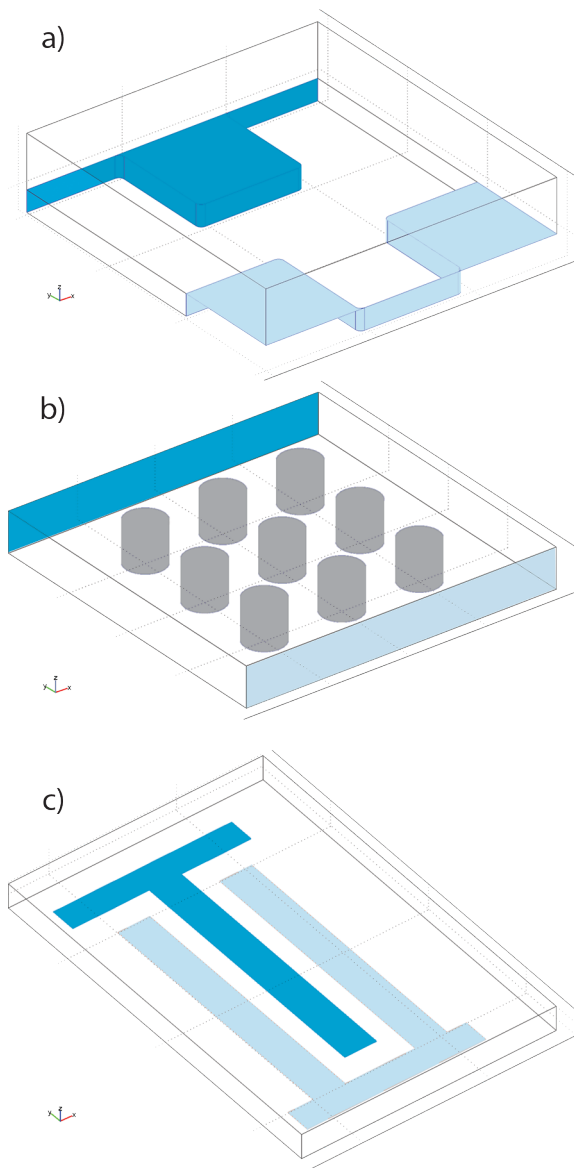
$$\mathbf{F}(t) = \oint (\mathbf{T}_M \cdot \mathbf{n}) dA, \quad (42)$$

kjer je  $\mathbf{T}_M$  Maxwellov tenzor mehanskih napetosti in  $\mathbf{n}$  normalni vektor na površini telesa. Če na telo deluje le dielektroforetska sila, je njeno časovno povprečje podano z izrazom

$$\langle \mathbf{F}_{\text{DEP}}(t) \rangle = \frac{\epsilon_e}{4} \oint \left[ \left( (\mathbf{E} \mathbf{E}^* + \mathbf{E}^* \mathbf{E}) - |\mathbf{E}|^2 \mathbf{I} \right) \cdot \mathbf{n} \right] dA, \quad (43)$$

Pri računanju sile na telo s približkom dipola (glej poglavje 1.2.1.1) je omejitev, da mora biti telo majhno v primerjavi z nehomogenostjo polja, pri analitičnih izračunih pa smo omejeni tudi z obliko telesa. V primeru numeričnega računanja  $F_{\text{DEP}}$  z Maxwellovim tenzorjem mehanskih napetosti dobimo točen izračun za poljubno obliko in velikost telesa. Aproksimacija telesa z dipolom je uporabna le kot približek, bolj točne rezultate pa dobimo z aproksimacijo z multipolom (Rosales

and Lim 2005). Električnega polja za mnoge geometrije elektrod ne moremo izračunati analitično, ampak moramo uporabiti numerične metode. V tem primeru je smiselno vključiti telo v model in bolj točno izračunati  $F_{\text{DEP}}$  z Maxwellovim tenzorjem mehanskih napetosti.



Slika 34: Primeri geometrije elektrod v programskem paketu Comsol Multiphysics: a) kronaste, b) iDEP in c) trakaste elektrode.

Pri iskanju optimalne dielektroforetske metode ločevanja smo narisali več različnih geometrij elektrod (slika 34). Oblika mnogih elektrod je periodična, zato je bilo potrebno narisati in izračunati električno polje le na eni periodi. Poleg električnega polja na samih elektrodah smo izračunali tudi polje v komori ob prisotnosti modela celic. Celico matematično običajno modeliramo kot kroglico z lupino, ker pa je razmerje med debelino membrane in premerom celice tri do štiri velikostne razrede, je potrebno debelino membrane povečati in ustrezno prilagoditi vrednosti električne prevodnosti in dielektričnosti ali pa narisati le eno kroglico in uporabiti nadomestno prevodnost in dielektričnost iz enačbe (27).

Za dielektroforetsko ločevanje v mikropretočnih napravah je potrebno poznati pretok medija skozi komoro. Zaradi majhnih dimenzij in tlaka je pretok laminaren in hitrost medija smo lahko izračunali analitično po enačbi (9) za laminaren pretok v programskem paketu Matlab in numerično s pomočjo modela komore v paketu Comsol Multiphysics.

Za izbrano geometrijo elektrod smo v programski paketu ZWCAD 2009 (ZWCAD Software Co., Guangzhou, Kitajska) narisali še načrt elektrod in celotne komore.



## 2.2. Izdelava komore za DEP-FFF

Elektrode so po naših načrtih izdelali v Laboratoriju za mikrosenzorske strukture in elektroniko (Univerza v Ljubljani, Fakulteta za elektrotehniko). Maska načrta elektrod je bila natisnjena na tiskalniku (Creo Scitex Dolev 800 imagesetter; Eastman Kodak Co., Rochester, ZDA). Elektrode so bile izdelane na borosilikatnem steklu premera 100 mm in debeline 0.7 mm (Pyrex 7740, Corning Inc., NY, ZDA). Čiščenju v raztopini SC1 ( $\text{NH}_4\text{OH} : \text{H}_2\text{O}_2 : \text{H}_2\text{O} = 1 : 1 : 5$ ) pri  $75^\circ\text{C}$  10 min je sledilo naprševanje sendviča Cr/Au debeline 50 nm / 150 nm. Vzorec elektrod je bil preko maske prenesen na steklo s fotolitografijo (fotorezist HPR 504, Arch Chemicals, Norwalk, ZDA). Fotorezist se je strdil pri temperaturi  $120^\circ\text{C}$ . Sledilo je jedkanje kovinskega sendviča, na koncu pa smo z elektrod z AZ100 Remover (MicroChemicals GmbH, Ulm, Nemčija) odstranili fotorezist pri  $60^\circ\text{C}$  s 30 min izpostavitvijo.

Kot tesnilo smo uporabili obojestranski samolepilni trak debeline 100  $\mu\text{m}$  (Isotrade Jereb k.d., Ljubljana, Slovenija), v katerega smo izrezali odprtino v obliki kanala dolžine 80 mm in širine 19 mm. Akrilno lepilo traku je vodoodporno, pri temperaturi nad  $70^\circ\text{C}$  pa sila lepljenja popusti, zato je komoro mogoče razstaviti v vroči vodi, jo očistiti in ponovno sestaviti. Za pokrov smo uporabili navadno natrijevo steklo, v katerega smo izvrtali luknje za dovod in odvod medija.

Komoro smo pritrdili na ploščo iz nerjavečega jekla, ki je imela znotraj odprtino za opazovanje kanala, zunanje dimenzije pa so ustrezale nosilcem mizice na mikroskopu.

Vir izmenične napetosti na elektrodah je bil funkcijski generator 33250A (Agilent Technologies, Santa Clara, ZDA). Za preizkušanje DEP ločevanja pri napetostih višjih od  $\pm 1.75$  V ali medija z višjo prevodnostjo je bila tokovna zmogljivost funkcijskega generatorja premajhna, zato smo signal iz funkcijskega generatorja ojačili na ojačevalniku lastne izdelave. Napetost na priključkih elektrod smo merili z osciloskopom (Wavesurfer 422, LeCroy, New York, ZDA), vrednost toka pa z multimetrom (HP 34401A, Agilent Technologies).

Medij smo skozi komoro črpali s črpalko na brizge (Aladdin, WPI Inc., Boulevard Sarasota, ZDA) s 5 ml brizgo, ki je bila povezana s komoro s silikonsko cevko z notranjim premerom 1.5 mm (Graupner, Stuttgart, Nemčija).

Temperaturo celične suspenzije na vhodu in izhodu iz komore smo izmerili s termometrom Prosens z modulom PRS-100 (OpSens, Quebec, Kanada). Merjenje temperature poteka preko optičnega vlakna, konica ima GaAs kristal premera 170  $\mu\text{m}$ , zato se hitro odziva na spremembe in je primerna tudi za meritev temperature vzorca z zelo majhno prostornino, poleg tega pa električno polje ne vpliva na meritve.

---

## 2.3. Poskusi na celicah

Za vse poskuse pri razvoju komore smo uporabili ovarijske celice kitajskega hrčka (Chinese hamster ovary cells, CHO; European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK). Za poskuse z elektroporiranimi celicami smo najprej prav tako uporabili celice CHO, nato pa še celice mišjega melanoma B16F1 (European Collection of Cell Cultures). Celice CHO so bile nasajene v gojišču Ham's Nutrient Mixtures (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria) s fetalnim telečjim serumom (FBS, Sigma-Aldrich, ZDA) ter antibiotikoma crystacillin (Pliva, Zagreb, Croatia) in gentamycin (Sigma-Aldrich), kjer so 2 do 4 dni rasle v inkubatorju (Kambič, Slovenija) pri 37°C v atmosferi s 5 % CO<sub>2</sub>. Celice so bile suspendirane z 0.05 % tripsinom in 0.2 % etanolaminom (ETA, Sigma-Aldrich), od tripsina in rastnega medija pa smo jih ločili s centrifugiranjem (1000 rpm, 4°C, 5 min). Celice B16F1 so bile nasajene v gojišču Eagle's minimum essential medium (EMEM) s fetalnim telečjim serumom, vsi postopki so bili enaki kot pri celicah CHO.

52

Toplotno obdelane celice smo pridobili s segrevanjem celic suspendiranih v gojišču v centrifugirki v vodni kopeli pri 50°C 15 min. Celice so ohranile svojo obliko, niso pa izkazovale dolgoročnega preživetja.

Za elektroporacijo in ločevanje celic smo celice suspendirali v mediju, v katerem smo izvajali tudi dielektroforetsko ločevanje (DEP mediju), ki smo ga pripravili iz 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in 1 mM MgCl<sub>2</sub>, ki smo ga razredčili s 250 mM raztopino saharoze, tako da je prevodnost znašala 27 mS/m, osmolarnost pa 260 mOsm (Ušaj *et al.* 2009).

Za elektroporacijo smo uporabili Cliniporator™ (Igea, Italija). Vlak osmih pravokotnih pulzov s trajanjem 100 ms in frekvenco 1 Hz smo dovedli na elektroporacijsko kiveto z 1 mm razdaljo med elektrodama (Eppendorf, Hamburg, Nemčija). Čas med končanim dovajanjem elektroporacijskih pulzov in dielektroforetskem ločevanjem je znašal od 12 do 15 s.

Učinkovitost ločevanja smo merili na dva načina; v prvem načinu smo del celic obarvali s fluorescentnim barvilom, toplotno obdelali neobarvane celice in prešteli deleže obarvanih in neobarvanih celic na izhodu, v drugem primeru pa smo ločeno za vsak tip celic posneli elucijski profil na izhodu (število celic v odvisnosti od časa).

V prvem načinu merjenja smo celice gojili v dveh posodah (TPP, Trasadingen, Švica). Dve uri pred tripsinizacijo smo celice v eni posodi označili s fluorescentnim barvilom CellTracker Orange CMRA (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) po protokolu proizvajalca. Neobarvane celice, suspendirane v gojišču, smo toplotno obdelali v vodni kopeli pri 50°C trajanja 15 min. Obarvane in toplotno obdelane celice smo ločeno centrifugirali, pelet resuspendirali v DEP mediju, ponovno centrifugirali in resuspendirali v DEP mediju. Obarvane celice smo zmešali s toplotno obdelanimi v razmerju 1:1, končna gostota celic je bila 2·10<sup>6</sup> celic/ml.

Kapljico celične suspenzije s prostornino 5 µl smo med konstantnim pretokom medija vbrizgali v komoro ( $t = 0$  s), vsako minuto odpipetirali celično suspenzijo na izhodu iz komore in zajeli sliko vzorcev na fluorescentnem mikroskopu Axiovert 200 (Carl Zeiss MicroImaging, Göttingen, Nemčija) s CCD kamero VisiCam 1280 (Visitron Systems, München, Nemčija) in programskim paketom za zajem slik MetaMorph 7.0 (Molecular Devices, Sunnyvale, ZDA). Prešteli smo število

obarvanih celic na fluorescentnih slikah in število vseh celic na fazno-kontrastnih slikah in določili razmerje števila neobdelanih in toplotno obdelanih celic. Rezultat je povprečje štirih meritev.

V drugem načinu merjenja smo z namenom povečanja frekvence vzorčenja na izhodu izmerili elucijski profil za vsak tip celic posebej. Izmerili smo profile neobdelanih, toplotno obdelanih in elektroporiranih celic. Celično suspenzijo z gostoto  $2 \cdot 10^7$  celic/ml smo enako kot v prvem načinu vbrizgali v komoro in tik pred izhodom iz komore pod mikroskopom Axiovert 200 vsaki 2 s posneli sliko. Zaporedje slik smo obdelali v odprtokodnem programu ImageJ (NIH Image, Bethesda, ZDA). Od posamezne slike smo odšteli sliko ozadja, nato pa smo slike upragovili in na črno-belih slikah z avtomatskim štetjem (funkcija *Particle analyzer*) določili število celic na posamezni sliki. Če celice niso bile jasno vidne ali pa so se prekrivale, smo celice na slikah prešteli ročno. Elucijske profile smo normirali s skupnim številom prešteti celic in združili v 10 s intervale. Vsako meritev pri izbranem naboru parametrov smo ponovili vsaj trikrat.

Preživetje celic v DEP mediju smo izmerili s testom MTS (Promega, WI, ZDA) po navodilih proizvajalca. Celice v DEP mediju smo elektroporirali, kot je opisano v prejšnjem odstavku in jih nasadili v gojišče v mikrotitrsko ploščo s 96 razdelki (5000 celic na razdelek). Po dveh dneh rasti v inkubatorju smo izmerili absorbanco s spektrofotometrom Infinite M200 (Tecan, Švica). Rezultate smo normirali z absorbanco neporiranih celic.

Delež poriranih celic pri določeni jakosti električnega polja smo določili z barvanjem celic s propidijevim jodidom (PI, Sigma-Aldrich), ki ne prehaja skozi nepoškodovano membrano, če pa vstopi v celico, se mu močno poveča fluorescenca. Tik pred poracijo smo PI dodali celični suspenziji tako, da smo dosegli končno koncentracijo 0.1 mM. Po poraciji smo pod mikroskopom (Axiovert 200) prešteli obarvane in neobarvane celice. Za vsak nabor parametrov smo prešteli vsaj 300 celic, poskus pa je bil ponovljen trikrat ob različnih dnevih.

Izmerili smo tudi velikost neporiranih in poriranih celic v DEP mediju. Pod mikroskopom Axiovert 200 smo posneli slike celic na objektnem steklu pri  $40\times$  povečavi, ločljivost slike je bila  $6.053 \mu\text{m}$ . Premer celic na slikah smo izmerili v programu ImageJ (NIH Image). Izmerili smo velikost 30 celic vsakega tipa, poskus ponovili v treh različnih dnevih in izračunali povprečno vrednost. premera.



## 3. REZULTATI IN RAZPRAVA

### 3.1. Izdelava komore za DEP-FFF in preizkus delovanja

Izdelava komore in protokola za DEP-FFF ločevanje celic je opisana v Članku I, v nadaljevanju pa sledi širši povzetek.

Dielektroforetska sila je proporcionalna gradientu kvadrata električnega polja, zato smo optimirali dimenzije elektrod in komore, da bi se razlika med posameznimi tipi celic kar najbolje izrazila v času potovanja celic skozi DEP-FFF komoro. Širina posamezne elektrode in razdalja med njimi določa porazdelitev električnega polja in njegov gradient v komori. Zaradi razlike v električnih in geometrijskih lastnostih posamezen tip celic zavzame svojo tipično ravnotežno višino, ki mora biti za vse celice v spodnji polovici kanala. Ta pogoj je običajno izpolnjen ne glede na specifično zgradbo komore, saj gradient električnega polja zelo hitro upada z oddaljenostjo od elektrod, zato dielektroforetska sila ne zmore dvigniti celic v zgornjo polovico kanala. Ravnotežna višina v kanalu določa hitrost gibanja posameznega tipa celic, zato celice, ki potujejo bližje srednji višini, prispejo na izhod iz kanala najprej, nato pa celice bližje dna kanala. Z numeričnimi izračuni smo pokazali, da je variacija električnega polja na določeni višini v kanalu najmanjša, če sta širina elektrod in razmik med njimi podobne velikosti. Izračunali smo, da so v primeru, ko je višina kanala enaka ali večja od širine elektrod, ravnotežne višine celic ne glede na njihove specifične električne in geometrijske lastnosti, v spodnji polovici kanala. Tako smo izbrali širino posamezne elektrode, razdaljo med njimi in višino kanala 100  $\mu\text{m}$ .

Za opazovanje procesa ločevanja mora biti komora prozorna, zato smo kot osnovno ploščo izbrali borosilikatno steklo, pokrov pa je bil izdelan iz cenovno ugodnega natrijevega stekla, v katerem sta bili izvrtini za priključevanje cevi. Elektrode smo izdelali iz zlata, saj so odporne na korozijo in tako kot steklo kemično inertne. Občutljive pa so na enosmerni tok, ki povzroči elektrolizo in uničenje elektrod.

Dolžina kanala je bila 80 mm, saj je bila omejitev premer borosilikane plošče 100  $\mu\text{m}$ . Širina področja elektrod je bila 20 mm, višina kanala 100  $\mu\text{m}$ , tako da je bila prostornina kanala 160  $\mu\text{l}$ . S tako veliko komoro je mogoče ločevati desetisoče celic v eni šarži.

Stekli smo zlepili skupaj z obojestranskim lepilnim trakom, v katerega smo izrezali odprtino v obliki kanala. Tesnila, kot so teflonska, lateks ali poliolefin/parafinska (Parafilm) folija, omogočajo tesnjenje komore le, če z zunanjim okvirjem enakomerno stisnemo stekleni plošči po celotnem obodu. Obojestranski lepilni trak debeline 100  $\mu\text{m}$  določa višino kanala in omogoča dobro tesnjenje, celotna komora pa je debela le 2.8 mm, saj ne potrebuje okvirja, s tem pa je mogoče tudi opazovati dogajanje v komori pod mikroskopom. Akrilno lepilo je vodoodporno, pri temperaturi nad 70 °C pa se sila lepljenja zmanjša, zato je komoro mogoče razstaviti v topli vodi in jo temeljito očistiti z alkoholom ali acetonom, pri ponovnem sestavljanju pa je potrebno uporabiti le nov kos lepilnega traku z izrezano odprtino v obliki kanala. Komoro smo z vzmetmi pritrdili na ploščo iz nerjavečega jekla, ki je dimenzijsko ustrezala pomični mizici na mikroskopu. Izdelana komora je prikazana v članku I na sliki 6 (Fig. 6).

---

Na izdelanih elektrodah je bil posamezen trak elektrode širok 115  $\mu\text{m}$ , razmik med sosednjima trakovima pa 75  $\mu\text{m}$ . Odstopanje od načrtovane vrednosti 100  $\mu\text{m}$  je posledica tehnološkega procesa. Amplitudo in frekvenco napetosti na elektrodah smo izbrali tako, da omogoča kar najbolj učinkovito ločevanje celic, hkrati pa je električno polje dovolj šibko, da ne poškoduje celic. Pri amplitudi  $\pm 3\text{ V}$  je bila maksimalna jakost električnega polja 500 V/cm in še to le povsem ob robovih elektrod. Za uspešno ločevanje v komori DEP-FFF mora vsaj na en tip celic delovati negativna dielektroforetska sila. Pri vrednostih parametrov, podanih v tabeli v članku I (Table 1) je teoretična mejna frekvenca netretiranih celic CHO 65 kHz, toplotno obdelanih celic pa 78 kHz. Pri 65 kHz bi bila sila na toplotno obdelane celice 25 % višja od sile na neobdelane celice, zato bi bila ravnotežna višina prvih 42  $\mu\text{m}$ , drugih pa 29  $\mu\text{m}$ . Pri pretoku medija 30  $\mu\text{l}/\text{min}$  bi bila hitrost prvih 0.41  $\mu\text{m}/\text{s}$ , drugih pa 0.35  $\mu\text{m}/\text{s}$ . Na izhod iz komore bi najprej prišle toplotno obdelane in nato še neobdelane celice.

56

Učinkovitost ločevanja v izdelani komori smo preizkusili z ločevanjem toplotno obdelanih celic od neobdelanih. Segrevanje na 50°C poveča fluidnost membrane, denaturira proteinske kanale in črpalke, pri tem se poveča električna prevodnost in prepustnost membrane za ione. V nizkoprevodnem mediju zato ioni zapuščajo celico in zniža se prevodnost citoplazme. Toplotna obdelava dolgoročno povzroči smrt celice, kratkoročno pa ta še vedno obdrži svojo obliko.

Komoro smo najprej napolnili z medijem, nato pa vanjo vbrizgali 30  $\mu\text{l}$  suspenzije celic s koncentracijo  $2 \cdot 10^6\text{ ml}^{-1}$ . Razmerje med neobdelanimi in toplotno obdelanimi celicami je bilo 50 % : 50 %. Pri pretoku 30  $\mu\text{l}/\text{min}$  so po 4 min na izhod iz komore začele prihajati toplotno obdelane celice. Vsakih 60 s smo s pipeto vzeli vzorec celic na izhodu, ga prenesli na mikroskopsko steklo in kasneje pod fluorescenčnim mikroskopom določili razmerje toplotno obdelanih (neobarvanih) in neobdelanih (obarvanih) celic. Po 16 min je večina celic prispela na izhod iz komore. V članku I na sliki 9 (Fig. 9) so prikazani rezultati povprečja treh meritev. Če bi do dvanajste minute zbirali celice v eno posodo, kasneje pa v drugo, bi bilo razmerje med živimi (neobdelanimi) in mrtvimi (toplotno obdelanimi) celicami v prvi posodi 25 % : 75 %, v drugi pa 93 % : 7 %. Za mnogo aplikacij povečanje iz 50 % na 90 % predstavlja zadovoljivo čistost vzorca. S toplotno obdelavo pri temperaturi med 70 °C in 90 °C dosežemo večjo razliko v primerjavi z neobdelanimi celicami kot pri segrevanju na 50 °C, zato je uspešnost ločevanja še večja, a tak pristop ni uporaben na celicah sesalcev, saj te tolikšna temperatura uniči. Pri pretoku celične suspenzije ob izključenem polju je bilo na izhodu iz komore razmerje med neobdelanimi in toplotno obdelanimi celicami naključno, kar potrjuje, da je ločevanje celic povzročila dielektroforetska sila.

# Dielectrophoretic Field-Flow Microchamber for Separation of Biological Cells Based on Their Electrical Properties

Jaka Čemažar, Danilo Vrtačnik, Slavko Amon, *Member, IEEE*, and Tadej Kotnik\*

**Abstract**—We describe the development, fabrication and testing of a microfluidic chamber for dielectrophoretic field-flow separation of biological cells based on their electrical properties. The chamber was constructed from a single Pyrex wafer with interdigitated Au electrodes, a spacer, and a top cover glass, making the events in the chamber observable under most optical microscopes. The dimensions were optimized based on numerical computations of the electric field, its gradient and the fluid-flow velocity profile. The electrodes were fabricated using photolithography. A double-sided self-adhesive tape of 100  $\mu\text{m}$  thickness was used as a spacer, with an opening of 80 mm length and 20 mm width cut in its middle to form a channel of 100  $\mu\text{m}$  height, and with water-resistant acrylic glue of the tape holding the glass plates together and providing a tight seal. The glue loses its adhesive properties above 70  $^{\circ}\text{C}$ , allowing for easy disassembly of the chamber in hot water and its thorough cleaning. A 1:1 mixture of normal and 50  $^{\circ}\text{C}$ -heat-treated CHO cells was used to test the chamber. A 93% efficiency of separation was obtained, confirming the usefulness of the chamber in separating cells with sufficient differences in electrical properties of their membranes.

**Index Terms**—Cell separation, dielectrophoresis, field-flow fractionation, microchamber.

## I. INTRODUCTION

**D**IELECTROPHORESIS is the motion of uncharged polarizable particles in a nonuniform electric field [1]. Electric field induces a dipole moment of the particles, and the inhomogeneity of the field results in a net force on each particle (i.e., the time average of the force is not zero). Dielectric force depends on the electric properties of the particles and the surrounding medium, and can be directed either towards higher electric field (if the particle is more polarizable than the medium) or towards lower field (if the particle is less polarizable).

Dielectrophoresis in ac electric fields with frequencies in the kHz and MHz range is a useful method for manipulation of biological cells, because in such fields the undesired (and often detrimental for the cells) electrochemical processes on the surface of the electrodes are almost entirely eliminated, while in dc fields they are always present [2].

Manuscript received July 20, 2010; revised December 16, 2010; accepted March 08, 2011. Date of current version April 27, 2011. This work was supported by the Slovenian Research Agency (Research Program P2-0249). *Assterisk indicates corresponding author.*

J. Čemažar, D. Vrtačnik, and S. Amon are with the Faculty of Electrical Engineering, University of Ljubljana, Ljubljana 1000, Slovenia.

\*T. Kotnik is with the Faculty of Electrical Engineering, University of Ljubljana, Ljubljana 1000, Slovenia.

Digital Object Identifier 10.1109/TNB.2011.2128340

Common uses of dielectrophoresis are in selective cell manipulation, separation of particles, ranging from DNA fragments to eukaryotic cells [3], [4], and cell properties characterization [5], [6]. Separation of cells by dielectrophoresis is possible if the cells in the mixture belong to two (or more) classes, each with either a different geometry or different dielectric permittivity and/or electric conductivity [7], [8]. Different geometrical and electrical properties result in different dielectrophoretic force ( $F_{\text{DEP}}$ ) acting on the cells of each class. The size of  $F_{\text{DEP}}$  also depends on the frequency  $\nu$  of the electric field by which dielectrophoresis is generated, and the plot of  $F_{\text{DEP}}(\nu)$  is termed the dielectrophoretic spectrum. Thus, by exposing the mixture to the ac field with the frequency at which the difference between  $F_{\text{DEP}}$  acting on the cells in the two classes is sufficiently large, spatial separation of the two classes can be achieved.

In the past years a number of systems for dielectrophoretic separation of cells were developed. Based on their principle of functioning, they can in general be divided into two groups: the systems in the first group are based on opposite directions of  $F_{\text{DEP}}$  acting on the two classes of cells, and the systems in the second group on different magnitudes of  $F_{\text{DEP}}$  [9], [10].

The systems based on opposite directions of  $F_{\text{DEP}}$  are useful for separating cells with considerable differences in electrical properties of their plasma membrane, e.g., living cells from dead ones [11]–[13], or normal cells from cancerous or infected ones [7], [14]–[18]. Still, even for cells with substantially different membrane properties, the efficiency of this method can be hampered if the cells within one or both classes have a broad distribution of sizes. Namely, as (1)–(3) in Section II-B show, the magnitude of  $F_{\text{DEP}}$  is roughly proportional to  $r^3$ ; in (1) the term  $r^3$  features directly, while in (3) the two fractions containing  $r$  have values close to 1 (as  $r \gg d$ ).

In the systems based on different magnitudes of  $F_{\text{DEP}}$ , dielectrophoresis is combined with a flow of the medium in which the cells are suspended (the buffer). As we describe in more detail below, these systems largely overcome the two weaknesses of the systems based on opposite directions of  $F_{\text{DEP}}$ : they are much less sensitive to differences in cell size, and are also useful with smaller differences in electrical properties of the cells [8]. In this method, often referred to as field-flow fractionation [9], [11], [15], [16], [19]–[26], separation is based on the balance between the dielectrophoretic force and effective gravitational force (i.e., the total gravitational force decreased by the buoyancy force in the medium). In general, the electrodes are situated at the bottom of the channel through which the suspension

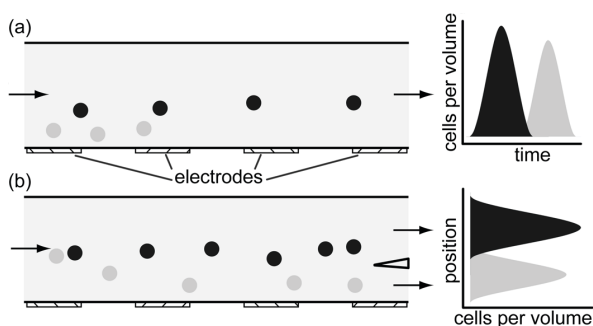


Fig. 1. Dielectrophoretic field-flow fractionation. (a) Temporal separation. A small amount of cell suspension is pumped through the chamber and the cells with equilibrium heights closer to the vertical center reach the output before the cells farther away. (b) Spatial separation. The cells are pumped through the chamber continuously, and separated at the output by the vertical separators (only one is shown here).

is pumped, and the applied electric field frequency and properties of the buffer are such that dielectrophoresis is negative and  $F_{\text{DEP}}$  acting on cells is oriented roughly upwards (i.e., towards lower field). As the gravitational force is proportional to the mass of the cell and thus roughly to  $r^3$ , and the oppositely directed  $F_{\text{DEP}}$  is also roughly proportional to  $r^3$  (see the preceding paragraph), this reduces the dependence of the separation on cell size considerably.

The channel height in field-flow fractionation chambers ranges from tens to hundreds of micrometers, and the typical channel length is several centimeters. This ensures that the flow is laminar and has a parabolic velocity profile. Since the cells have a slightly higher density than the surrounding buffer, the gravitational force pulls them towards the bottom of the chamber, but as they move closer to the electrodes this simultaneously results in an increasing  $F_{\text{DEP}}$ , while the gravitational force remains constant. In this manner, each cell acquires a vertical position in which the two forces are in equilibrium. Due to the parabolic flow profile, cells at different vertical position within the channel have different velocities, with the cells at the middle of the channel height flowing the fastest and reaching the chamber output first, and with the cells levitating near the bottom or near the top flowing the slowest and coming out last.

The described mechanism can be used for separation in two ways. In temporal separation, a batch of the cell suspension is injected into the channel and pumped through it at a constant rate (volume per unit time). As the distinct classes of cells are separated vertically, the parabolic vertical distribution of velocities results in the cells of different classes reaching the chamber output at different times [Fig. 1(a)]. If the containers at the output are interchanged at appropriate times, the distinct classes of the cells can be collected each into its separate container.

In spatial separation, the chamber output contains one or several vertical separators that split the flow. Thus, the cells belonging to several classes can be collected into their containers simultaneously, and with new batches of cells injected into the channel, the process can continue indefinitely [27] [Fig. 1(b)].

Still, the three-dimensional structures required in such spatial separation chambers make them more difficult to manufacture. Moreover, in typical designs the parts of the chamber are bonded

together permanently, so that disassembling and reassembling the chamber is not possible, which also makes it hard to clean the chamber thoroughly. On the other hand, as temporal separation requires a substantial horizontal splitting of the two classes in order to be efficient, the channel in such chambers has to be much longer than in the spatial separation chambers, in which the cells only need to acquire their equilibrium heights to be collected into the proper container. Thus, in spatial separation chambers, the channel can be as short as 6 mm [11], while for temporal separation, the shortest useful channels are in the range of 15–25 mm [9], [21], [23].

As the resolution of temporal separation increases with the channel length, this in general provides the motivation for design of chambers as large as technically feasible, and a prototype with a channel as long as 388 mm has been reported [15]. However, the increase in channel length and thereby resolution is accompanied by increasing difficulty of manufacturing the electrodes on a single wafer or substrate. As a consequence, large chambers are typically built from several segments glued or bonded together, which introduces the problem of assembling, disassembling, and cleaning also to the temporal separation chambers.

In this article we describe the development and manufacturing of a temporal separation chamber with a channel 80 mm long, 20 mm wide, and 100  $\mu\text{m}$  high. The bottom surface of the chamber was made from a single Pyrex glass wafer on which an array of 400 interdigitated electrodes was deposited by photolithography. The top surface was also made from glass, which allows for monitoring of the events in the chamber both from the top and from the bottom (between the electrodes). The top and bottom glass are attached to each other by a double-sided self-adhesive tape 100  $\mu\text{m}$  thick and containing an opening that forms the channel. This provides both a tight seal and a fixed and controlled channel height. At the same time, this simple design allows for easy assembly, disassembly, and cleaning of the chamber. The efficiency of our separation chamber was tested by separating normal mammalian cells from ones heat-treated at 50  $^{\circ}\text{C}$ .

## II. MATERIALS AND METHODS

### A. Computation of Electric Field and Its Gradient

The separation chamber was designed in COMSOL Multiphysics 3.5a finite-element analysis software package (Comsol AB, Stockholm, Sweden). Computation of the spatial distribution of the electric field strength and its gradient at various electrode and gap widths was performed by solving the Laplace equation in the ac/dc module of this package [28], [29]. The velocity profile of the buffer flow through the chamber was computed by solving the Navier–Stokes equations for an incompressible laminar flow [28].

### B. Computation of Dielectrophoretic Force

The computation of dielectrophoretic force was based on the single-shell spherical model of a cell as derived in [30], with the vector of the force given by

$$\mathbf{F}_{\text{DEP}} = 2\pi r^3 \epsilon_e \text{Re}[f_{\text{CM}}] \text{grad}(|\mathbf{E}|^2), \quad (1)$$



TABLE I  
THE RADIUS, MEMBRANE THICKNESS, ELECTRIC CONDUCTIVITIES AND DIELECTRIC PERMITTIVITIES OF NORMAL AND HEAT-TREATED CELLS AND THE SURROUNDING MEDIUM. THE VALUES OF  $\sigma_e$  AND  $\varepsilon_e$  ARE THOSE OF THE PHOSPHATE BUFFER SALINE COMPOSED AS DESCRIBED IN SECTION II.E. FOR THE COMMENT ON [34] MARKED BY AN ASTERISK; SEE THE MAIN TEXT

	unit	normal	heat-treated	source
$r$	m	$5.9 \times 10^{-6}$	$5.4 \times 10^{-6}$	measured
$d$	m		$4 \times 10^{-9}$	[31]
$\sigma_e$	S/m		0.03	measured
$\varepsilon_e$	As/Vm		$6.9 \times 10^{-10}$	[32]
$\sigma_m$	S/m	$3 \times 10^{-7}$	$1.5 \times 10^{-6}$	[33], [34]*
$\varepsilon_m$	As/Vm		$6.2 \times 10^{-11}$	[35]
$\sigma_i$	S/m		0.5	[36]
$\varepsilon_i$	As/Vm		$5.3 \times 10^{-10}$	[35]

with

$$f_{CM} = \frac{\varepsilon'_c - \varepsilon'_e}{\varepsilon'_c + 2\varepsilon'_e} \quad (2)$$

and

$$\varepsilon'_c = \varepsilon'_m \left( \frac{r}{r-d} \right)^3 + 2 \frac{\varepsilon'_i - \varepsilon'_m}{\varepsilon'_i + 2\varepsilon'_m} \quad (3)$$

with

- $|\mathbf{E}|$ : the amplitude of the applied ac electric field with frequency  $\nu$ ,
- $\text{Re}[f_{CM}]$ : the real part of the Clausius–Mossotti factor;
- $r$ : the cell radius;
- $d$ : the membrane thickness;
- $\varepsilon'_e, \varepsilon'_m, \varepsilon'_i$ : the complex dielectric permittivities of the external medium, membrane, and the cell interior (cytoplasm), respectively, each given by  $\varepsilon' = \varepsilon - j\sigma/(2\pi\nu)$ , where  $\varepsilon$  and  $\sigma$  are the dielectric permittivity and the electric conductivity of the region.

Equations (1)–(3) are accurate for cells in suspensions (as they are roughly spherical), provided that they are sufficiently far from each other (i.e., in dilute suspensions) as well as from the electrodes [2], [30].

Table I specifies the values of the geometric and electric parameters featuring in (1)–(3) as they were used in our analysis. It should be noted that the electric parameters of the cell membrane and the cytoplasm are taken from reported measurements on erythrocytes, leukocytes, and yeast cells, as to our knowledge no such measurements have yet been published for CHO cells. Still, as the major lipid and protein membrane constituents are similar for most cell types, and so is the ionic composition of the cytosol, it seems safe to assume that the electric parameters in Table I are applicable, at least to the order of magnitude, also to CHO cells. Furthermore, in a study on yeast cells, Huang *et al.* [34] have estimated that heat-treatment at 75 °C can increase the membrane conductivity by a factor of about 500, but since our heat-treatment was performed at a much more moderate temperature of 50 °C, we assumed a conservative factor of 5.

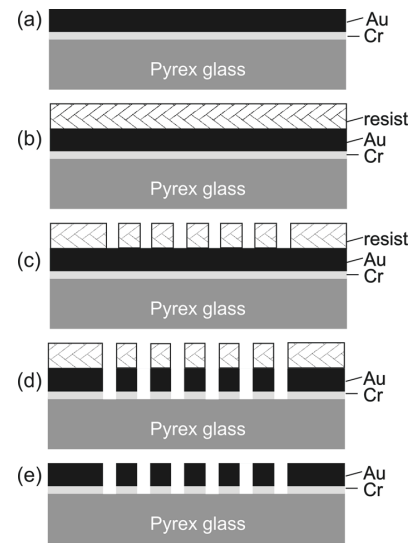


Fig. 2. Fabrication of the electrodes. (a) Deposition of chromium and gold by sputtering. (b) Spin-on of the photoresist. (c) Development of the photoresist. (d) Wet-etching of the metallic layers. (e) Removal of the photoresist.

$F_{DEP}$  as given by (1)–(3) was computed in Matlab (Mathworks, Natick, MA), with the electric field gradient precomputed in COMSOL Multiphysics 3.5a (see Section II-A). For relatively dense suspensions and for cells near the electrodes, a more accurate estimate was obtained by numerical computation of the Maxwell stress tensor in COMSOL Multiphysics 3.5a as available for postprocessing in the ac/dc module.

#### C. Fabrication of Electrodes

The fabrication of the electrodes was based on photolithography, and the complete process is outlined in Fig. 2. The mask was drawn in ZWCAD 2009 (ZWCAD Software Co., Guangzhou, China) and printed on Creo Scitex Dolev 800 imagesetter (Creo Inc., Burnaby, Canada; now part of Eastman Kodak Co., Rochester, NY). The starting material was Pyrex 7740 both sides mechanically polished ( $R_a < 1.5$  nm) wafer of 100 mm diameter and 700  $\mu\text{m}$  thickness (Corning Inc., Corning, NY). After wet chemical cleaning of the Pyrex substrate in the SC1 solution ( $\text{NH}_4\text{OH} : \text{H}_2\text{O}_2 : \text{H}_2\text{O}$  in 1:1:5 ratios) at 75 °C for 10 min, the metal sandwich of Cr and Au, with 50 nm and 150 nm thicknesses respectively, was deposited by sputtering. The photoresist layer (HPR 504, Arch Chemicals, Norwalk, CT) was then spun-on onto the metal-covered substrate surface, patterned, developed and hard baked at 120 °C. This process was followed by wet chemical etching of thin Au and Cr layers. Finally, stripping of the photoresist layer at 60 °C for 30 min in AZ100 Remover (MicroChemicals GmbH, Ulm, Germany) completed the fabrication of the electrodes.

#### D. Other Chamber Components

The top surface of the chamber was made of soda-lime glass of 100 mm length, 50 mm width and 2 mm thickness (Omahen d.o.o., Ljubljana, Slovenia). The holes through the top surface were drilled with a 2 mm diameter diamond drill bit using

the Dremel 398 drill (Dremel Europe B.V., Breda, The Netherlands). The double-sided self-adhesive tape (Isotrade Jereb k.d., Slovenia) was 50 mm wide, 100  $\mu\text{m}$  thick, and made of biaxially oriented polypropylene (BOPP), with nontoxic water-resistant acrylic glue.

### E. Cell Culturing and Preparation

Chinese hamster ovary CHO cells (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, U.K.) were grown in two culture flasks (TPP AG, Trasadingen, Switzerland) in Ham's F-12 culture medium (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria) supplemented with 2 mM glutamine (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO), 10% fetal bovine serum (PAA Laboratories GmbH) and antibiotics crystalin (Pliva, Zagreb, Croatia), gentamycin (Sigma-Aldrich Corp.) at 37 °C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere.

In the first flask, the cells were labeled fluorescently with CellTracker Orange CMRA (Invitrogen, Carlsbad, CA) following manufacturer's protocol and detached from the flask surface by trypsination in 0.25% trypsin/EDTA (Sigma-Aldrich Corp.). The obtained suspension was centrifuged for 5 min (1000 rpm at 4 °C), resuspended in an isoosmotic phosphate buffer saline prepared as in Usaj *et al.* [37] and diluted with 250 mM sucrose buffer to adjust the conductivity to 27 mS/m at preserved isoosmolarity. The suspension was again centrifuged and resuspended in the buffer of same composition at final concentration of  $2 \times 10^6$  cells/ml. This yielded a suspension of fluorescently labeled living cells.

In the second flask, the protocols of trypsination and preparation of cell suspension were the same as in the first flask, except that fluorescent labeling was not performed, and before the two centrifugations, the cells were heat-treated in the culture medium by placing the vial with the cell suspension into a water bath at 50 °C for 15 min. This yielded a suspension of unlabeled cells that showed no long-term viability.

The two cell suspensions were mixed together in a 1:1 ratio to obtain a mixture of living and dead cells for subsequent separation in the chamber.

### F. Testing of the Separation Chamber

Voltage of 6 V peak-to-peak amplitude at 65 kHz was delivered to the electrodes of the chamber by a function generator (33250A, Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA). Silicon tubes with 1.5 mm inside diameter (Graupner GmbH & Co. KG, Stuttgart, Germany) were connected to the chamber and a 1 ml syringe (Monoject, Kendall, Mansfield, MA, USA) mounted onto the syringe pump (Aladdin, WPI Inc., Boulevard Sarasota, FL). The flow of cell suspension through the channel was monitored on Axiovert 200 inverted microscope (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Germany) equipped with a cooled CCD video camera VisiCam 1280 (Visitron Systems GmbH, Munich, Germany) and MetaMorph 7.0 image acquisition software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). The sequence of images taken at 6 fps was used to calculate the velocity of individual cells and to estimate their equilibrium height (vertical position within the channel). The samples collected at the output of the separation chamber were analyzed using the

same combination of microscope, camera, and acquisition software, with the total number of cells counted in phase-contrast images, and the number of living cells in fluorescence images. The final separation results were pooled from 4 independent experiments.

## III. RESULTS AND DISCUSSION

### A. Computer-aided Chamber Design

As (1) shows, the dielectrophoretic force is proportional to the gradient of the square of the electric field. For efficient field-flow fractionation, the channel height, electrode dimensions, and the applied electric field amplitude should be chosen in a manner that provides a significant vertical variation of the field gradient in the channel. This assures that cells with different electric properties will attain different equilibrium heights, and thus different horizontal velocities in the flow. Still, due to the parabolic flow velocity profile, two classes of cells with rather distinct electric properties could attain similar horizontal velocities, provided that the two classes would have similar equilibrium distances from the vertical center, one above and the other below it. To avoid this, significant vertical variation of the field gradient should be limited to the bottom half of the channel, making both the dielectrophoretic force in the upper half of the channel and its variation there small. With the designs in which the electrodes are confined to the bottom surface of the channel, this requirement is not difficult to achieve, as the field gradient decreases rapidly with the distance from the electrodes, and it suffices to choose an adequate channel height for given electrode dimensions and given range of field amplitudes to be used.

Numerical parametrization shows that the best results are obtained if the electrode width and the interelectrode gap are of similar size. Namely, as seen in Fig. 3, the variation of  $\text{grad}(|\mathbf{E}|^2)$  – and thus also of  $F_{\text{DEP}}$  – along the channel at any fixed height is much smaller in this case than if the differences between the electrode width and interelectrode gap are large (note the logarithmic vertical scale).

Fig. 3(b) shows that for chambers in which the electrode width is similar to the interelectrode gap,  $|\text{grad}(|\mathbf{E}|^2)|$  at vertical heights exceeding one-half of the electrode width is very small compared to its largest values at heights closer to the bottom. This is also seen in Fig. 4, which shows the complete spatial distribution of  $|\text{grad}(|\mathbf{E}|^2)|$  in the channel analyzed in Fig. 3(b). As a consequence, the chamber design requirement that the cells should not attain equilibrium positions above the vertical center of the channel is met if the channel height does not exceed the electrode width.

### B. Selection of Materials and Chamber Assembly

To allow for monitoring of the separation process in the chamber, both the top and the bottom of the channel were made of glass; from the bottom, the monitoring is possible through the interelectrode gaps. The Pyrex glass used for the bottom of the channel withstands the high temperatures of the photolithographic electrode fabrication (see Section II-C), while the soda-lime glass used for the top is inexpensive and resistant to moderate mechanical stress. The golden electrodes are chemically inert and resistant to corrosion, but as with any

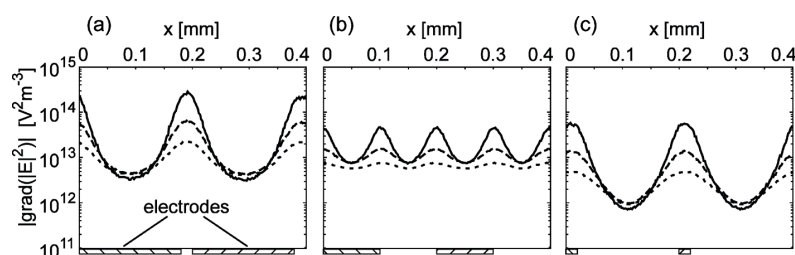


Fig. 3. Variation of  $\log(|\text{grad}(|E|^2)|)$  along the channel at three different ratios between the electrode width and interelectrode gap: (a) 180  $\mu\text{m}$ : 20  $\mu\text{m}$  (ratio 9:1), (b) 100  $\mu\text{m}$ : 100  $\mu\text{m}$  (1:1), (c) 20  $\mu\text{m}$ : 180  $\mu\text{m}$  (1:9). In all three cases, the chamber height is 100  $\mu\text{m}$ , while the three curves show  $\text{grad}(|E|^2)$  at 20  $\mu\text{m}$  (solid), 35  $\mu\text{m}$  (dashed), and 50  $\mu\text{m}$  (dotted) from the bottom of the chamber. The computations were performed in COMSOL Multiphysics.

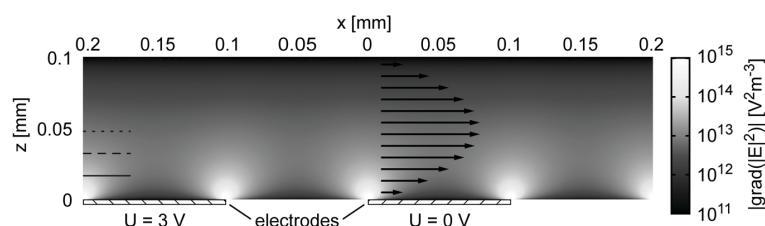


Fig. 4. Variation of  $\log(|\text{grad}(|E|^2)|)$  along the channel with electrode width, interelectrode gap, and channel height of 100  $\mu\text{m}$  each. The solid, dashed and dotted horizontals mark the lines along which the three corresponding curves in Fig. 3(b) are plotted. The arrows show the flow velocity profile as a function of vertical position within the channel. All the computations were performed in COMSOL Multiphysics.

electrodes made of metal, delivery of substantial direct current should be avoided to prevent their electrolytic dissolution. The layer of chromium between the glass and the layer of gold ensures stable adhesion.

The channel length was set at 80 mm (limited by the 100 mm diameter of the circular Pyrex 7740 wafer and by the photolithographic procedure), and the channel width at 20 mm. With 100  $\mu\text{m}$  channel height, this resulted in the total channel volume of 160  $\mu\text{l}$ . With typical (dilute) cell suspensions containing millions of cells per ml, this allows for separation of a batch containing tens of thousands of cells.

For controlled experiments, the spacer should provide a fixed and well-defined channel height, and we tested 100  $\mu\text{m}$  sheets of several materials for this purpose. With Teflon, latex, and polyolefin/paraffin (Parafilm) sheets, a tight seal can only be achieved if the glass-spacer-glass sandwich is pressed together rather strongly and uniformly (e.g., by an adequate array of clamps). However, the large pressures applied can deform the spacer and affect its thickness, and they can also cause one or even both of the glass surfaces to break. In our chamber, we thus finally opted for a 100  $\mu\text{m}$  thick double-sided self-adhesive tape made of biaxially oriented polypropylene (BOPP), with non-toxic acrylic glue. The tape width was 50 mm, and the channel was made by cutting an 80 mm  $\times$  20 mm opening in the center of a 100 mm  $\times$  50 mm chunk of the tape. Both the BOPP and the acrylic glue are water resistant, thereby providing a reliable and tight seal for the glass-spacer-glass sandwich. At temperatures above 70  $^{\circ}\text{C}$ , however, the acrylic glue loses its adhesive properties, which allows for easy disassembly of the sandwich in hot water, and the remaining traces of glue on the glass surfaces can then be removed by ethanol or acetone. A new chunk of tape must thus be used as a spacer every time the chamber is disassembled and reassembled, but the cost of this is rather negligible.

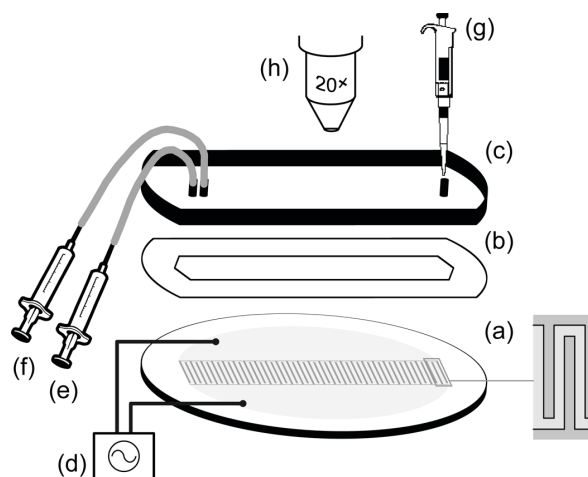


Fig. 5. The separation chamber and supplementary experimental equipment: (a) Pyrex wafer with the electrodes, (b) spacer, (c) top glass surface, (d) electric field generator, (e) syringe with pure buffer, (f) syringe with the suspension of cells, (g) pipette for collecting the samples at the chamber output, (h) microscope for monitoring of the events within the chamber.

The chamber made as described above is only 2.8 mm thick, which makes it suitable for observation under most optical microscopes. In our setup, the chamber was fastened to a stainless steel plate with stainless steel springs to hold the chamber in place. The plate was of the same dimensions as the standard Zeiss mounting frame, and could thus be positioned in its place and manipulated precisely by the object guide of the microscope.

Fig. 5 displays the components of the chamber and of a general experimental setup, and Fig. 6 shows the actual system as used in our experiment described in Section III-C.

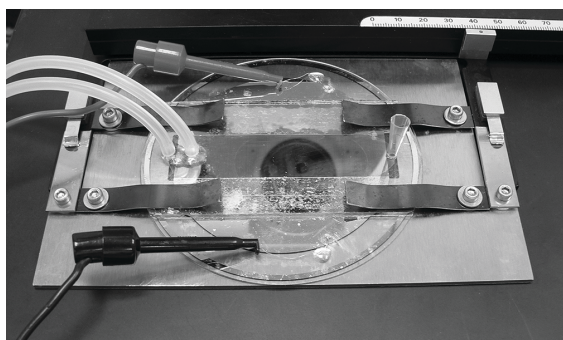


Fig. 6. The separation chamber connected to the syringes and to the electric field generator, and fixed on the mounting frame for observation under the microscope.

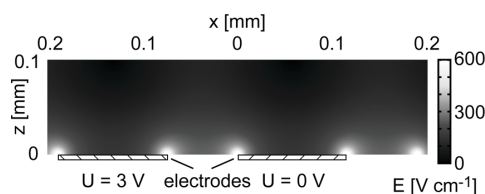


Fig. 7. Variation of  $|E|$  along the channel with  $115 \mu\text{m}$  electrode width,  $75 \mu\text{m}$  interelectrode gap, and  $100 \mu\text{m}$  channel height. The computations were performed in COMSOL Multiphysics.

C. Selection of Electric Field Amplitude and Frequency

At a given electrode width, interelectrode gap, and channel height, the dielectrophoretic force increases with the increase of electric field generated by the voltage between adjacent electrodes. Thus, a higher electric field provides a more efficient separation, but the highest field useful for this purpose is in general limited by the requirement that it should not affect the viability of the cells. Therefore, even at the close proximity to the electrodes, the field amplitude should remain below the values that cause cell membrane electroporation. The threshold value for this phenomenon is in the range of several hundred V/cm, depending on the cell size and shape [38], as well as cell type [39].

Fig. 7 shows the spatial distribution of  $|E|$  for the separation chamber with  $115 \mu\text{m}$  electrode width,  $75 \mu\text{m}$  interelectrode gap,  $100 \mu\text{m}$  channel height, and 3 V interelectrode voltage, which was built by our group and is described in more detail in subsequent paragraphs (the deviation of our  $115 \mu\text{m}/75 \mu\text{m}$  spacing from the ideal  $100 \mu\text{m}/100 \mu\text{m}$  spacing is due to the fabrication process). Fig. 7 shows that the maximum value of  $|E|$  in the channel is about 500 V/cm, which is below the electroporation threshold for sinewave fields acting on the CHO cells that were used to test this chamber (see Section III-C) [40]. For other cell types, the applied interelectrode voltage should be adjusted accordingly.

For successful field-flow separation,  $f_{CM}$  of at least one class of CHO cells (either normal, or heat-treated) must be negative, so that  $F_{DEP}$  is oriented upwards. Moreover, for the cells in this class to attain equilibrium heights above the bottom of the chamber,  $F_{DEP}$  at the bottom must exceed the effective gravitational force acting on the cells (i.e., the difference between the total gravitational force and the buoyancy force).

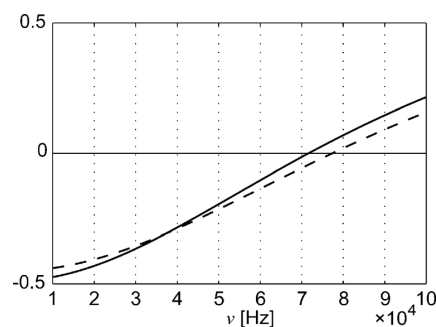


Fig. 8. The theoretically predicted dielectrophoretic spectra,  $f_{CM}(\nu)$ , of normal (solid) and heat-treated (dashed) CHO cells in the phosphate buffer saline composed as described in Section II-E. The scale is linear for clearer distinction of the cross-over frequencies (72 kHz for normal cells, 78 kHz for heat-treated cells).

To determine the electric field frequency for which these criteria are met, we estimated the dielectrophoretic spectra for normal and heat-treated CHO cells. These were obtained by inserting the values of the geometric and electric parameters of the CHO cells and the surrounding medium from Table I into (1)–(3), and are shown in Fig. 8. To ensure that  $F_{DEP}$  acted upwards on at least one class of CHO cells despite possible deviations of actual parameter values from the assumed ones, we set the field frequency at  $\nu = 65 \text{ kHz}$ . According to the spectra shown in Fig. 8, at 65 kHz  $F_{DEP}$  would act upwards on both classes of cells, with the force on the heat-treated cells about 25% higher than on the normal ones. Under these conditions and assuming the cell density of  $1072 \text{ g/cm}^3$  [16], the equilibrium between the dielectrophoretic and the effective gravitational force would be attained at about  $42 \mu\text{m}$  for heat-treated cells, and at about  $29 \mu\text{m}$  for normal ones. At the flow rate of  $30 \mu\text{l/min}$ , this would correspond to  $0.41 \text{ mm/s}$  for heat-treated cells, and to  $0.35 \text{ mm/s}$  for normal ones, so that over the 8 cm length of the channel the normal cells would accumulate a lag of about 12 mm behind the heat-treated ones. In this estimate, we assume that the velocity of the cells is equal to the velocity of the medium, which is based on theoretical considerations detailed in [41], [42].

D. Cell Separation

The efficiency of the separation chamber was tested by separation of viable cells and cells that were heat-treated only to the extent that they still retained their normal shape and appearance, losing only their long-term viability (see Section II-E). Thus, while typical heat-treatments are performed at temperatures over  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  [11], [12], [43], we only exposed the cells to  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ .

The chamber was first filled with pure buffer, followed by an injection of a  $30 \mu\text{l}$  batch of the cell suspension (1:1 mixture of viable and heat-treated cells in the buffer at a total  $2 \times 10^6 \text{ cells/ml}$ ), and followed again by pumping of pure buffer, all at a constant flow rate of  $30 \mu\text{l/min}$ . The first cells reached the output 4 min after their injection, and starting from that time, every minute the  $30 \mu\text{l}$  sample reaching the output was pipetted onto a separate microscope slide, and the cells were counted as described in Section II-F. After 16 min, most

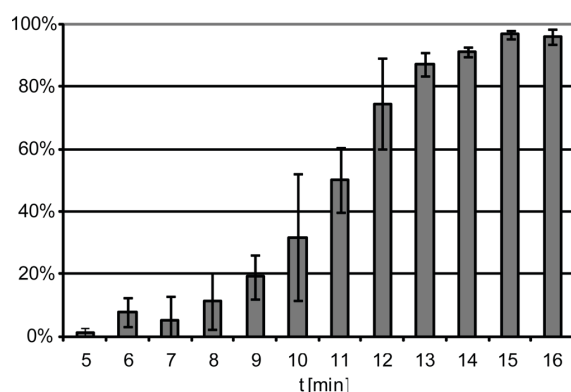


Fig. 9. Fraction of viable cells within the samples reaching the output of the separation chamber in one-minute sampling intervals ("5" represents the sample collected in the time interval from 4:01 to 5:00, etc.). The column heights give the mean values, and the error bars give the standard deviations of 4 independent experiments.

of the cells reached the output and the experiment was ended. The results are shown in Fig. 9, confirming the theoretical expectation that the non-viable cells reach the output first and viable cells later (see Section III-C).

By collecting the samples up to the 12th minute into one container, and all the later samples into a second one, the ratio of viable to nonviable cells would be 25% : 75% in the first container, and 93% : 7% in the second one. For many applications, the second ratio represents a satisfactory separation efficiency. It should be noted that separation efficiencies close to 100% reported in some experiments were obtained with cells heat-treated at temperatures ranging from 75 °C to 90 °C [11], [34], [43], and it is safe to assume that such cells differ from normal ones by a much larger extent than the cells heat-treated at 50 °C (as used here). Still, with optimization of the electric field frequency, flow rate, sampling intervals, etc., the separation efficiency obtained here could likely be improved further.

An additional experiment was performed by pumping the cell mixture through the chamber under the same conditions as above, but in the absence of the electric field. In this case, the ratio of viable and non-viable cells varied randomly through the subsequent samples, with no significant peak of either viable or non-viable cells in any of the samples. This implies that in the absence of the dielectrophoretic force, there is no significant difference between vertical positions of viable and nonviable cells within the channel, and that the dielectrophoretic force plays the main role in the separation process.

#### IV. CONCLUSIONS

We have described a dielectrophoretic field-flow microchamber for separation of biological cells based on their electrical properties. The chamber design allows for simple assembly, use, disassembly, and cleaning. Its top and bottom surfaces are made of glass, making the events in the chamber observable under most optical microscopes, while the self-adhesive spacer positioned between them provides a tight seal and a fixed and controlled height of the separation channel. The channel volume of 160  $\mu\text{l}$  allows for separation of batches containing tens of thousands of cells, and for applications where

such cell quantities per batch are acceptable, our test at a flow rate of 30  $\mu\text{l}/\text{min}$  proved the chamber efficiency for separating cells with sufficient differences in electrical properties of their membranes. Still, unlike with continuous separation designs, which allow for online tuning of the electric field amplitude and frequency, in the approach presented here these two quantities have to be predetermined either based on theoretical modeling of the spectra, or by a series of optimization runs.

The capacity of separation could be increased by pumping the buffer through the channel at a higher flow rate. At least in principle, this could allow also for separation of cells in which the membrane electrical properties are altered only temporarily, e.g., due to membrane poration by electric field [44], ultrasound [45], or chemical agents (e.g., actinoporins [46] or detergents [5]). The separation efficiency under given experimental conditions could also be improved by optimization of the electric field frequency used for dielectrophoresis under those particular conditions. As a complement, the agreement between theoretical predictions and experimental results could perhaps be enhanced by expanding the single-shell model into a multi-shell one [30], allowing to model, e.g., also the role of the nucleus.

#### REFERENCES

- [1] H. A. Pohl and J. S. Crane, "Dielectrophoresis of cells," *Biophys. J.*, vol. 11, pp. 711–727, 1971.
- [2] H. Liu and H. Bau, "The dielectrophoresis of cylindrical and spherical particles submerged in shells and in semi-infinite media," *Phys. Fluids*, vol. 16, pp. 1217–1228, 2004.
- [3] M. M. Meighan, S. J. R. Staton, and M. A. Hayes, "Bioanalytical separations using electric field gradient techniques," *Electrophoresis*, vol. 30, pp. 852–865, 2009.
- [4] D. Bakewell and H. Morgan, "Dielectrophoresis of DNA: Time- and frequency-dependent collections on microelectrodes," *IEEE Trans. NanoBiosci.*, vol. 5, pp. 139–146, 2006.
- [5] P. Patel and G. H. Markx, "Dielectric measurement of cell death," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 43, pp. 463–470, 2008.
- [6] H. O. Fatoyinbo, K. F. Hoefges, and M. P. Hughes, "Rapid-on-chip determination of dielectric properties of biological cells using imaging techniques in a dielectrophoresis dot microsystem," *Electrophoresis*, vol. 29, pp. 3–10, 2008.
- [7] F. Becker, X. Wang, Y. Huang, R. Pethig, J. Vykoukal, and P. Gascoyne, "Separation of human breast-cancer cells from blood by differential dielectric affinity," *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, vol. 92, pp. 860–864, 1995.
- [8] J. Voldman, "Electrical forces for microscale cell manipulation," *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, vol. 8, pp. 425–454, 2006.
- [9] Y. Huang, X. B. Wang, F. F. Becker, and P. R. C. Gascoyne, "Introducing dielectrophoresis as a new force field for field-flow fractionation," *Biophys. J.*, vol. 73, pp. 1118–1129, 1997.
- [10] G. H. Markx, J. Rousselet, and R. Pethig, "DEP-FFF: Field-flow fractionation using non-uniform electric fields," *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.*, vol. 20, pp. 2857–2872, 1997.
- [11] I. Doh and Y. H. Cho, "A continuous cell separation chip using hydrodynamic dielectrophoresis (DEP) process," *Sens. Actuators A Phys.*, vol. 121, pp. 59–65, 2005.
- [12] C. Iliescu, L. M. Yu, F. E. H. Tay, and B. T. Chen, "Bidirectional field-flow particle separation method in a dielectrophoretic chip with 3D electrodes," *Sens. Actuators B, Chem.*, vol. 129, pp. 491–496, 2008.
- [13] J. Suehiro, G. B. Zhou, M. Imamura, and M. Hara, "Dielectrophoretic filter for separation and recovery of biological cells in water," *IEEE Trans. Ind. Appl.*, vol. 39, pp. 1514–1521, 2003.
- [14] E. M. Nascimento, N. Nogueira, T. Silva, T. Braschler, N. Demierre, P. Renaud, and A. G. Oliva, "Dielectrophoretic sorting on a microfabricated flow cytometer: Label free separation of *Babesia bovis* infected erythrocytes," *Bioelectrochemistry*, vol. 73, pp. 123–128, 2008.
- [15] X. Wang, J. Yang, Y. Huang, J. Vykoukal, F. F. Becker, and P. R. C. Gascoyne, "Cell separation by dielectrophoretic field-flow-fractionation," *Anal. Chem.*, vol. 72, pp. 832–839, 2000.

[16] J. Yang, Y. Huang, X. B. Wang, F. F. Becker, and P. R. C. Gascoyne, "Cell separation on microfabricated electrodes using dielectrophoretic/gravitational field flow fractionation," *Anal. Chem.*, vol. 71, pp. 911–918, 1999.

[17] H. Zhou, L. R. White, and R. D. Tilton, "Lateral separation of colloids or cells by dielectrophoresis augmented by AC electroosmosis," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 285, pp. 179–191, 2005.

[18] P. R. C. Gascoyne, X. B. Wang, Y. Huang, and F. F. Becker, "Dielectrophoretic separation of cancer cells from blood," *IEEE Trans. Ind. Appl.*, vol. 33, pp. 670–678, 1997.

[19] G. D. Gasperis, J. Yang, F. F. Becker, P. R. C. Gascoyne, and X. Wang, "Microfluidic cell separation by 2-dimensional dielectrophoresis," *Biomed. Microdevices*, vol. 2, pp. 41–49, 1999.

[20] L. M. Yu, C. Iliescu, G. L. Xu, and F. E. H. Tay, "Sequential field-flow cell separation method in a dielectrophoretic chip with 3-D electrodes," *J. Microelectromech. Syst.*, vol. 16, pp. 1120–1129, 2007.

[21] D. Holmes, N. G. Green, and H. Morgan, "Microdevices for dielectrophoretic flow-through cell separation," *IEEE Eng. Med. Biol. Mag.*, vol. 22, pp. 85–90, 2003.

[22] C. D. Falokun, F. Mavituna, and G. H. Markx, "AC electrokinetic characterisation and separation of cells with high and low embryogenic potential in suspension cultures of carrot (*Daucus carota*)," *Plant Cell Tiss. Org.*, vol. 75, pp. 261–272, 2003.

[23] G. H. Markx, R. Pethig, and J. Rousselet, "The dielectrophoretic levitation of latex beads, with reference to field-flow fractionation," *J. Phys. D, Appl. Phys.*, vol. 30, p. 2470, 1997.

[24] N. Flores-Rodriguez and G. H. Markx, "Improved levitation and trapping of particles by negative dielectrophoresis by the addition of amphoteric molecules," *J. Phys. D, Appl. Phys.*, vol. 37, pp. 353–361, 2004.

[25] J. Rousselet, G. H. Markx, and R. Pethig, "Separation of erythrocytes and latex beads by dielectrophoretic levitation and hyperlayer field-flow fractionation," *Colloids Surf., A*, vol. 140, pp. 209–216, 1998.

[26] F. Yang, X. M. Yang, H. Jiang, P. Bulkhaults, P. Wood, W. Hruskesky, and G. R. Wang, "Dielectrophoretic separation of colorectal cancer cells," *Biomicrofluidics*, vol. 4, p. 13, 2010.

[27] N. Pamme, "Continuous flow separations in microfluidic devices," *Lab Chip*, vol. 7, pp. 1644–1659, 2007.

[28] Comsol, COMSOL Multiphysics 3.5a User's Guide. Stockholm, Sweden, Comsol AB, 2008.

[29] Comsol, COMSOL Multiphysics 3.5a AC/DC Module User's Guide. Stockholm, Sweden, Comsol AB, 2008.

[30] T. B. Jones, "Basic theory of dielectrophoresis and electrorotation," *IEEE Eng. Med. Biol. Mag.*, vol. 22, pp. 33–42, 2003.

[31] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter, *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed. New York: Garland Sci., 2002.

[32] R. Buchner, G. T. Hefter, and P. M. May, "Dielectric relaxation of aqueous NaCl solutions," *J. Phys. Chem. A*, vol. 103, pp. 1–9, Jan. 1999.

[33] P. R. Gascoyne, R. Pethig, J. P. Burt, and F. F. Becker, "Membrane changes accompanying the induced differentiation of Friend murine erythroleukemia cells studied by dielectrophoresis," *Biochim. Biophys. Acta.*, vol. 1149, pp. 119–126, Jun. 1993.

[34] Y. Huang, R. Hölzel, R. Pethig, and X. B. Wang, "Differences in the AC electrodynamic of viable and non-viable yeast cells determined through combined dielectrophoresis and electrorotation studies," *Phys. Med. Biol.*, vol. 37, pp. 1499–1517, Jul. 1992.

[35] Q. Hu, R. P. Joshi, and A. Beskok, "Model study of electroporation effects on the dielectrophoretic response of spheroidal cells," *J. Appl. Phys.*, vol. 106, p. 024701, 2009.

[36] R. Hölzel and I. Lamprecht, "Dielectric-properties of yeast-cells as determined by electrorotation," *Biochim. Biophys. Acta.*, vol. 1104, pp. 195–200, Feb. 1992.

[37] M. Ušaj, K. Trontelj, R. Hudej, M. Kandušer, and D. Miklavčič, "Cell size dynamics and viability of cells exposed to hypotonic treatment and electroporation for electrofusion optimization," *Radiol. Oncol.*, vol. 43, pp. 108–119, 2009.

[38] B. Valic, M. Golzio, M. Pavlin, A. Schatz, C. Faurie, B. Gabriel, J. Teissie, M. Rols, and D. Miklavcic, "Effect of electric field induced transmembrane potential on spheroidal cells: Theory and experiment," *Eur. Biophys. J.*, vol. 32, pp. 519–528, 2003.

[39] M. Cemazar, T. Jarm, D. Miklavcic, A. Lebar, A. Ihan, N. Kopitar, and G. Sersa, "Effect of electric-field intensity on electroporabilization and electrosensitivity of various tumor-cell lines in vitro," *Electro-Magnetobiol.*, vol. 17, pp. 263–272, 1998.

[40] T. Kotnik, G. Pucihar, M. Reberšek, D. Miklavčič, and L. M. Mir, "Role of pulse shape in cell membrane electroporabilization," *Biochim. Biophys. Acta.*, vol. 1614, pp. 193–200, 2003.

[41] A. Castellanos, A. Ramos, A. Gonzalez, N. G. Green, and H. Morgan, "Electrohydrodynamics and dielectrophoresis in microsystems: Scaling laws," *J. Phys. D, Appl. Phys.*, vol. 36, pp. 2584–2597, 2003.

[42] B. Weiss, W. Hilber, P. Gittler, and B. Jakoby, "Particle separation in alternating-current electro-osmotic micropumps using field-flow fractionation," *Microfluid. Nanofluid.*, vol. 7, pp. 191–203, 2009.

[43] H. B. Li and R. Bashir, "Dielectrophoretic separation and manipulation of live and heat-treated cells of *Listeria* on microfabricated devices with interdigitated electrodes," *Sens. Actuators B, Chem.*, vol. 86, pp. 215–221, 2002.

[44] G. Pucihar, T. Kotnik, D. Miklavcic, and J. Teissie, "Kinetics of transmembrane transport of small molecules into electroporabilized cells," *Biophys. J.*, vol. 95, pp. 2837–2848, 2008.

[45] Y. Zhou, J. Shi, J. Cui, and C. X. Deng, "Effects of extracellular calcium on cell membrane resealing in sonoporation," *J. Controlled Release*, vol. 126, pp. 34–43, 2008.

[46] K. Kristan, Z. Podlesek, V. Hojnik, I. Gutiérrez-Aguirre, G. Gunčar, D. Turk, J. M. González-Mañas, J. H. Lakey, P. Maček, and G. Anderlüh, "Pore formation by equinatoxin, A eukaryotic pore-forming toxin, requires a flexible N-terminal region and a stable  $\beta$ -sandwich," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, pp. 46509–46517, 2004.

**Jaka Čemazar** received the B.Sc. degree in electrical engineering from the University of Ljubljana, Slovenia, in 2008, where he is currently working toward the Ph.D. degree.

His main research interest is design of microdevices for separation of biological cells.

**Danilo Vrtačnik** received the Ph.D. in electrical engineering from the University of Ljubljana, Slovenia, in 2000.

Since 2007 he has been a Higher Scientific Associate at the Laboratory of Microsensor Structures, Faculty of Electrical Engineering, University of Ljubljana. His current research interests include development of silicon radiation detectors and related photodevices as well as advanced sensors and actuator structures fabricated by microelectromechanical systems (MEMS) technologies.

**Slavko Amon** (M'75) received the Ph.D. degree in electrical engineering from the University of Ljubljana, Slovenia, in 1981.

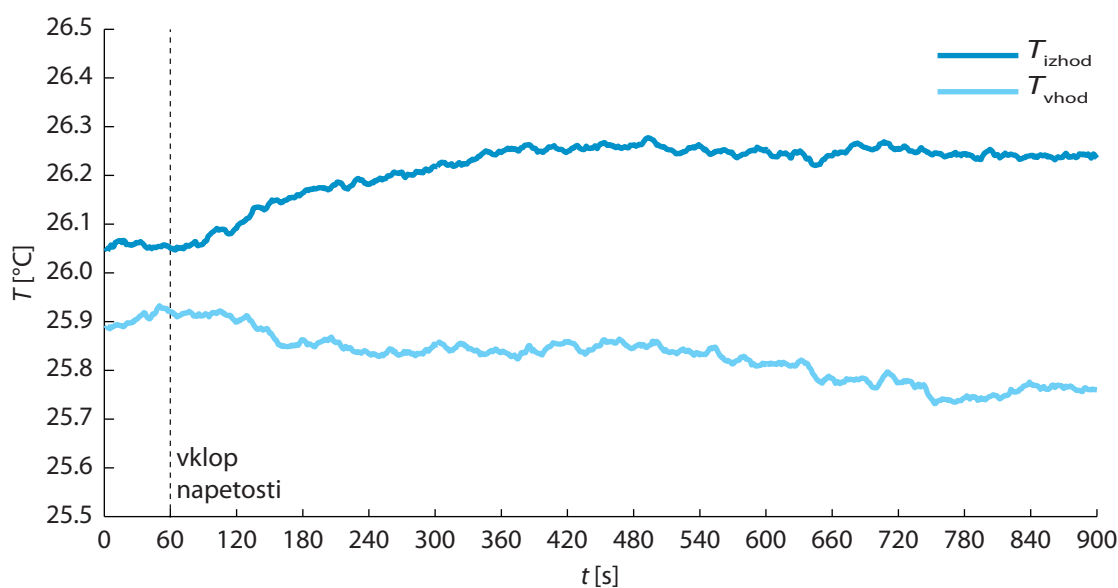
Since 1992 he has been a Full Professor on the Faculty of Electrical Engineering, University of Ljubljana, where he is also the Head of the Laboratory of Microsensor Structures. His current research interests include micro-/nanomicroelectromechanical systems (nano-MEMS) structures and technologies, micro-machining, modeling, and new microsensor and microactuator structures. He was a reviewer for international journals.

**Tadej Kotnik** received the Ph.D. degree in electrical engineering from the University of Ljubljana, Slovenia, and the Ph.D. degree in biophysics from University Paris XI, France, both in 2000.

Since 2001 he has been an Assistant Professor on the Faculty of Electrical Engineering, University of Ljubljana, where he is also a Higher Scientific Associate in the Laboratory of Biocybernetics. His current research interests include membrane electrodynamics and related biophysical phenomena (particularly membrane electroporation), as well as computational research in number theory.

### 3.1.2. Ločevanje mrtvih in živih celic pri različnih parametrih

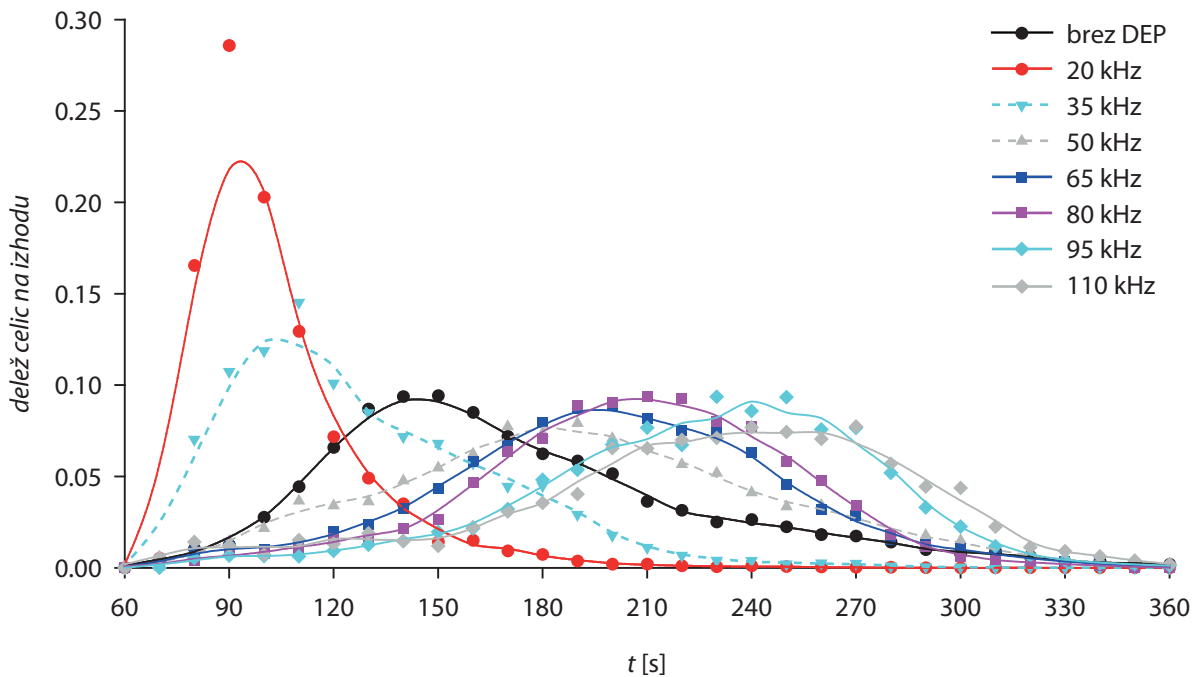
Segrevanje celic med ločevanjem ni zaželeno, saj lahko vpliva na preživetje celic, zato smo izmerili povečanje temperature DEP medija v komori zaradi električnega toka med elektrodami. Lokalnega povečanja temperature v bližini elektrod znotraj kanala nismo mogli izmeriti, ker pa celice potujejo skozi komoro nekaj  $\mu\text{m}$  nad elektrodami, lahko sklepamo, da temperatura ni dosegla kritične vrednosti, ki bi vplivala na preživetje celic. Pri pretoku  $30 \mu\text{l}/\text{min}$  in napetosti  $\pm 1.5 \text{ V}$  se komora segreva s povprečno močjo približno  $170 \text{ mW}$ . Temperatura medija na izhodu iz komore se v 14 min poveča za manj kot  $0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ , meritev pri vzorčni frekvenci  $1 \text{ Hz}$  prikazuje slika 35. Pri pretoku  $60 \mu\text{l}/\text{min}$  je segrevanje še manjše.



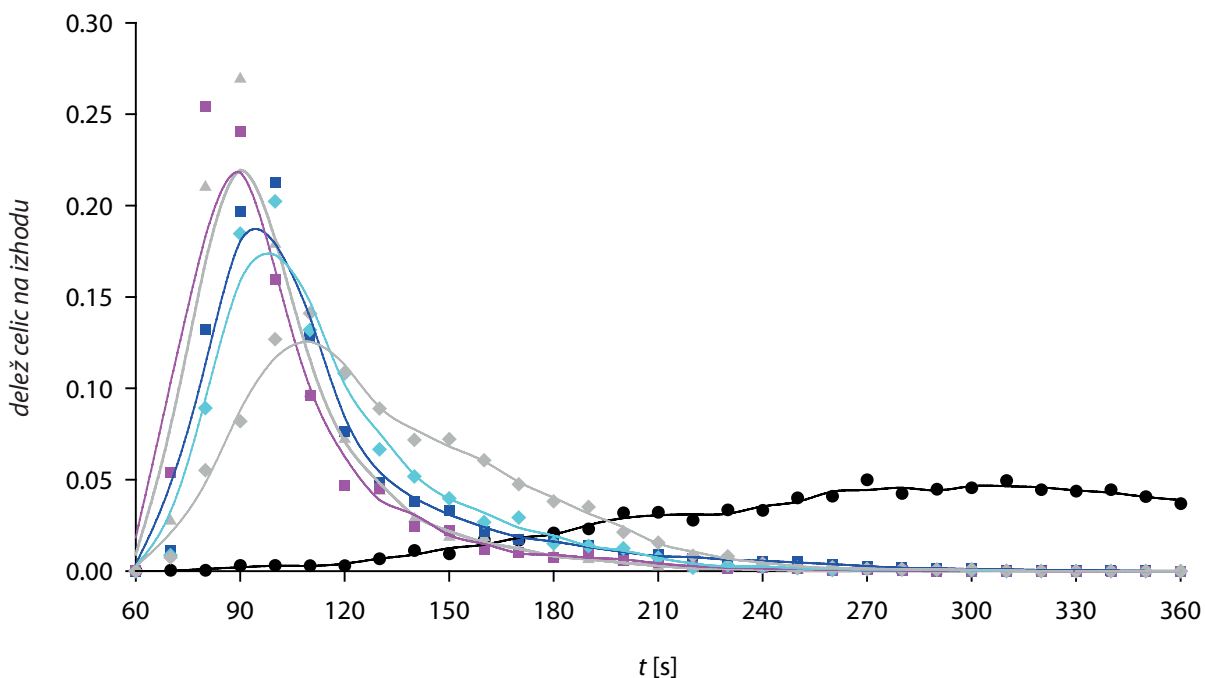
Slika 35: Merjenje temperature na vhodu v komoro (svetlomodra črta) in izhodu iz nje (temnomodra črta). Električno polje smo vključili ob času 60 s.

Za ločevanje elektroporiranih celic od neporiranih smo želeli zmanjšati čas ločevanja, zato smo pretok medija podvojili na  $60 \mu\text{l}/\text{min}$ . Časovna ločljivost, ki smo jo dosegli z vzorčenjem celic vsakih 30 s, je bila prenizka za natančno določanje učinkovitosti ločevanja, bolj pogosto jemanje vzorcev na izhodu iz komore pa nepraktično, zato smo za vsak tip celic izmerili elucijski profil in uspešnost ločevanja izračunali iz superpozicije teh profilov. Tik pred izhodom iz komore smo vsaki 2 s posneli sliko in potem na sliki prešteli celice. Zaradi nihanja števila celic smo sešteli število celic na 5 zaporednih slikah in tako dobili elucijske profile z ločljivostjo 10 s. V postopku optimizacije frekvence ločevanja smo izmerili elucijske profile živih (netretiranih) celic CHO pri frekvencah med 20 in 110 kHz v 15 kHz intervalih (slika 36) in profile mrtvih celic pri frekvencah med 50 in 110 kHz v enakih intervalih, vse tako pri napetosti  $\pm 1.5 \text{ V}$  kot pri izključenem električnem polju, povprečje vsaj treh meritev pa prikazuje slika 37. Elucijski profil živih celic pri izključenem polju ima vrh pri 150 s. Če je pri vključenem polju vrh profila pri manjšem času, pomeni, da na celice deluje negativna, v nasprotnem primeru pa pozitivna dielektroforeza.

Hitrost potovanja mrtvih celic ob izključenem polju je nizka in elucijski profil je pomaknjen proti večjemu času (slika 37). Ob vključenem polju pa mrtve celice pridejo na izhod hitreje pri vseh uporabljenih frekvencah, kar pomeni, da na mrtve celice pri teh frekvencah deluje le negativna dielektroforeza ali pa je dielektroforetska sila majhna in zanemarljivo vpliva na ravnotežno višino celic v kanalu. Pri frekvencah, nižjih od 50 kHz, so elucijski profili zelo podobni kot pri 50 kHz.



Slika 36: Elucijski profil netretiranih živih celic pri napetosti 3V in frekvencah med 20 in 110 kHz.



Slika 37: Elucijski profil mrtvih (toplotno obdelanih) celic pri napetosti 3V in frekvencah med 50 in 110 kHz.

Ločevanje živih in mrtvih celic je torej mogoče pri frekvencah 65 kHz ali več, ker pa se želimo izogniti izraziti pozitivni dielektroforezi, ki bi lahko povzročila zadrževanje celic v komori, se je kot najprimernejša za ločevanje živih celic od mrtvih izkazala frekvenca 65 kHz.



## 3.2. Ločevanje neporiranih, reverzibilno in ireverzibilno elektroporiranih celic

Ločevanje neporiranih, reverzibilno in ireverzibilno poriranih celic CHO je opisano v članku II, v nadaljevanju so povzeti rezultati. Komoro za DEP-FFF ločevanje celic smo razvili in optimirali z ločevanjem toplotno obdelanih (50°C, 15 min) celic od neobdelanih, kot je opisano v članku I. Dimenzije komore in elektrod smo določili na osnovi numeričnih izračunov. Segrevanje na 50°C poveča fluidnost membrane, denaturira proteinske kanale in črpalke, pri tem se poveča električna prevodnost in prepustnost membrane za ione. V nizkoprevodnem mediju zato ioni zapuščajo celico in zniža se prevodnost citoplazme. Toplotna obdelava dolgoročno povzroči smrt celice, kratkoročno pa ta še vedno obdrži svojo obliko. Takšne celice smo uporabili kot približen, a stabilen model elektroporiranih celic. Spremembe prevodnosti celice pri elektroporaciji so lahko reverzibilne, saj se prevodnost membrane približna normalni vrednosti že v nekaj sekundah, ionske črpalke pa v nekaj minutah vzpostavijo normalno stanje tudi v citosolu. Zaradi dinamičnih sprememb so takšne celice bolj heterogene kot toplotno obdelane celice.

67

Določili smo postopek za ločevanje  $10^5$  celic v posamezni šarži. Optimalno ločevanje toplotno obdelanih celic od neobdelanih pri pretoku 30  $\mu\text{l}/\text{min}$  in napetosti na elektrodah  $\pm 3$  V smo dosegli pri 65 kHz. Pri tej frekvenci na celice deluje negativna dielektroforeza, ki dviguje toplotno obdelane celice proti srednji višini kanala, neobdelane celice pa imajo nižjo ravnotežno višino. Pri zbiranju celic med peto in sedmo minuto je bil delež toplotno obdelanih celic 93 %, pri zbiranju med enajsto in trinajsto minuto pa je bil delež neobdelanih celic 77 %.

Izmerili smo krivuljo permeabilizacije in preživetja celic CHO v DEP mediju kot funkcijo amplitude električnega polja pri elektroporaciji. Membrana postane propustna za barvilo PI že pri 600 V/cm, pri 1400 V/cm pa je porirana večina celic. Z zviševanjem električnega polja upada preživetje, viabilnost pade pod 50 % pri napetosti pod 2000 V/cm. Pri 1200 V/cm so tako porirane skoraj vse celice, hkrati pa je preživetje  $\sim 77\%$ , kar pomeni, da so te celice v večini reverzibilno elektroporirane. Pri napetosti 2800 V/cm so elektroporirane vse celice, preživetje pa je manjše od 30 %. Pri še višji napetosti celice zaradi elektroporacije razpadajo, v mediju je opazna količina ostankov celic. Pri 2800 V/cm tako dobimo  $\sim 74$  % ireverzibilno poriranih celic, to amplitudo pa smo tudi izbrali kot reprezentativno za ireverzibilno porirane celice.

Za preizkus možnosti ločevanja neporiranih, reverzibilno in ireverzibilno poriranih celic smo zmanjšali napetosti na elektrodah, s katero smo ustvarjali dielektroforetsko silo, na  $\pm 1.5$  V, tako da jakost električnega polja v komori večinoma ni preseгла 200 V/cm. Hkrati smo povečali pretok medija skozi komoro na 60  $\mu\text{l}/\text{min}$ , kar pomeni, da je povprečna hitrost medija znašala 0.7 mm/s. Na vhodu v komoro smo vbrizgali 5  $\mu\text{l}$  celične suspenzije, na izhodu smo merili število celic v 2 s intervalih in izračunali elucijske profile. Večina celic je prispela na izhod iz komore v manj kot 7 min.

Izmerili smo elucijske profile neporiranih in različno elektroporiranih celic in izračunali uspešnost ločevanja dveh ali treh tipov različno poriranih celic. Celice so bile izpostavljene električnemu polju 0, 1200, 1600, 2000, 2400 in 2800 V/cm, nato je sledilo merjenje elucijskih profilov pri 35, 50, 65, 80, 95 in 110 kHz. Pri 35 kHz so vrhovi blizu skupaj, saj na vse celice deluje negativna dielektroforeza (članek II, slika 4A – Figure 4A). Pri višjih frekvencah pa elektroporirane celice večinoma pridejo na izhod iz komore prej kot neporirane, kar pomeni, da na njih deluje močnejša negativna dielektroforeza kot na neporirane celice. Dielektroforetska sila na ireverzibilno porirane celice (2800 V/cm) se v opazovanem frekvenčnem področju malo spreminja. Pri neporiranih in reverzibilno poriranih celicah pa na celice deluje negativna dielektroforeza pri nizkih frekvencah, pri višjih pa je sila majhna ali pa se pojavi pozitivna dielektroforeza. Čas potovanja skozi komoro

---

zaradi drugačne dielektroforetske sile je različen za celice elektroporirane pri izbranih jakostih električnega polja. S preprostim modelom celice kot homogene kroglice z lupino in spremembo prevodnosti celične membrane težko razložimo razliko v dielektroforetski sili. Boljši model bi moral upoštevati časovno in krajevno variabilnost prevodnosti ali celo anizotropijo membrane.

Najboljša možnost ločevanja celic v dva razreda je pri 65 kHz. Če zbiramo celice v prvo posodo med 60. in 100. sekundo, dobimo 88 % ireverzibilno poriranih celic, med 240. in 360. pa 99 % neporiranih in reverzibilno poriranih celic skupaj.

Parametri, ki jih lahko variramo za izboljšanje uspešnosti ločevanja so amplituda in frekvenca električnega polja ter pretok medija. Ločevanje celic pri večjem pretoku je še vedno mogoče, se pa elucijski profili stisnejo skupaj in razlike med profili so manjše, zato je zbiranje ločenih tipov celic v tem primeru manj uspešno. Večja amplituda jakosti električnega polja bi teoretično lahko izboljšala uspešnost ločevanja, a bi se povečala možnost nekontrolirane elektroporacije v komori DEP-FFF, zato smo se temu želeli izogniti.

68

Sistematično smo tako preverili ločevanje pri različnih frekvencah električnega polja. V članku II slika 4D (Figure 4D) prikazuje vrhove elucijskih profilov za celice, izpostavljene različnim elektroporacijskim pulzom. Pri 35 kHz so vrhovi profilov blizu skupaj, pri 50 kHz so vrhovi sicer približno enako razmaknjeni kot pri 65 kHz, vendar je prekrivanje profilov celic poriranih pri 0, 1200 in 2800 V/cm manjše pri 65 kHz. Če je začetna celična suspenzija sestavljena iz enakih deležev omenjenih celic (po eno tretjino vsakih) in na izhodu zbiramo celice v treh zaporednih povezanih intervalih od 60. do 150. sekunde, od 150. do 180. sekunde in od 180. do 360. sekunde, dobimo v prvem intervalu 62 % ireverzibilno poriranih celic, v drugem 56 % reverzibilno poriranih in v tretjem 64 % neporiranih celic. Pri nepovezanih intervalih so deleži celic višji; med 60. in 100. sekundo tako dobimo 87 % ireverzibilno poriranih celic in med 240. in 300. sekundo 80 % neporiranih celic. Z ločevanjem celic ne dobimo popolnoma čistih vzorcev, se pa delež posameznega tipa celic precej poveča. Če pri 80 kHz celice ločujemo le v dva razreda – v prvem so ireverzibilno porirane celice, v drugem pa reverzibilno porirane in neporirane celice kot ena skupina – dobimo še nekoliko večjo uspešnost. V prvem razredu dobimo 92 % ireverzibilno poriranih celic (60. – 100. s), v drugem pa 99 % reverzibilno poriranih in neporiranih celic skupaj (240. – 360. s). Pri še višji frekvenci je pozitivna dielektroforeza vlekla celice proti dnu, zato so se tam kotalile ob elektrodah, namesto da bi prosto plavale v mediju, zato ločevanje celic pri takih frekvencah ni uporabno.

Pri poskusih z elektroporacijo celic vzorci običajno niso tako heterogeni, temveč so večinoma sestavljeni iz večjega dela reverzibilno poriranih celic in manjšega dela ireverzibilno poriranih in neporiranih celic, zato bi bila v takem primeru uspešnost ločevanja reverzibilno poriranih celic večja. V opisanih poskusih smo celice elektroporirali v kivetah in jih nato ročno prenesli v komoro za ločevanje. Združitvev elektroporacije in ločevanja v eno komoro bi zmanjšala čas med obema procesoma in omogočila izkoriščanje razlik v fizikalnih lastnostih celic med procesom okrevanja po elektroporaciji.

## 3.2.1. Članek II

Electrophoresis 2012, 33, 2867–2874

2867

**Jaka Čemažar**  
**Tadej Kotnik**Faculty of Electrical Engineering,  
University of Ljubljana,  
Ljubljana, SloveniaReceived March 15, 2012  
Revised June 21, 2012  
Accepted June 27, 2012

## Research Article

**Dielectrophoretic field-flow fractionation of electroporated cells**

We describe the development and testing of a setup that allows for DEP field-flow fractionation (DEP-FFF) of irreversibly electroporated, reversibly electroporated, and nonelectroporated cells based on their different polarizabilities. We first optimized the channel and electrode dimensions, flow rate, and electric field parameters for efficient DEP-FFF separation of moderately heat-treated CHO cells (50°C for 15 min) from untreated ones, with the former used as a uniform and stable model of electroporated cells. We then used CHO cells exposed to electric field pulses with amplitudes from 1200 to 2800 V/cm, yielding six groups containing various fractions of nonporated, reversibly porated, and irreversibly porated cells, testing their fractionation in the chamber. DEP-FFF at 65 kHz resulted in distinctive flow rates for nonporated and each of the porated cell groups. At lower frequencies, the efficiency of fractionation deteriorated, while at higher frequencies the separation of individual elution profiles was further improved, but at the cost of cell flow rate slowdown in all the cell groups, implying undesired transition from negative to positive DEP, where the cells are pulled toward the electrodes. Our results demonstrate that fractionation of irreversibly electroporated, reversibly electroporated, and nonelectroporated cells is feasible at a properly selected frequency.

**Keywords:**

Cell fractionation / Dielectrophoresis / Electroporation / Microfluidics

DOI 10.1002/elps.201200265

69

**1 Introduction**

An exposure of a cell to a sufficiently high external electric field results in electroporation—formation of nanoscale aqueous pores in the lipid bilayer of the cell plasma membrane [1–3]. These permeable structures provide a pathway for diffusive inflow of otherwise membrane-impermeant exogenous molecules into the cells, as well as outflow of biomolecules from the cells. If the exposure is sufficiently short and the membrane recovers sufficiently rapidly for the cell to remain viable, electroporation is reversible, otherwise it is irreversible. Reversible electroporation is already an established method for introduction of membrane-impermeant chemotherapeutics into tumor cells—electrochemotherapy [4], and a promising technique for gene therapy devoid of the risks caused by viral vectors—gene electrotransfer [5]. In medicine, irreversible electroporation is a method for tissue

ablation—nonthermal electroablation [6], while in biotechnology it is used in electroextraction of biomolecules [7] and microbial deactivation, particularly in food preservation [8].

For optimal efficiency of a particular application of electroporation, all the exposed cells should be electroporated as uniformly as possible. In electrochemotherapy and gene electrotransfer, electroporation of all the cells should thus be reversible, while in electroablation, electroextraction, and microbial deactivation, it should be irreversible. In practice, however, such an ideal is difficult to achieve, as the cells can vary in their size, shape, phase of the cell cycle, orientation, membrane composition, etc. As a result, if the applied electric field pulses are relatively weak and/or short, one avoids irreversible electroporation, but some cells are not porated at all, while with stronger and/or longer pulses, all the cells are porated, but unavoidably some of them are porated irreversibly [9]. Furthermore, even if the goal is to achieve irreversible poration of all the exposed cells, a pulse amplitude required for this is often either technologically unachievable, or results in substantial heating that can be detrimental to the patient (in electroablation, which should be nonthermal) or the composition of the sample (in electroextraction and food preservation). In general, in every application of electroporation, the electric field applied is thus an empirically determined compromise that yields as many cells as possible

**Correspondence:** Dr. Tadej Kotnik, Faculty of Electrical Engineering, University of Ljubljana, Tržaška 25, SI-1000 Ljubljana, Slovenia

**E-mail:** tadej.kotnik@fe.uni-lj.si

**Fax:** +38-614-26-4658

**Abbreviations:** DEP-FFF, DEP field-flow fractionation; MTS, methyl-tetrazolium salt (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium); PI, propidium iodide

**Colour Online:** See the article online to view Figs. 2 and 4 in colour.

porated in the preferred manner, with small fractions of cells porated differently or not at all.

In fundamental research of electroporation *in vitro*, particularly in investigating the intracellular effects of reversible or/and irreversible poration, it would be useful to perform the studies separately on samples as homogeneous as possible, that is, containing either a large majority of reversibly porated cells, or a large majority of irreversibly porated ones. Due to the typical nonhomogeneity of electroporation in cells exposed to the electric field in large batches, homogeneous samples must be obtained by some method of cell separation. The most accurate separation devices are fluorescence- or magnetic-activated cell sorters (FACS and MACS), but they require labeling of cells by fluorescent or magnetic markers; moreover, they are large and expensive. In contrast, methods of DEP separation do not require labeling, and the devices are much smaller and relatively inexpensive to fabricate. Provided that the electric properties of irreversibly electroporated, reversibly electroporated, and nonelectroporated cells differ sufficiently, DEP methods could thus be used for simple and marker-free separation of these three classes.

Several different designs of DEP separation devices have been developed [10–12], with the inhomogeneity of the electric field generating the DEP force achieved either by the shapes of the electrodes [13, 14], or by inclusion of insulating structures into the otherwise largely homogeneous field [15, 16]. Some of these devices are based on opposite directions of the DEP force acting on different classes of cells [14, 17], and others on different magnitudes of this force [14, 17, 18]. A particularly useful subgroup of the latter devices is that based on DEP-field-flow fractionation (DEP-FFF) performed in a shallow flow-through microfluidic channel with electrodes at the bottom [19, 20]. The DEP-FFF devices are less sensitive to the variability of cell size and shape, allowing for successful separation of cells with smaller differences in their electric properties [21].

In DEP-FFF devices, the vertical position of each cell in the channel is determined by the equilibrium between the sedimentation force (sum of gravity and buoyancy) pulling the cells downwards, and the negative-DEP force generated by the electrodes at the bottom of the channel and pushing the cells upwards. Differences in electric properties of the cells affect the DEP force acting on them, but not the sedimentation force, leading to differences in the vertical equilibrium positions for the cells of the same type with differing electric properties (e.g., due to differences in their viability, phase of the cell cycle, stage of differentiation, or damage to the plasma membrane). In a shallow microfluidic channel, the flow is laminar and has a parabolic velocity profile, due to which the cells at different vertical positions have different velocities, with the cells at the vertical middle of the channel flowing the fastest, and those close to the bottom flowing the slowest [20, 22, 23]. By injecting a batch of cell suspension into the chamber and pumping it through the channel at a constant rate (the process henceforth referred to as *elution*), the cells closer to the vertical middle of the channel reach its output first, and those at lower positions follow later. Separation

of two (or fractionation of several) classes of cells is then achieved by interchanging at appropriate times the containers into which the cells are collected at the output of the channel. For efficient DEP-FFF separation, it is important that at least one class of cells is subject to negative-DEP force (i.e., pushed upwards), as otherwise all the classes are pulled to the bottom of the channel and thus flow at the same velocity.

DEP-FFF systems are efficient in separation of various cell types [24], blood cells [25, 26], viable and non-viable cells [27], normal and cancerous cells [28], and different clones of cancerous cells [29]. As electroporation affects the electric properties of the cell, DEP could be particularly suitable for separation of electroporated cells from nonelectroporated ones. In our group, such separation has been attempted in a chamber with an array of castellated electrodes and opposite directions of the DEP force acting on porated and nonporated cells [30], with some spatial separation observed within the chamber, but with no feasible means of extracting the two classes of cells from the chamber separately. The inherent possibility of extraction of cells separated in DEP-FFF systems, together with their higher sensitivity, suggested to us that DEP-FFF is a promising approach for separation of electroporated and nonelectroporated cells.

A rough theoretical estimation of the feasibility of such separation can be performed by means of the Clausius–Mossotti theory, in which the dielectrophoretic force acting on a spherical cell enveloped by a single membrane (i.e., a single-shell model of a cell) in an electric field  $E$  is given by [31]:

$$\vec{F}_{\text{DEP}} = 2\pi r^3 \varepsilon_e \operatorname{Re}(f_{\text{CM}}) \operatorname{grad}(E^2) \quad (1)$$

with  $f_{\text{CM}}$  the Clausius–Mossotti factor expressed as:

$$f_{\text{CM}} = \frac{\varepsilon'_c - \varepsilon'_e}{\varepsilon'_c + 2\varepsilon'_e} \quad (2)$$

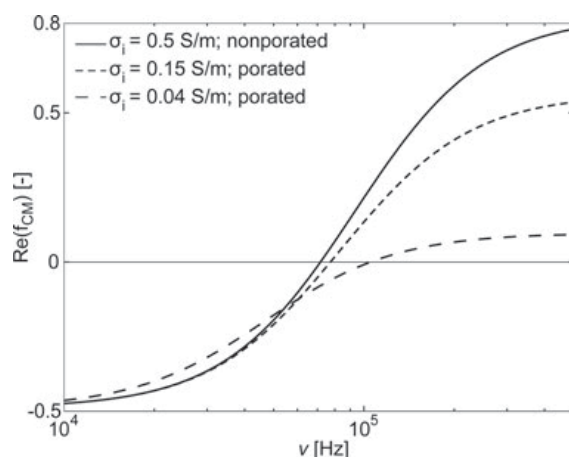
and with:

$$\varepsilon'_c = \varepsilon'_m \frac{\left(\frac{r}{r-d}\right)^3 + 2\frac{\varepsilon'_i - \varepsilon'_m}{\varepsilon'_i + 2\varepsilon'_m}}{\left(\frac{r}{r-d}\right)^3 - \frac{\varepsilon'_i - \varepsilon'_m}{\varepsilon'_i + 2\varepsilon'_m}} \quad (3)$$

where  $r$  is the cell radius,  $d$  is the membrane thickness, and  $\varepsilon'_e$ ,  $\varepsilon'_m$ , and  $\varepsilon'_i$  are the complex dielectric permittivities of the external medium, membrane, and the cell interior (cytoplasm), respectively, each given by  $\varepsilon' = \varepsilon - i\sigma/(2\pi\nu)$ , with  $\varepsilon$  and  $\sigma$  the dielectric permittivity and the electric conductivity of the region, and  $\nu$  the frequency of the field.

Eqs. (1)–(3) show that at a given electric field,  $F_{\text{DEP}}$  is proportional to the real part of  $f_{\text{CM}}$ , which is a function of the field frequency  $\nu$  that will henceforth be referred to as the DEP spectrum. Thus, fractionation by means of DEP-FFF of cells belonging to two classes with differences in electric properties is feasible if these differences result in the two classes having sufficiently different DEP spectra.

The aqueous pores formed in the lipid bilayer of the cell plasma membrane by electroporation increase the electric conductivity of the membrane ( $\sigma_m$ ) and hence its permeability for ions. In low-conductivity media used for



**Figure 1.** The theoretical estimates of the DEP spectra for nonporated (solid) and electroporated (dashed) CHO cells, with parameter values given in Table 1.

**Table 1.** The parameter values used for theoretical estimation of the DEP spectrum for nonporated CHO cells in the external medium as described in Section 2.1 and illustrated in Fig. 1;  $\epsilon_0 \approx 8.8542 \times 10^{-9}$  F/m

	Unit	Value	Source
$r$	m	$5.9 \times 10^{-6}$	Measured
$d$	m	$4.0 \times 10^{-9}$	[38]
$\sigma_e$	S/m	0.03	Measured
$\epsilon_e$	F/m	$78 \times \epsilon_0$	[39]
$\sigma_m$	S/m	$3.0 \times 10^{-7}$	[40]
$\epsilon_m$	F/m	$7 \times \epsilon_0$	[41]
$\sigma_i$	S/m	0.50	[42]
$\epsilon_i$	F/m	$60 \times \epsilon_0$	[41]

DEP-FFF, this leads to a net outflow of ions that lowers the conductivity of the cell interior ( $\sigma_i$ ). Electroporated cells are therefore generally characterized by a higher  $\sigma_m$ , and in low-conductivity media also by a lower  $\sigma_i$  with respect to nonporated cells. However, in reversibly electroporated cells both these effects are only temporary. Thus, after the initial increase of  $\sigma_m$  by several orders of magnitude [32, 33], the membrane starts to recover within milliseconds and  $\sigma_m$  returns to its initial state within seconds [34–36], while the membrane ion pumps in nonexcitable cells take minutes to establish the initial ionic concentrations and thereby the initial value of  $\sigma_i$  [37] (this is the case even in a physiological-conductivity medium, while in low-conductivity media this process is even slower). Since DEP-FFF proceeds on the time scale of minutes, the initial increase of  $\sigma_m$  is too short-lived for utilization in fractionation of electroporated cells, while the decrease of  $\sigma_i$  may be sufficiently persistent for this purpose.

Figure 1 shows estimates of the DEP spectrum (the real part of  $f_{CM}$  as a function of electric field frequency), as defined by Eqs. (2) and (3), for nonporated and electroporated CHO cells, with all the parameter values for nonporated cells given in Table 1, and with two different scenarios for elec-

trporated cells, with  $\sigma_i$  lowered from 0.5 to 0.15 and 0.04 S/m, respectively. Based on these estimates, the crossover frequency of the DEP spectrum for nonporated cells should be in the vicinity of 70 kHz, and electroporation should result in its shift toward higher frequencies; for efficient DEP-FFF fractionation; this estimate suggests that DEP-FFF should be efficient at frequencies up to 70 kHz, as this should make at least one class of cells subject to negative DEP. Here, we should note that electroporated cells differ from the idealized assumptions used here in at least four aspects (listed roughly in the order of decreasing importance): (i)  $\sigma_m$  and  $\sigma_i$  vary with time, (ii)  $\sigma_m$  also varies with position, as electroporation is the most intense in the membrane regions facing the electrodes used to deliver the electric field pulses, (iii)  $\sigma_m$  is moreover anisotropic, as the pores are perpendicular to the membrane, and (iv) electroporation-mediated transport across the membrane could also cause the value of  $\epsilon_i$  to increase toward that of  $\epsilon_e$ . Still, at least qualitatively, the prediction that electroporation results in an increase of the crossover frequency should hold, and this suggests that fractionation of irreversibly electroporated, reversibly electroporated, and nonelectroporated cells could be feasible.

In this paper, we describe the development and testing of a setup in which the DEP-FFF method described above is applicable for fractionation of electroporated cells. During the development phase, we used moderately heat-treated cells as a uniform and stable model of electroporated cells, optimizing the channel and electrode dimensions, flow rate, and electric field parameters for their efficient DEP-FFF separation from untreated cells. During the testing phase that followed, we used cells exposed to pulses of five different amplitudes rendering various fractions of nonporated, reversibly porated, and irreversibly porated cells, and performed the separation/fractionation at six different frequencies. We show that using such a system, DEP-FFF fractionation of irreversibly electroporated, reversibly electroporated, and non-electroporated cells is feasible, and while it generally cannot yield completely pure samples, it is useful for their substantial refinement.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Cells

CHO cells (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK) were grown in the culture medium consisting of Ham's F-12 medium (PAA Laboratories, Pasching, Austria) supplemented with 2 mM glutamine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 10% fetal bovine serum (PAA Laboratories) and antibiotics crystallin (Pliva, Zagreb, Croatia) and gentamycin (Sigma-Aldrich), at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere.

Cells were detached from the flask surface by trypsinase in 0.25% trypsin/EDTA (Sigma-Aldrich). The obtained suspension was centrifuged for 5 min (1000 rpm at 4°C) and resuspended in the DEP buffer consisting of iso-osmotic PBS [43] diluted with 250 mM sucrose to adjust the electric

conductivity to 27 mS/m at preserved iso-osmolarity. The suspension was again centrifuged and resuspended in the DEP buffer at final concentration of  $2 \times 10^7$  cells/mL.

## 2.2 Heat treatment and electroporation

Heat-treated cells were obtained by placing the vial with the cells suspended in the culture medium (see Section 2.1) into a water bath at 50°C for 15 min before two centrifugations. This yielded cells retaining their normal size, shape, and appearance (as observable under a microscope), but with an increased electric conductivity of the membrane [44] and with no long-term viability [23]. On yeast and bacterial cells, heat-treatment is often performed at temperatures over 80°C [13,45], but with CHO cells such intense heating, while surely causing a larger effect on the membrane conductivity, would also result in excessive damage to the cells or even their complete disintegration.

Cell suspended in the DEP buffer (see Section 2.1) were electroporated in cuvettes with 1-mm distance between the electrodes (Eppendorf, Hamburg, Germany) by Cliniporator® (Igea, Carpi, Italy). A train of eight pulses with 100- $\mu$ s duration and 1-Hz repetition frequency was delivered to the cuvette, with the pulse amplitude (electric field strength estimated as the ratio between the voltage delivered to the plate electrodes and the distance between them) of 1200, 1600, 2000, 2400, or 2800 V/cm. Within 5–10 s after the exposure to electroporative pulses, the cells were injected into the channel of the DEP-FFF chamber, and fractionation was initiated.

Fraction of electroporated cells was evaluated by assessing their permeability to propidium iodide (PI, Sigma-Aldrich), which cannot permeate an intact membrane, but fluoresces inside a cell. Immediately before exposure to electroporative pulses, PI was added to the cell suspension in final concentration of 100  $\mu$ M. After the exposure, the fraction of cells displaying PI fluorescence was determined by counting the cells under a fluorescence microscope (Axiovert 200, Carl Zeiss MicroImaging, Jena, Germany) with a cooled CCD video camera (VisiCam 1280, Visitron Systems, Munich, Germany) and MetaMorph 7.0 image acquisition software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). For each set of parameter values, at least 300 cells were counted, and each such experiment was repeated three times.

Fraction of viable cells was assessed by placing 5000 cells per well on a 96-well microtiter plate (TPP, Trasadingen, Switzerland) after pulsation. Culture medium was added to bring the total volume in each well to 100  $\mu$ L. After 48 h of incubation, the cell viability test was performed using the MTS assay (Cell Titer 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, Madison, WI, USA). Fluorescence intensity was measured with a spectrofluorometer (Tecan Infinite M200, Tecan, Grödig, Austria), and the viability was calculated as the ratio of fluorescence intensities of cells exposed to an electroporating field and those unexposed (100% viable). Each experiment was repeated three times, with six wells per set of parameter values in each repetition.

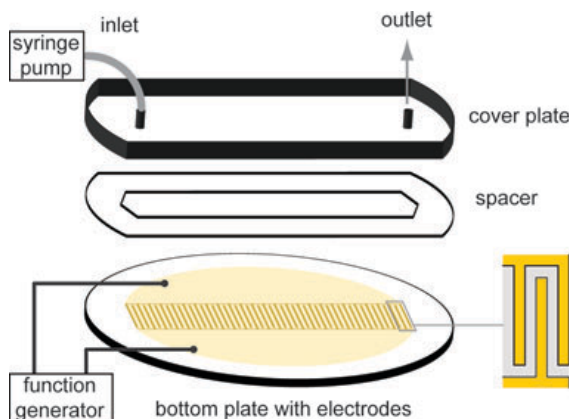


Figure 2. Schematic drawing of the DEP-FFF chamber.

## 2.3 DEP-FFF chamber

The DEP-FFF chamber was designed and fabricated as described in detail in Čemažar et al. [23], and is shown in the schematic drawing in Fig. 2. Pyrex glass (Pyrex 7740, Corning Inc., Corning, NY, USA) with 100-mm diameter and 0.7-mm thickness was used as a basis for the electrodes, onto which a 50-nm layer of chromium and a 150-nm layer of gold were deposited by sputtering. The electrodes 76-mm long, 20-mm wide, and consisting of 400 interdigitated bars 115- $\mu$ m wide with 75- $\mu$ m interelectrode gaps, were fabricated by photolithography and subsequent wet etching and cleaning.

The top of the chamber was made of soda-lime glass, with holes for inlet and outlet drilled through. Double-sided self-adhesive tape (Isotrade Jereb, Ljubljana, Slovenia) 100- $\mu$ m thick with an opening cut into it was used as a spacer between the two glass surfaces, forming a channel 8-cm long, 2-cm wide, and 100- $\mu$ m high. The nontoxic water-resistant acrylic glue of the tape loses its adhesive properties at temperatures above 70°C and allows for easy disassembly, cleaning, and reassembly of the chamber.

## 2.4 Fractionation

For DEP-FFF fractionation, a voltage of 3 V peak-to-peak amplitude ( $\pm 1.5$  V) at 35, 50, 65, 80, 95, or 110 kHz frequency (chosen as to cover the interval containing the expected crossover frequencies for all investigated cell groups) was delivered to the electrodes of the chamber by a voltage function generator (33250A, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Silicon tubes with 1.5-mm inside diameter were connected to the chamber, and a 1-mL syringe was mounted onto a syringe pump (Aladdin, WPI, Boulevard Sarasota, FL, USA). The chamber was pre-filled with the DEP buffer (see Section 2.1), and then the cells suspended in the DEP buffer (total suspension volume of 5  $\mu$ L) were injected into the channel and pumped through it at a constant flow rate (either at 30 or 60  $\mu$ L/min, which corresponds to the average flow

velocity of 0.35 and 0.70 mm/s, respectively). The flow of cell suspension through the channel was monitored under the microscope (Axiovert 200, Carl Zeiss MicroImaging). A sequence of images was taken at the output, one image every 2 s, and the number of cells in each image was divided by the number of cells in all the images of the sequence to obtain an estimate of the fraction of cells reaching the chamber output as a function of time (the *elution profile*). Every measurement was repeated three times.

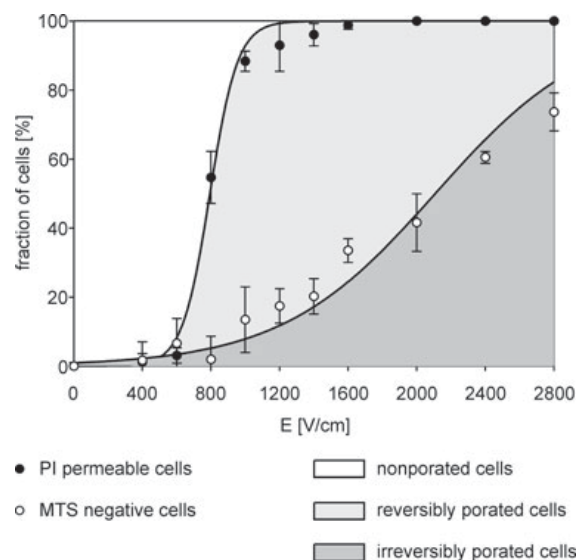
### 3 Results and discussion

#### 3.1 Development of the DEP-FFF separation method

Our DEP-FFF chamber was first developed and optimized for efficient separation of moderately heat-treated CHO cells (50°C for 15 min) from untreated ones [23]. The dimensions as given in Section 2.3 were optimized based on numerical computations of the electric field, its gradient, and the field-flow velocity profile.

Heat treatment increases the fluidity of the lipid bilayer and denatures the transport proteins (pumps and channels) in the cell plasma membrane. This results in an increased electric conductivity of the membrane [44] and hence its permeability for ions, but with the 50°C, 15-min treatment applied here, the cells still retained their normal size, shape, and appearance (as observable under a microscope). In a low-conductivity medium used for DEP-FFF, this leads to a net outflow of ions that lowers the conductivity of the cell interior. Therefore, the effect of heat treatment on the electric properties of the cells should at least qualitatively be similar to the effect of electroporation as outlined in Section 1. During the chamber development phase, we have thus used the 50°C heat-treated cells as a rough approximation of electroporated cells characterized by its uniformity and stability. Namely, the heat-induced changes of the electric properties of the cell are largely irreversible, while changes caused by electroporation can also be reversible, with the membrane returning to the initial state within seconds [34–36], and the membrane pumps establishing the physiological ionic concentrations in the cell interior within minutes [37]. As a consequence, with respect to the changes in electric properties, the samples of electroporated cells are generally both more heterogeneous and more time-varying than samples of heat-treated cells.

Separation protocol was optimized by eluting batches of  $10^5$  cells at various frequencies and peak-to-peak amplitudes of the voltage generating the negative-DEP force, and at various flow rates. Optimal separation of heat-treated and -untreated CHO cells was obtained with a 6 V peak-to-peak voltage ( $\pm 3$  V) at 65 kHz, with a 5  $\mu$ L batch of the cell suspension eluted at a 30  $\mu$ L/min flow rate (average flow velocity of 0.35 mm/s), at which the separation process was completed in under 14 min. Our measurements show that the 65 kHz frequency is still in the range of negative DEP for both cell groups, but that it is closer to the crossover frequency for untreated than for heat-treated CHO cells, which



**Figure 3.** Fractions of electroporated (PI permeable) and nonviable (MTS negative) CHO cells. The difference between the two fractions represents the fraction of reversibly electroporated cells (light gray area).

is in agreement with the theoretical expectations outlined above (see also e.g., Fig. 8 in [23]). Due to this, the DEP force is pushing both groups of cells upwards, but the force acting on heat-treated cells is larger, so that they have a higher vertical equilibrium position, hence a higher flow rate, and they reach the output faster (based on Eq. (2) from [25], estimated average levitation heights were 11 and 7  $\mu$ m for heat-treated and untreated cells, respectively). The best separation results were achieved by collecting the eluted cells at the chamber output between the 5th and the 7th min and between the 11th and the 13th min after the start of the flow, yielding 93% of heat-treated cells and 77% of untreated cells, respectively.

#### 3.2 Cell electroporation and viability as functions of pulse amplitude

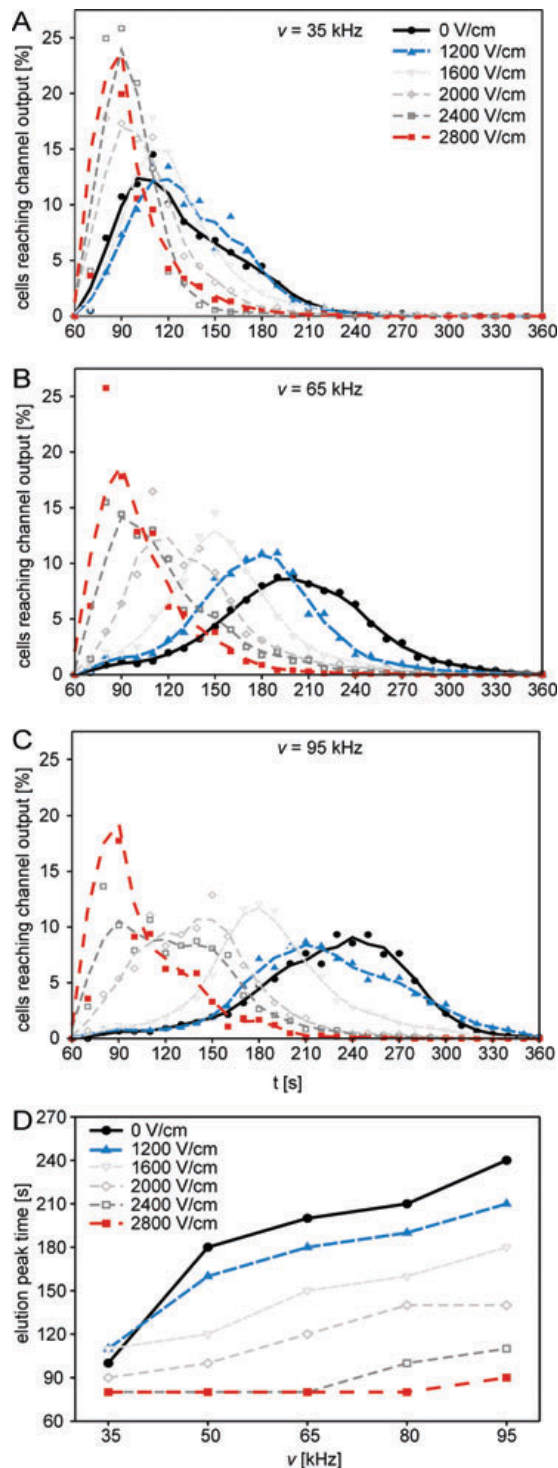
Figure 3 shows the fractions of electroporated and nonviable (i.e., irreversibly electroporated) cells as functions of pulse amplitude used for electroporation (expressed as the ratio of the voltage applied to the electrodes and the distance between them). The cells exposed to 1200 V/cm pulses (containing ~77% of reversibly porated cells) and 2800 V/cm pulses (containing ~74% of irreversibly porated cells) were deemed the most representative samples of reversibly and irreversibly electroporated cells, respectively. Namely, pulse amplitudes exceeding 2800 V/cm led to considerable fractions of disintegrated cells, resulting in substantial release of intracellular contents and debris, which could affect the properties of the DEP buffer and the separation/fractionation process.

### 3.3 Fractionation of samples exposed to different pulse amplitudes

To test the ability of our chamber to fractionate irreversibly porated, reversibly porated, and nonporated cells, we first applied the protocol optimized with heat-treated cells (see Section 3.1), with 65 kHz frequency, but with the voltage generating the DEP field reduced to 3 V peak-to-peak ( $\pm 1.5$  V). This reduced the electric field in the chamber by one-half, and thereby the DEP force by three quarters (see Eq. (1)), but with the maximal electric field reduced from 400 to 200 V/cm, it completely eliminated the possibility of the cells being electroporated by the DEP field itself. Namely, with the 75- $\mu\text{m}$  interelectrode gap, even the 6 V peak-to-peak voltage ( $\pm 3$  V) applied in the separation of heat-treated and -untreated cells resulted in the maximal electric field of 400 V/cm, which according to Fig. 3 does not yield any statistically significant level of electroporation, but at the maximal field of 200 V/cm generated with 3 V ( $\pm 1.5$  V), absence of electroporation can be taken for certain. In addition, to decrease the effects of recovery of reversibly porated cells that renders them increasingly similar to nonporated cells, the flow rate through the channel was increased to 60  $\mu\text{L}/\text{min}$ , double the rate used for separation of heat-treated and -untreated cells. Thus, the fractionation process was completed in less than 7 min. We then repeated these experiments also at 35, 50, 80, 95, and 110 kHz frequencies, focusing on the effect of the frequency-dependent changes of  $f_{\text{CM}}$ , and thus of the DEP force, exerted on the elution profiles of different cell groups.

Figure 4A–C shows the elution profile of cells exposed to 0, 1200, 1600, 2000, 2400, and 2800 V/cm and then eluted at 35, 65, and 95 kHz. Roughly in line with the theoretical predictions as given by Fig. 1, at 35 kHz the peaks of the profiles are very close together, while at 65 and 95 kHz the electroporated cells on the average reach the output faster, reflecting their higher vertical equilibrium positions due to the more negative (or at least less-positive) DEP force. Still, according to Fig. 1, the negative-DEP force acting on the cells at 35 kHz should be considerably stronger—and the cells should reach the output much faster—than at 65 or 95 kHz, while the results in Fig. 4 show that this effect is present in nonporated and reversibly porated cells, but barely detectable in irreversibly porated cells. This implies that for a more accurate agreement between theory and experiments, the temporal and spatial variability of the conductivities characteristic of electroporation, and perhaps also the anisotropy of the membrane conductivity, would likely have to be taken into account.

At 65 kHz, the peaks of the profiles are the most distinctive, and the irreversibly porated cells could be efficiently separated from the nonporated and reversibly porated cells treated as a single class; collecting the cells at the chamber output between the 60th and the 100th s, and between the 240th and the 360th s after the start of the flow, yielded 88% of irreversibly porated cells, and 99% of nonporated and reversibly porated cells counted together, respectively. The elution profiles of the nonporated and reversibly porated cells are



**Figure 4.** (A–C) Elution profiles of CHO cells exposed to electroporative pulses of various amplitudes, and subsequently DEP-FFF fractionated at 35, 65, and 95 kHz. (D) Elution peak times for these cells as functions of DEP-FFF frequency. All the data points are averages of three independent measurements.



too close together to allow for a similarly high efficiency of separation of these two classes of cells, largely due to the fact that the recovery of the reversibly porated cells toward their pre-poration state is faster than their passage through the separation channel. Still, as can be seen in Fig. 4A–C, substantial refinement is achievable also for these two classes.

The three parameters that could in principle be varied to improve the fractionation efficiency were the flow rate, and the peak-to-peak amplitude and frequency of the voltage generating the DEP force. While a further increase of the flow rate was feasible, and with faster elution the reversibly porated cells would recover to a smaller extent during the fractionation, we found that this gain is largely neutralized by the squeezing of the elution profiles as a whole along the time axis, which also brings their peaks closer together. An increase of the voltage delivered to the electrodes for DEP-FFF fractionation would increase the negative-DEP force acting on each of the cell classes correspondingly, amplifying also the differences in elution profiles, but as discussed above, we chose to avoid it as to ensure that no unintentional electroporation is caused by the electric field used to generate the DEP force.

Thus, we investigated systematically the influence of the frequency of the voltage generating the DEP force, focusing particularly on the frequency ranges where DEP is negative and thus favorable for efficient DEP-FFF. Figure 4D shows the times at which the peaks of the individual elution profiles (the elution peaks) occurred for cells previously exposed to pulses with amplitudes from 0 to 2800 V/cm as functions of DEP-FFF frequencies from 35 to 95 kHz. The decrease of the DEP-FFF frequency below 65 kHz resulted in gradual convergence of the elution peaks of nonporated, reversibly porated, and irreversibly porated cells, and at 35 kHz the fractionation effects were already radically reduced. Still, at 50 kHz, despite the closer peaks compared to 65 kHz, there was slightly less overlapping of the complete profiles of the groups exposed to 0, 1200, and 2800 V/cm, yielding the best achievable fractionation of nonporated, reversibly porated, and irreversibly porated cells as three separate classes. Namely, already by collecting the cells at the chamber output in three contiguous time intervals—between the 60th and the 150th s, between the 150th and the 180th s, and between the 180th and 360th s after the start of the flow—we obtained 62% of irreversibly porated cells, 56% of reversibly porated cells, and 64% of nonporated cells, respectively. With noncontiguous time intervals, the efficiency of fractionation was improved further for irreversibly porated cells (reaching 87% for the interval between the 60th and the 100th s) and for nonporated cells (reaching 80% for the interval between the 240th and the 300th s). Thus, fractionation of irreversibly electroporated, reversibly electroporated, and nonelectroporated cells by DEP-FFF is feasible, and while it did not yield highly purified samples (e.g., efficiencies of 90% or higher), it can be used for their substantial refinement, which can be useful for *in vitro* investigations of various effects of reversible or/and irreversible poration.

Figure 4D also shows that an increase of the DEP-FFF frequency from 65 to 80 kHz resulted in an increased shift

between the elution peak of the irreversibly porated cells on one side, and the elution peaks of the nonporated and reversibly porated cells on the other. Collecting the cells at the chamber output between the 60th and the 100th s, and between the 240th and the 360th s, yielded 92% of irreversibly porated cells, and 99% of nonporated and reversibly porated cells counted together, respectively—a somewhat better separation efficiency than at 65 kHz. However, a further increase in DEP-FFF frequency led to pronounced slowdowns of the profiles, implying the undesired transition from negative into positive DEP (see Fig. 1), where the cells are pulled toward the electrodes, and start to roll at (or close to) the bottom of the chamber, instead of freely floating.

It is worth noting that the separation and fractionation efficiencies stated above were obtained proceeding from a sample containing equal fractions of nonporated, reversibly porated, and irreversibly porated cells; more precisely, these efficiencies follow from the elution profiles, as given in Fig. 4, for a suspension formed from equal amounts of cells exposed to 0, 1200, and 2800 V/cm pulses. In realistic situations, the amplitude of the pulses to which the cells are exposed in order to achieve electroporation already leads to a sample with a higher content of one class with respect to the other two (e.g., close to 100% nonporated cells at amplitudes below 600 V/cm, over 80% of reversibly porated cells at 1200 V/cm, and about 70% of irreversibly porate cells at 2800 V/cm, see Fig. 3). As a consequence, by performing a suitable DEP-FFF separation or fractionation of cells exposed to a particular amplitude of electroporative pulses, the final yield of a particular class of cells will be much higher than the yields obtained with equal initial fractions of the three classes. For example, by exposing the cells to 1600 V/cm pulses, the sample will contain practically no nonporated cells (see Fig. 3), hence the DEP-FFF fractionation will in fact amount to separation of reversibly porated from irreversibly porated cells.

In our setup, the cells were electroporated in cuvettes standardly used for this purpose, and then transferred into the DEP-FFF chamber for fractionation. However, electroporation can also be performed in microfluidic devices [46–48]. A merger of microfluidic designs for electroporation and fractionation into a single device would eliminate the need for intermediary transfer of cells, shortening the delay between electroporation and the start of fractionation.

## 4 Concluding remarks

Our results obtained with CHO cells indicate that with a suitably designed chamber and a sufficiently optimized protocol, DEP-FFF can be used both for separation of irreversibly electroporated cells from nonelectroporated and reversibly electroporated ones considered as a single class (with high efficiency), and for fractionation of irreversibly porated, reversibly porated, and nonporated cells as three separate classes (with moderate efficiency). The general dimensions of the chamber used here (roughly 100- $\mu$ m electrode width, interelectrode gap, and channel height, and 6–10 cm channel

length) should be adequate irrespective of the specific cells to be separated or fractionated after electroporation. On the other hand, the protocol parameters—in our case 60  $\mu\text{L}/\text{min}$  flow rate (average flow velocity of 0.7 mm/s), 3 V peak-to-peak voltage between the electrodes, 50/65/80 kHz frequency—are likely to be optimizable further for each particular type of cells, experimental conditions under which they are electroporated, and composition of the DEP buffer.

This research was supported by the Slovenian Research Agency (Research Program P2-0249) and conducted in the scope of the EBAM European Associated Laboratory (LEA).

The authors have declared no conflicts of interest.

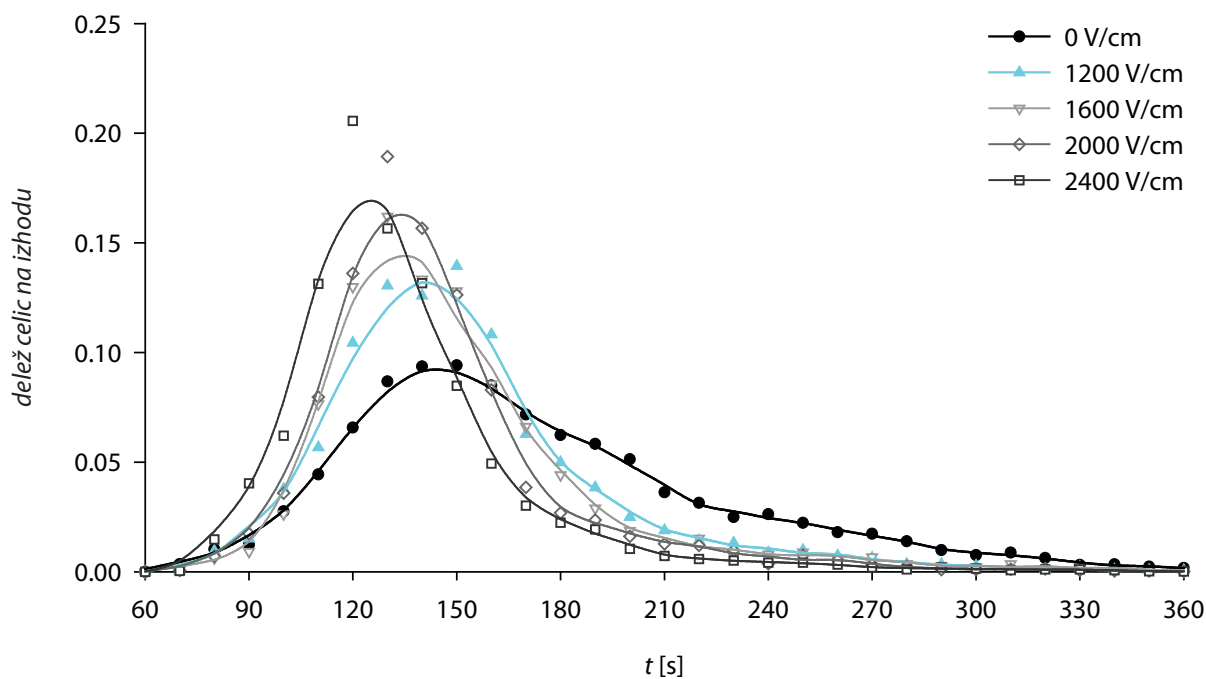
## 5 References

- [1] Neumann, E., Rosenheck, K., *J. Membrane Biol.* 1972, **10**, 279–290.
- [2] Weaver, J., Chizmadzhev, Y., *Bioelectrochem. Bioenerg.* 1996, **41**, 135–160.
- [3] Weaver, J. C., *IEEE Trans. Dielect. Electr. Insul.* 2003, **10**, 754–768.
- [4] Sersa, G., Miklavcic, D., Cemazar, M., Rudolf, Z., Pucihar, G., Snoj, M., *Eur. J. Surg. Oncol.* 2008, **34**, 232–240.
- [5] André, F., Mir, L. M., *Gene Ther.* 2004, **11**(Suppl 1), S33–S42.
- [6] Lee, E. W., Thai, S., Kee, S. T., *Gut Liver* 2010, **4**(Suppl 1), S99–S104.
- [7] Sack, M., Sigler, J., Frenzel, S., Eing, C., Arnold, J., Michelberger, T., Frey, W., Attmann, F., Stukenbrock, L., Müller, G., *Food Eng. Rev.* 2010, **2**, 147–156.
- [8] Morales-de la Peña, M., Elez-Martínez, P., Martín-Belloso, O., *Food Eng. Rev.* 2011, **3**, 94–107.
- [9] Puc, M., Kotnik, T., Mir, L. M., Miklavcic, D., *Bioelectrochemistry* 2003, **60**, 1–10.
- [10] Pethig, R., *Biomicrofluidics* 2010, **4**, 022811.
- [11] Četin, B., Li, D., *Electrophoresis* 2011, **32**, 2410–2427.
- [12] Gagnon, Z. R., *Electrophoresis* 2011, **32**, 2466–2487.
- [13] Li, H. B., Bashir, R., *Sens. Actuators B Chem.* 2002, **86**, 215–221.
- [14] Khoshmanesh, K., Nahavandi, S., Baratchi, S., Mitchell, A., Kalantar-zadeh, K., *Biosens. Bioelectron.* 2011, **26**, 1800–1814.
- [15] Lapizco-Encinas, B. H., Simmons, B. A., Cummings, E. B., Fintschenko, Y., *Anal. Chem.* 2004, **76**, 1571–1579.
- [16] Kang, Y., Cetin, B., Wu, Z., Li, D., *Electrochim. Acta* 2009, **54**, 1715–1720.
- [17] Pamme, N., *Lab Chip* 2007, **7**, 1644–1659.
- [18] Roda, B., Zattoni, A., Reschiglian, P., Moon, M. H., Mirasoli, M., Michelini, E., Roda, A., *Anal. Chim. Acta* 2009, **635**, 132–143.
- [19] Huang, Y., Wang, X. B., Becker, F. F., Gascoyne, P. R. C., *Biophys. J.* 1997, **73**, 1118–1129.
- [20] Markx, G. H., Rousselet, J., Pethig, R., *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.* 1997, **20**, 2857–2872.
- [21] Pratt, E. D., Huang, C., Hawkins, B. G., Gleghorn, J. P., Kirby, B. J., *Chem. Eng. Sci.* 2011, **66**, 1508–1522.
- [22] Giddings, J., *Science* 1993, **260**, 1456–1465.
- [23] Cemazar, J., Vrtacnik, D., Amon, S., Kotnik, T., *IEEE Trans. Nanobiosci.* 2011, **10**, 36–43.
- [24] Gasperis, G. D., Yang, J., Becker, F. F., Gascoyne, P. R. C., Wang, X.-B., *Biomed. Microdevices* 1999, **2**, 41–49.
- [25] Wang, X.-B., Yang, J., Huang, Y., Vykoukal, J., Becker, F. F., Gascoyne, P. R. C., *Anal. Chem.* 2000, **72**, 832–839.
- [26] Holmes, D., Green, N. G., Morgan, H., *IEEE Eng. Med. Biol. Mag.* 2003, **22**, 85–90.
- [27] Yu, L. M., Iliescu, C., Xu, G. L., Tay, F. E. H., *J. Microelectromech. Syst.* 2007, **16**, 1120–1129.
- [28] Yang, J., Huang, Y., Wang, X. B., Becker, F. F., Gascoyne, P. R. C., *Anal. Chem.* 1999, **71**, 911–918.
- [29] Sabuncu, A. C., Liu, J. A., Beebe, S. J., Beskok, A., *Biomicrofluidics* 2010, **4**, 021101.
- [30] Oblak, J., Križaj, D., Amon, S., Maček-Lebar, A., Miklavčič, D., *Bioelectrochemistry* 2007, **71**, 164–171.
- [31] Jones, T. B., *IEEE Eng. Med. Biol. Mag.* 2003, **22**, 33–42.
- [32] Kinoshita Jr., K., Tsong, T. Y., *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1979, **554**, 479–497.
- [33] Benz, R., Conti, F., *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1981, **645**, 115–123.
- [34] Hibino, M., Itoh, H., Kinoshita, K., *Biophys. J.* 1993, **64**, 1789–1800.
- [35] Schmeer, M., Seipp, T., Pliquet, U., Kakorin, S., Neumann, E., *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2004, **6**, 5564–5574.
- [36] Pucihar, G., Kotnik, T., Miklavcic, D., Teissie, J., *Biophys. J.* 2008, **95**, 2837–2848.
- [37] Ando, J., Smith, N. I., Fujita, K., Kawata, S., *Eur. Biophys. J.* 2009, **38**, 255–262.
- [38] Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., *Molecular Biology of the Cell*, Fourth Edition, Garland Science, New York 2002.
- [39] Buchner, R., Hefter, G. T., May, P. M., *J. Phys. Chem. A* 1999, **103**, 1–9.
- [40] Gascoyne, P. R. C., Pethig, R., Burt, J. P. H., Becker, F. F., *Biochim. Biophys. Acta* 1993, **1149**, 119–126.
- [41] Hu, Q., Joshi, R. P., Beskok, A., *J. Appl. Phys.* 2009, **106**, 024701.
- [42] Holzel, R., Lamprecht, I., *Biochim. Biophys. Acta* 1992, **1104**, 195–200.
- [43] Ušaj, M., Trontelj, K., Hudej, R., Kandušer, M., Miklavčič, D., *Radiol. Oncol.* 2009, **43**, 108–119.
- [44] Huang, Y., Hölzel, R., Pethig, R., Wang, X. B., *Phys. Med. Biol.* 1992, **37**, 1499–1517.
- [45] Iliescu, C., Yu, L. M., Tay, F. E. H., Chen, B. T., *Sens. Actuators B Chem.* 2008, **129**, 491–496.
- [46] Huang, Y., Rubinsky, B., *Sens. Actuators A Phys.* 2003, **104**, 205–212.
- [47] Lu, H., Schmidt, M. A., Jensen, K. F., *Lab Chip* 2005, **5**, 23–29.
- [48] Khine, M., Lau, A., Ionescu-Zanetti, C., Seo, J., Lee, L. P., *Lab Chip* 2005, **5**, 38–43.

### 3.2.2. Ločevanje elektroporiranih celic CHO pri različnih pogojih

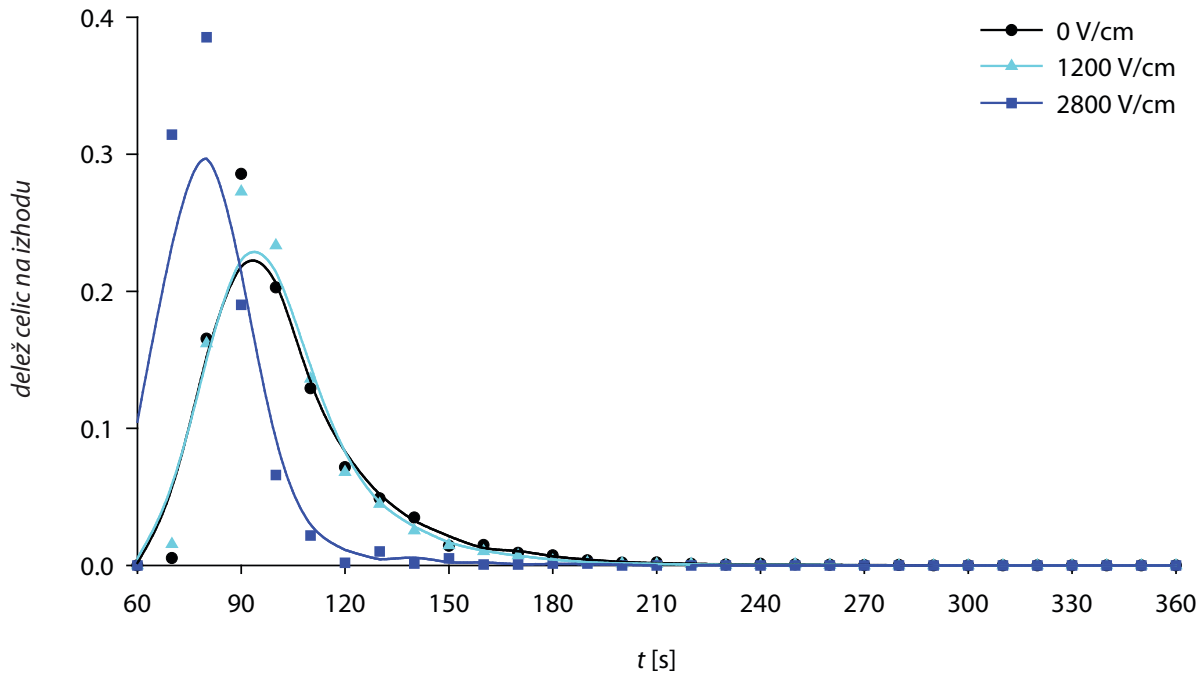
Poleg testa preživetja in elektroporacije celic CHO smo izmerili tudi spremembo velikosti zaradi elektroporacije. Izmerili smo velikost celic, izpostavljenih električnim pulzom jakosti 0, 1200, 1600, 2000 in 2400 V/cm. Neporirane celice imajo premer  $13,7 \pm 1,9 \mu\text{m}$  (SD), kar je nekoliko več od premera  $12,0 \mu\text{m}$ , izmerjenega v višjeprevodnem fosfatnem pufru (Marjanovič *et al.* 2010). Celice, porirane pri 1200 V/cm, imajo premer  $12,1 \pm 1,6 \mu\text{m}$ , pri 2800 V/cm pa  $13,6 \pm 2,3 \mu\text{m}$ . Pri reverzibilni elektroporaciji se jim velikost malo zmanjša, pri ireverzibilni poraciji pa se nekaterim celicam poveča velikost, v povprečju pa so enako velike kot neporirane celice.

Ločevanje elektroporiranih celic smo začeli pri enakih vrednostih parametrov, ki smo jih uporabili za ločevanje toplotno obdelanih (mrtvih) celic od živih. Pri pretoku celične suspenzije skozi komoro ob izključenem električnem polju so se elucijski profili močno prekrivali, kar pomeni, da sama komora brez dielektroforeze ne omogoča ločevanja celic in da imajo vse uporabljene celice podobno gostoto (slika 38).

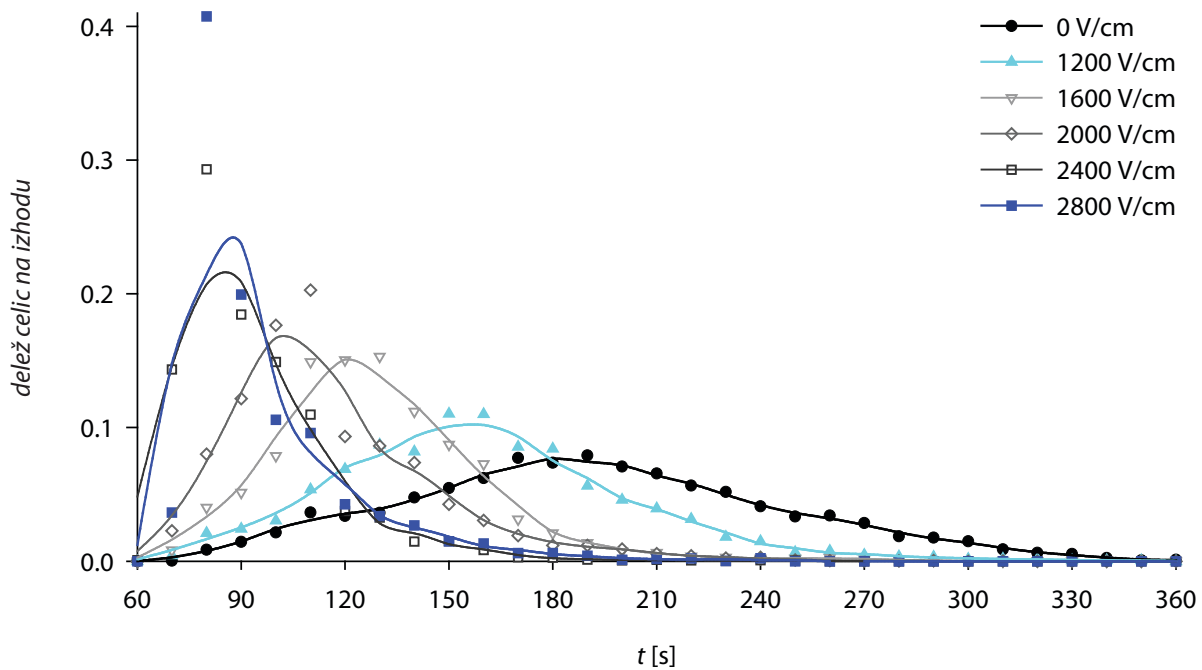


Slika 38: Elucijski profil elektroporiranih celic ob izključenem električnem polju.

Pri frekvenci električnega polja 65 kHz (članek II, slika 4B – Figure 4B) je elucijski profil večinoma ireverzibilno poriranih celic (2800 V/cm) podoben profilu toplotno obdelanih celic, profila reverzibilno poriranih (1200 V/cm) in neporiranih celic pa se med seboj razlikujeta v manjši meri. Pri frekvenci 50 kHz (slika 40) so elucijski profili podobni kot pri 65 kHz, pri 35 kHz (članek II, slika 4A – Figure 4A) pa so profili bolj stisnjeni proti manjšemu času potovanja celic skozi komoro, tako da skoraj vse celice pridejo na izhod iz komore v 4 min. Pri nadaljnjem zmanjševanju frekvence do 20 kHz (slika 39) vse celice še hitreje prispejo na izhod iz komore in razlika med profili je še manjša. Zbiranje celic v ločene posode na izhodu iz komore bi bilo v tem primeru težavno zaradi majhne razlike med časom prihoda ireverzibilno poriranih celic in ostalih celic.

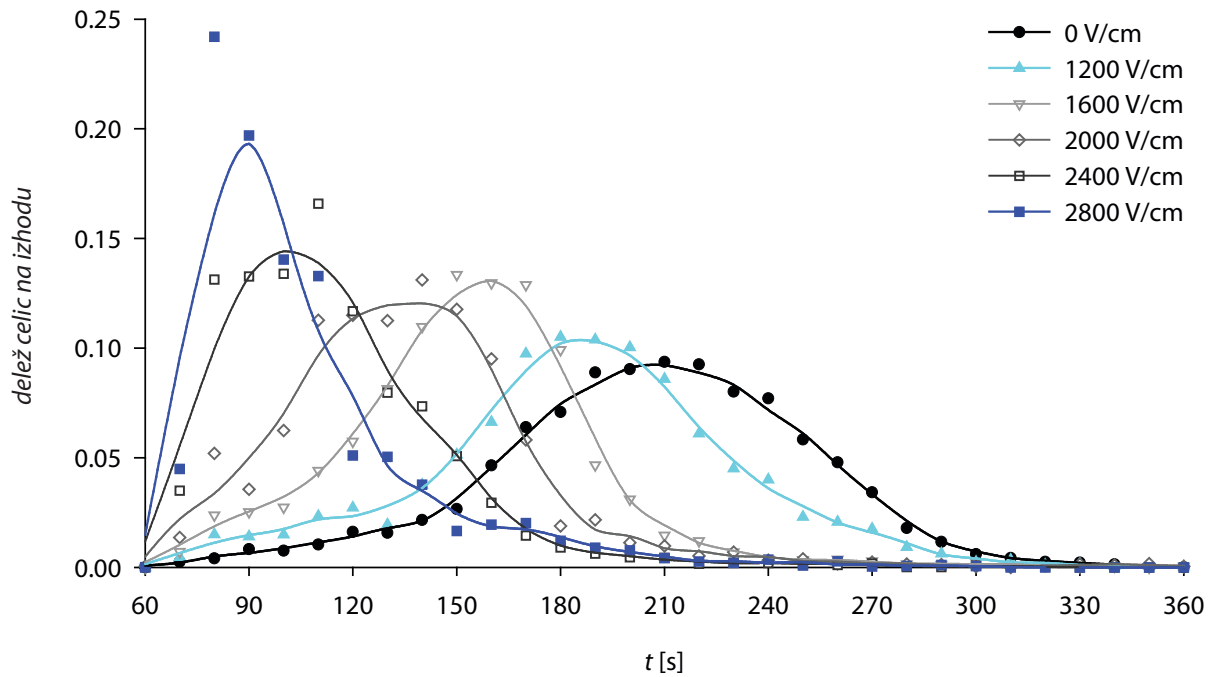


Slika 39: Elucijski profil elektroporiranih celic pri 20 kHz.

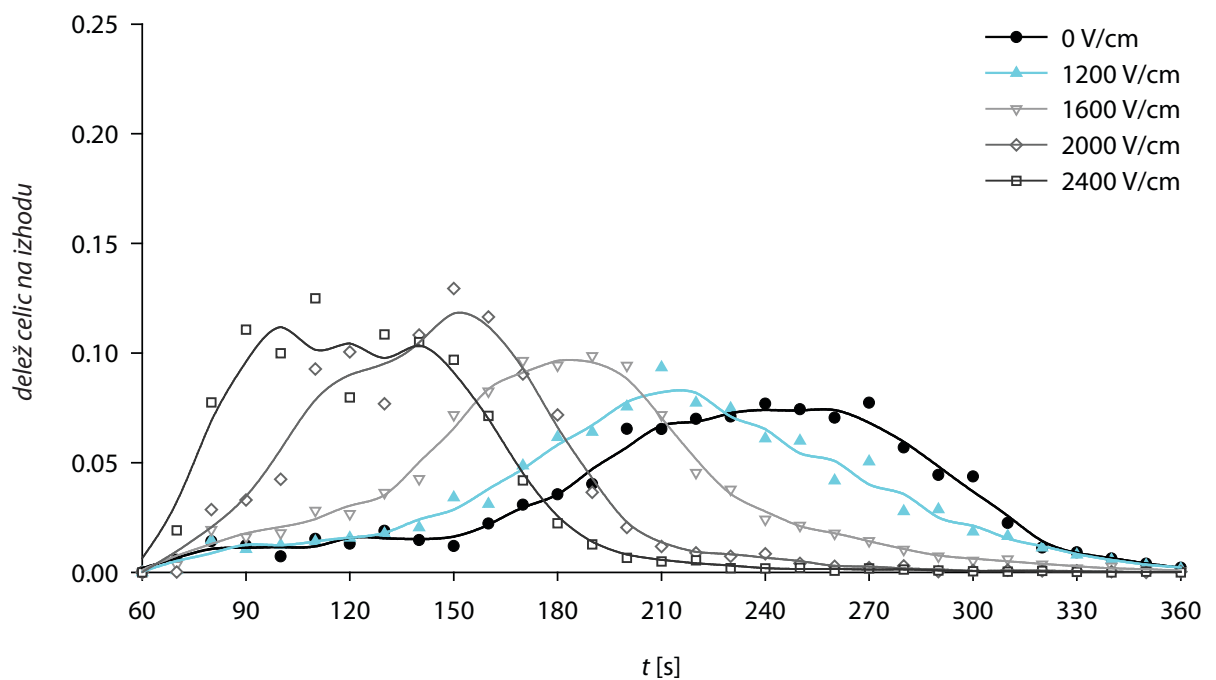


Slika 40: Elucijski profil elektroporiranih celic pri 50 kHz.

Pri frekvencah 80 kHz (slika 41), 95 kHz (članek II, slika 4C – Figure 4C) in 110 kHz (slika 42) na neporirane in elektroporirane (1200 V/cm) deluje pozitivna dielektroforeza. Na ireverzibilno elektroporirane celice v nobenem primeru ne deluje pozitivna dielektroforeza, pri 80 in 95 kHz nanje deluje približno enako velika dielektroforetska sila kot pri nižjih frekvencah, pri 110 kHz pa je velikost dielektroforetske sile manjša.



Slika 41: Elucijski profil elektroporiranih celic pri 80 kHz



Slika 42: Elucijski profil elektroporiranih celic pri 110 kHz.

Elucijski profili celic, elektroporiranih pri 1600, 2000 in 2400 V/cm, se nahajajo med profili celic, elektroporiranih pri 1200 in 2800 V/cm, kar pomeni, da se električne lastnosti celic v povprečju spreminjajo približno sorazmerno z jakostjo električnega polja, s katerim dosegamo elektroporacijo.

---

V članku I (slika 1 – Fig. 1) vidimo teoretični izračun Clausius-Mossottijevega faktorja za celice v mediju s prevodnostjo 27 mS/m. Zvezna črta prikazuje neporirane celice. Med elektroporacijo se zviša električna prevodnost membrane in  $f_{CM}$  ima pri nizkih frekvencah večjo vrednost kot pri neporiranih celicah. Poleg tega se zniža prevodnost citoplazme, saj ioni difundirajo iz celic v smeri gradienta koncentracije, kar vpliva na dielektroforetski spekter predvsem pri višjih frekvencah in pomakne mejno frekvenco proti višji vrednosti. Če bi bila v času ločevanja močno povišana le prevodnost membrane elektroporiranih celic, vse ostale lastnosti pa bi ostale enake, bi bila pri frekvencah, manjših od mejne frekvence, velikost dielektroforetske sile manjša, elektroporirane celice bi prišle na izhod iz komore kasneje, česar pa elucijski profili ne kažejo. Vidi pa se predvsem dolgoročni učinek znižanja prevodnosti citoplazme, kot predvideva model  $f_{CM}$  na isti sliki v članku I (Fig. 1), prikazan s črtkanima črtama.

Na učinkovitost ločevanja celic načeloma lahko vplivamo tudi s hitrostjo pretoka celične suspenzije in z izbiro amplitude ter frekvence električnega polja med elektrodami. Hitrost pretoka pri nizkih vrednostih le malo vpliva na učinkovitost ločevanja, saj je pomembna le relativna razlika v hitrosti celic, ki imajo ravnotežno višino blizu dna komore in celic blizu srednje višine kanala. Pri višjih hitrostih pa je čas, v katerem celice dosežejo ravnotežno lego, predolg glede na čas pretoka, zato te lege ne dosežejo, kar zmanjša učinkovitost ločevanja. Pri pretokih medija 30 in 60  $\mu\text{l}/\text{min}$  ni opazne razlike v uspešnosti ločevanja, pri nadaljnjem podvojevanju pretoka pa se je uspešnost opazno zmanjšala.

Jakost električnega polja neposredno vpliva na ravnotežno višino celic. S povečevanjem napetosti na elektrodah lahko povečamo razliko v ravnotežni višini, še posebej, če na en tip celic deluje močna negativna dielektroforeza, na drugega pa pozitivna dielektroforeza ali pa je blizu mejne frekvence, kjer je dielektroforetska sila majhna. Povečevanje jakosti polja pa je močno omejeno z nevarnostjo, da bi to polje povzročilo nenamensko oziroma nenačrtovano elektroporacijo celic, zato mora biti električno polje manjše od praga poracije.

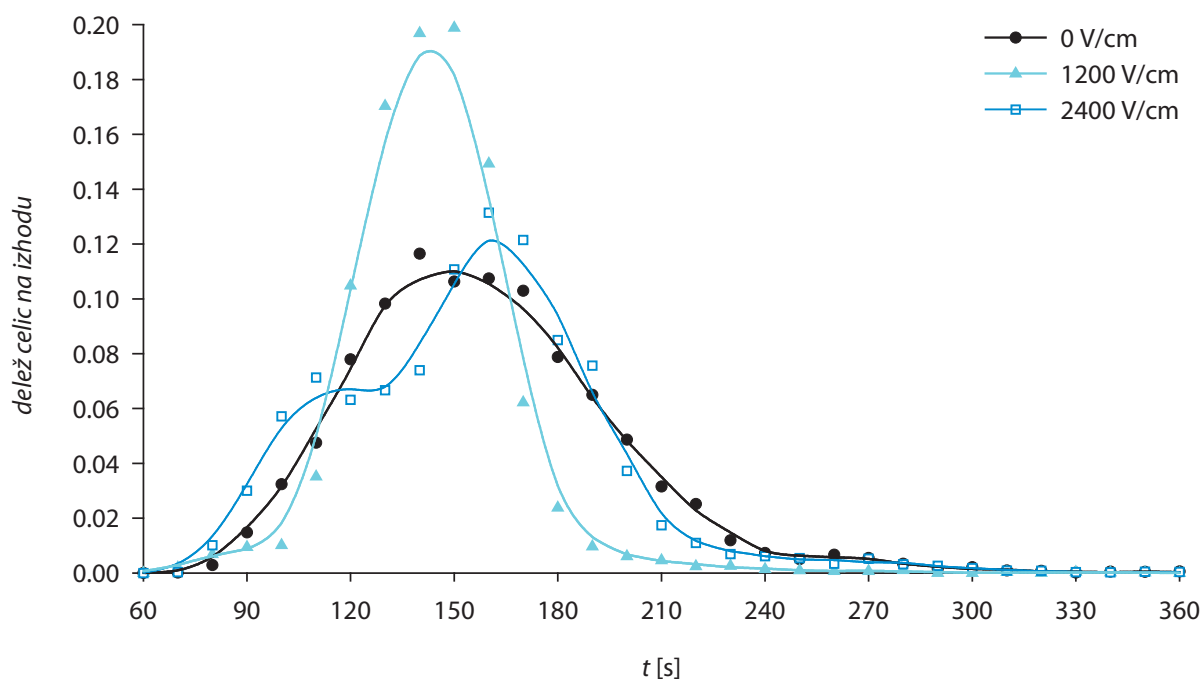
S frekvenco električnega polja vplivamo na velikost in smer dielektroforetske sile. Za DEP-FFF je najbolj uporabno frekvenčno področje tik pod mejno frekvenco, zato smo sistematično raziskali možnost ločevanja v frekvenčnem področju blizu teoretično izračunane mejne frekvence. V članku II (slika 4D – Figure 4D) so narisani vrhovi elucijskih profilov pri frekvencah med 35 in 95 kHz. Pri frekvencah pod 65 kHz so vrhovi profilov vse bližje skupaj. Pri 50 kHz je razlika med vrhovi sicer največja, vendar je pri 65 kHz manjše prekrivanje profilov reverzibilno (1200 V/cm) in ireverzibilno (2800 V/cm) poriranih celic. Ločevanje ireverzibilno elektroporiranih celic od reverzibilno poriranih in neporiranih skupaj je najboljšo pri 80 kHz, nadaljnje zviševanje frekvence pa povzroči znatno pozitivno dielektroforezo na celice, zato se prično celice kotaliti po dnu komore ali celo zaustavljati na elektrodah, zato ločevanje pri tako visokih frekvencah ni uporabno.

### 3.2.3. Ločevanje elektroporiranih celic B16F1 pri različnih parametrih

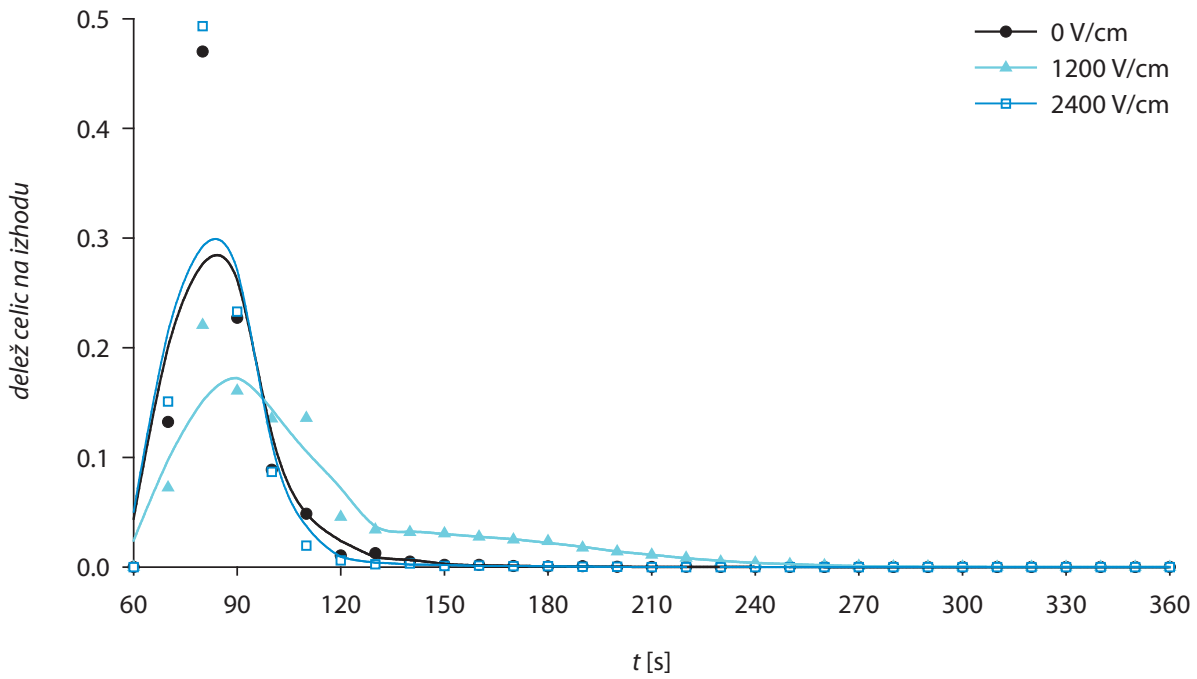
Za preizkus delovanja DEP-FFF komore z drugo vrsto celic smo uporabili celice B16F1. Izmerili smo velikost teh celic, saj je pri dielektroforezi mejna frekvenca odvisna tudi od velikosti celice. Povprečni premer celice v DEP mediju je  $17.2 \pm 2.0 \mu\text{m}$ , v višjeprevodnem fosfatnem pufru pa so izmerili vrednost  $15.8 \mu\text{m}$  (Marjanovič *et al.* 2010). Celice, izpostavljene električnemu polju  $1200 \text{ V/cm}$ , imajo premer  $14.8 \pm 1.8 \mu\text{m}$ , kar je manj od neporiranih celic, pri  $2400 \text{ V/cm}$  pa imajo premer  $17.2 \pm 3.0 \mu\text{m}$ . Pri celicah B16F1 se ireverzibilna elektroporacija pojavi že pri nižjih jakostih električnega polja kot pri celicah CHO, pri  $2800 \text{ V/cm}$  pa so mnoge celice že razpadle, zato smo preučevali le elektroporacijo pri amplitudah pulzov do  $2400 \text{ V/cm}$ .

Po enakem postopku kot za celice CHO smo izmerili elucijske profile za celice B16F1. Ob izključenem polju so vrhovi elucijskih profilov celic pri vseh treh amplitudah elektroporacijskih pulzov (0, 1200 in  $2400 \text{ V/cm}$ ) med 140 in 160 s (slika 43). Pri frekvencah 20, 35 in 50 kHz na vse celice deluje negativna dielektroforeza in po 4 min večina celic že doseže izhod iz komore (slika 44, slika 45 in slika 46). Pri 65 kHz je že opazen vpliv pozitivne dielektroforeze na neporirane in reverzibilno porirane celice, na ireverzibilno porirane celice pa še vedno deluje negativna dielektroforeza (slika 47).

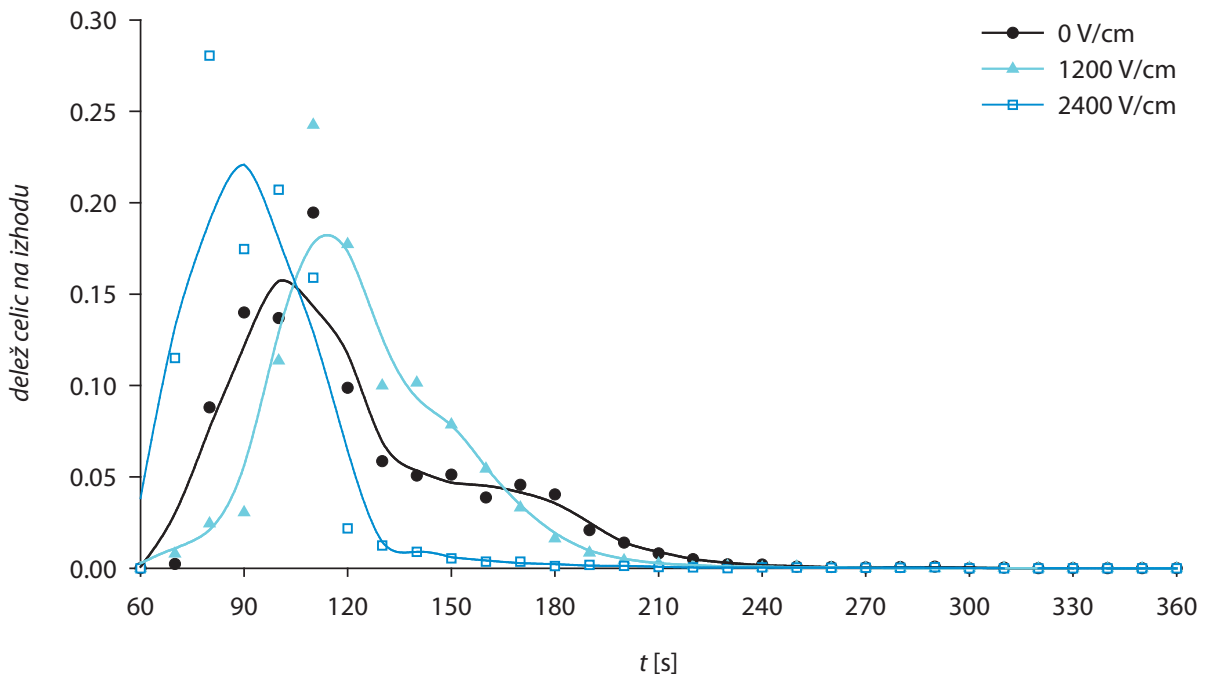
Ločevanje reverzibilno elektroporiranih celic od neporiranih je neuspešno, saj se delež posameznih celic po ločevanju bistveno ne poveča. Ločevanje ireverzibilno elektroporiranih celic od ostalih pa je bolj uspešno, pri 65 kHz z zbiranjem celic v zaporednih intervalih v prvem razredu dobimo 92 % ireverzibilno poriranih celic (60. – 120. s), v drugem pa 90 % reverzibilno poriranih in neporiranih celic skupaj (120. – 360. s).



Slika 43: Elucijski profil elektroporiranih celic B16F1 ob izključenem električnem polju.

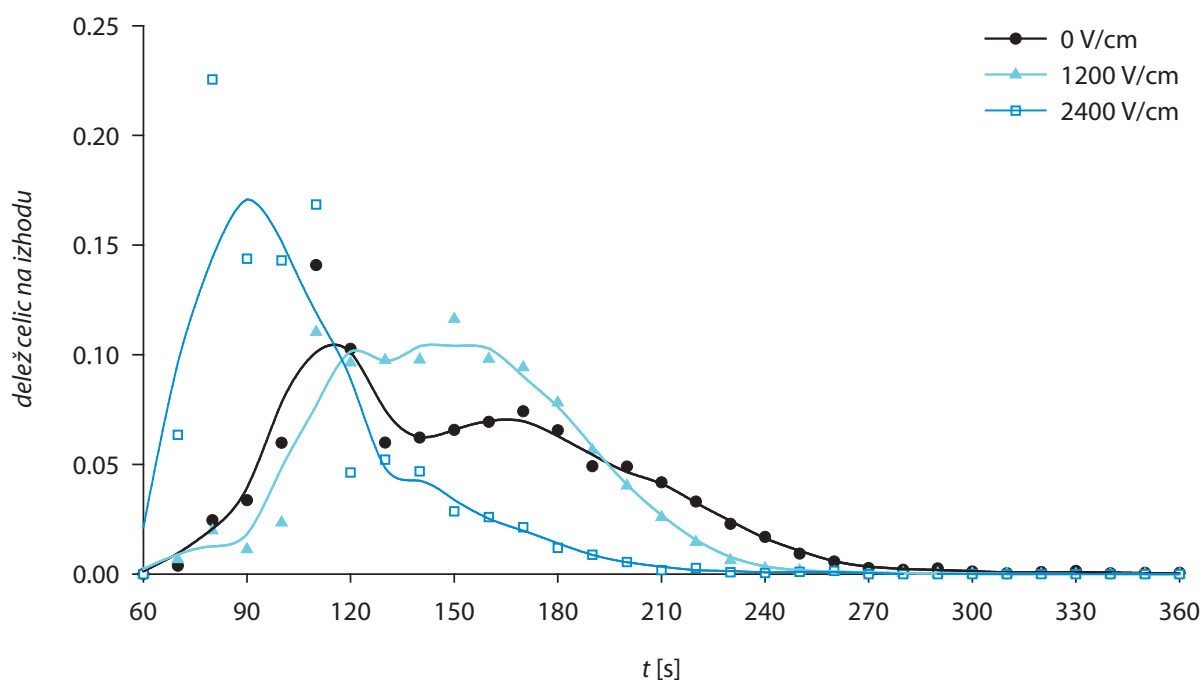


Slika 44: Elucijski profil elektroporiranih celic B16F1 pri 20 kHz.

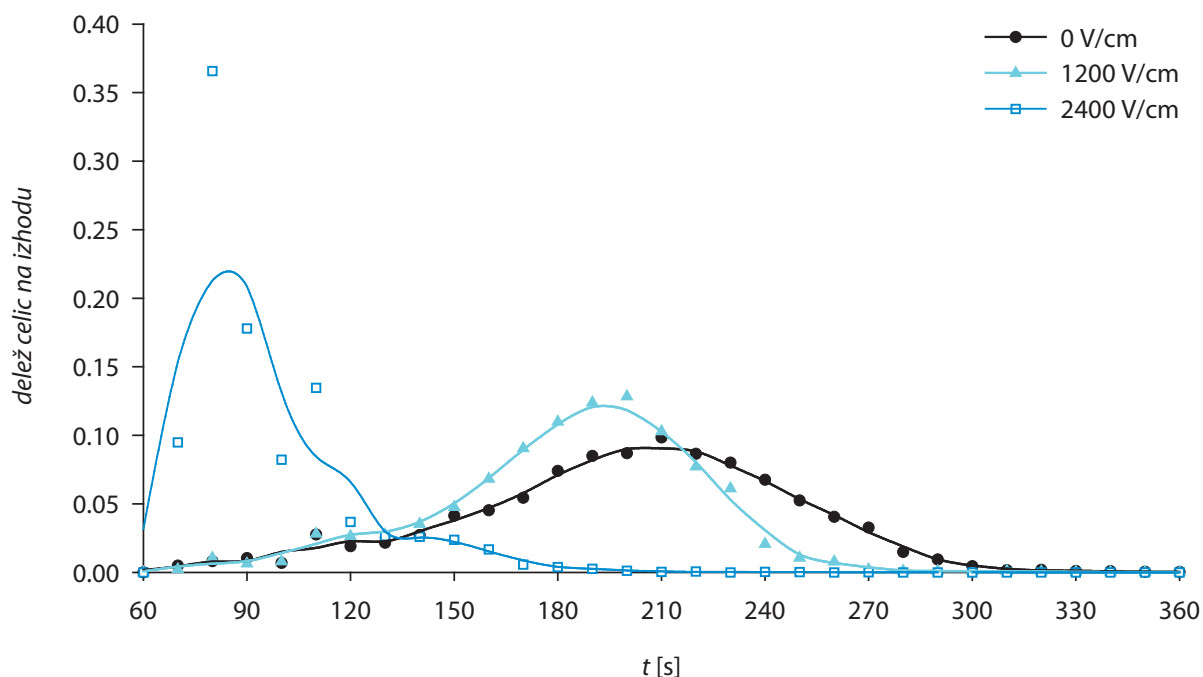


Slika 45: Elucijski profil elektroporiranih celic B16F1 pri 35 kHz.





Slika 46: Elucijski profil elektroporiranih celic B16F1 pri 50 kHz.



Slika 47: Elucijski profil elektroporiranih celic B16F1 pri 65 kHz.

Primerjava elucijskih profilov celic CHO in B16F1 pokaže, da so splošne ugotovitve o izvedljivosti ločevanja ireverzibilno poriranih celic podobne in verjetno razširljive tudi na druge vrste (vsaj sesalčjih) celic, vendar se elucijski profili in vpliv elektroporacije nanje kvantitativno pomembno razlikujejo. To kaže, da je potrebno parametre ločevanja celic optimizirati ločeno za vsako posamezno vrsto celic, ki jih želimo ločevati.



## 4. ZAKLJUČEK

V tej doktorski disertaciji je opisan razvoj metode dielektroforetskega ločevanja neporiranih, reverzibilno in ireverzibilno elektroporiranih celic. Na podlagi obstoječih dielektroforetskih sistemov in spoznanj o elektroporiranih celicah smo izbrali princip dielektroforetskega ločevanja v tankoplastnem pretoku v kanalu mikropretočne komore, ki omogoča hitro ločevanje velikega števila celic naenkrat, ločevanje pa temelji na velikosti dielektroforetske sile. Z numeričnimi simulacijami smo določili optimalne dimenzije elektrod in komore. Za izdelavo elektrod smo uporabili osnovno ploščo iz borosilikatnega stekla, na katerem smo s standardnim postopkom fotolitografije in jedkanja izdelali elektrode iz zlata. Kanal v komori smo oblikovali z obojestranskim lepilnim trakom ustrezne debeline in pokrili s steklenim pokrovom, v katerem so bile izvrtane luknje za vhod in izhod iz komore. Celotna komora je prozorna in debela le 3 mm, kar omogoča opazovanje pod mikroskopom. Lepilni trak omogoča tesnjenje kanala pred iztekanjem tekočine, v vroči vodi pa je komoro mogoče razstaviti in temeljito očistiti.

85

Za razvoj protokola ločevanja smo kot model elektroporiranih celic uporabili toplotno obdelane celice CHO, pri katerih se podobno kot pri elektroporiranih celicah spremeni električna prevodnost membrane. S toplotno obdelavo pri 50°C celica kratkoročno bistveno ne spremeni oblike in videza, dolgoročno pa ne izkazuje preživetja, saj se membrana ne vrne v fiziološko stanje kot pri reverzibilni elektroporaciji. Dosegli smo uspešno ločevanje toplotno obdelanih in neobdelanih celic pri 65 kHz, pri enaki frekvenci, a pri polovico nižji amplitudi dielektroforetskega polja pa smo dosegli tudi učinkovito ločevanje ireverzibilno poriranih celic od reverzibilno poriranih in neporiranih celic skupaj (preko 90 %). Ločevanje reverzibilno poriranih celic (1200 V/cm) od neporiranih se je izkazalo za manj učinkovito, a še vedno izvedljivo, če je namen zgolj povišanje deleža posameznih celic v vzorcu za nadaljnje preučevanje.

Če primerjamo izmerjene dielektroforetske spektre celic s teoretičnim modelom, lahko zaključimo, da je učinek povišanja prevodnosti membrane majhen (verjetno zaradi okrevanja, t.j. hitrega zapiranja por v primerjavi s časi pretoka skozi komoro), razlika v spektrih poriranih in neporiranih celic pa je predvsem posledica znižanja prevodnosti citoplazme (zaradi iztekanja celičnih ionov v nizkoprevodni dielektroforetski medij).

Primerjava elucijskih profilov celic CHO in B16F1 pokaže, da so splošne ugotovitve o izvedljivosti ločevanja ireverzibilno poriranih celic podobne in bi lahko razvito komoro uporabili tudi za ločevanje drugih vrst celic, za optimalno učinkovitost pa je potrebno optimizirati parametre ločevanja, predvsem frekvenco dielektroforetskega polja, za vsako posamezno vrsto celic.

Dielektroforetsko ločevanje v komori DEP-FFF bi lahko izboljšali s fokusiranjem vseh celic ob začetku kanala na enako višino, s čimer bi se zmanjšal prehodni pojav, po katerem celice dosežejo ravnotežno višino, elucijski profili pa bi se posledično bolj razmaknili. Z daljšim kanalom bi prav tako dosegli bolj razmaknjene profile, vendar bi se s tem podaljšal čas ločevanja, kar je zaradi okrevanja elektroporiranih celic lahko problematično. Uspešnost ločevanja reverzibilno poriranih celic od neporiranih bi lahko izboljšali tudi združitvijo izvedbe elektroporacije in dielektroforetskega ločevanja v eni sami komori, s čimer bi izločili čas, potreben za prenos elektroporiranih celic iz elektroporacijske kivete v komoro za dielektroforetsko ločevanje.

---

Dielektroforetsko ločevanje kljub pospešenem razvoju v zadnjih desetih letih še ni komercialno razširjeno. Zmogljivost šaržnega ločevanja je običajno nekaj  $\mu\text{l}$  celične suspenzije, kar pomeni  $10^3$  do  $10^5$  celic, kar je manj od količin, potrebnih za tipično delo s celicami v običajnih laboratorijskih napravah. Druga ovira je specifičnost naprave za dielektroforetsko ločevanje, saj je za vsako vrsto celic potrebno prilagoditi vsaj protokol ločevanja. Poleg tega so elektrode pogosto premalo robustne, strošek izdelave komor – tudi komore, predstavljene v tej disertaciji – pa je prevelik za enkratno uporabo komore. Miniaturizacija laboratorijskih naprav in združevanje postopkov obdelave in analize celic na en sam čip bosta zagotovo prispevala k povečanju uporabe dielektroforetskih sistemov za ločevanje in zanimanja zanje.

---

# IZVIRNA PRISPEVKA K ZNANOSTI

## 1. Mikropretočna komora za dielektroforetsko ločevanje bioloških celic

Mikropretočne komore za dielektroforetsko ločevanje, ki so bile razvite in opisane v literaturi, so namenjeni specifičnemu ločevanju določenih skupin ali vrst celic, zato jih je potrebno prilagoditi specifičnemu problemu. Izdelali smo komoro DEP-FFF, ki omogoča hitro in hkratno ločevanje celic, ki se razlikujejo po prevodnosti membrane. Z numeričnim modelom smo izračunali optimalne dimenzije in obliko elektrod, ki zagotavlja ustrezno velikost in krajevno porazdelitev dielektroforetske sile v komori. V postopu načrtovanja in optimizacije komore smo uporabili toplotno obdelane celice. Pri zmerni toplotni obdelavi pri 50 °C celice ohranijo svoj videz in obliko, dolgoročno pa ne izkazujejo preživetja. Z meritvami na komori in poizkusi z njo sem določil frekvenco in amplitudo električnega polja ter hitrost pretoka, pri katerih je ločevanje najbolj učinkovito.

87

## 2. Preučitev možnosti ločevanja neelektroporiranih, reverzibilno elektroporiranih in ireverzibilno elektroporiranih celic v mikropretočni komori

Komoro DEP-FFF, razvito v sklopu prvega prispevka, smo uporabili za preučevanje možnosti ločevanja celic izpostavljenih različnim elektroporacijskim pulzom. Izmerili smo dielektroforetski odziv neporiranih, reverzibilno elektroporiranih in ireverzibilno elektroporiranih celic pri različnih frekvencah. Poskuse smo opravili na dveh celičnih linijah. Določili smo optimalne parametre, ki omogočajo sočasno ločevanje ireverzibilno poriranih, reverzibilno poriranih in neporiranih celic v tri ločene skupine ali ločevanje ireverzibilno poriranih od reverzibilno poriranih in neporiranih skupaj.

- Abidor, I.G. and Sowers, A.E., 1992. Kinetics and mechanism of cell membrane electrofusion. *Biophysical journal*, 61 (6), 1557–1569.
- Akagi, T. and Ichiki, T., 2008. Cell electrophoresis on a chip: what can we know from the changes in electrophoretic mobility? *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391 (7), 2433–2441.
- Albrecht, J.W., El-Ali, J., and Jensen, K.F., 2007. Cascaded Free-flow Isoelectric Focusing for Improved Focusing Speed and Resolution. *Analytical chemistry*, 79 (24), 9364–9371.
- An, J., Lee, J., Lee, S., Park, J., and Kim, B., 2009. Separation of malignant human breast cancer epithelial cells from healthy epithelial cells using an advanced dielectrophoresis-activated cell sorter (DACS). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 394 (3), 801–809.
- Andersson, H. and Van den Berg, A., 2003. Microfluidic devices for cellomics: a review. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 92 (3), 315–325.
- André, F. and Mir, L.M., 2004. DNA electrotransfer: its principles and an updated review of its therapeutic applications. *Gene Therapy*, 11 Suppl 1, S33–42.
- Arnold, W.M. and Zimmermann, U., 1982. Rotation of an isolated cell in a rotating electric field. *Die Naturwissenschaften*, 69 (6), 297–298.
- Aronsson, K., Ronner, U., and Borch, E., 2005. Inactivation of *Escherichia coli*, *Listeria innocua* and *Saccharomyces cerevisiae* in relation to membrane permeabilization and subsequent leakage of intracellular compounds due to pulsed electric field processing. *International Journal of Food Microbiology*, 99 (1), 19–32.
- Barrau, C., Teissié, J., and Gabriel, B., 2004. Osmotically induced membrane tension facilitates the triggering of living cell electropermeabilization. *Bioelectrochemistry*, 63 (1–2), 327–332.
- Becker, F., Wang, X., Huang, Y., Pethig, R., Vykoukal, J., and Gascoyne, P., 1995. Separation of human breast-cancer cells from blood by differential dielectric affinity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92 (3), 860–864.
- Bhagat, A., Bow, H., Hou, H., Tan, S., Han, J., and Lim, C., 2010. Microfluidics for cell separation. *Medical and Biological Engineering and Computing*, 48 (10), 999–1014.
- Cao, Y., Yang, J., Yin, Z.Q., Luo, H.Y., Yang, M., Hu, N., Huo, D.Q., Hou, C.J., Jiang, Z.Z., Zhang, R.Q., Xu, R., and Zheng, X.L., 2008. Study of high-throughput cell electrofusion in a microelectrode-array chip. *Microfluidics and Nanofluidics*, 5 (5), 669–675.
- Castellanos, A., Ramos, A., Gonzalez, A., Green, N.G., and Morgan, H., 2003. Electrohydrodynamics and dielectrophoresis in microsystems: scaling laws. *Journal of Physics D-Applied Physics*, 36 (20), 2584–2597.
- Chen, C., Smye, S.W., Robinson, M.P., and Evans, J.A., 2006. Membrane electroporation theories: a review. *Medical and Biological Engineering and Computing*, 44 (1-2), 5–14.

- 
- Cheng, X., Irimia, D., Dixon, M., Sekine, K., Demirci, U., Zamir, L., Tompkins, R.G., Rodriguez, W., and Toner, M., 2007. A microfluidic device for practical label-free CD4+ T cell counting of HIV-infected subjects. *Lab on a Chip*, 7 (2), 170–178.
- Cherukat, P., McLaughlin, J.B., and Dandy, D.S., 1999. A computational study of the inertial lift on a sphere in a linear shear flow field. *International Journal of Multiphase Flow*, 25 (1), 15–33.
- Chiou, P.Y., Ohta, A.T., and Wu, M.C., 2005. Massively parallel manipulation of single cells and microparticles using optical images. *Nature*, 436 (7049), 370–372.
- Cho, Y.-K., Kim, S., Lee, K., Park, C., Lee, J.-G., and Ko, C., 2009. Bacteria concentration using a membrane type insulator-based dielectrophoresis in a plastic chip. *Electrophoresis*, 30 (18), 3153–3159.
- Choi, J.-W., Ahn, C.H., Bhansali, S., and Henderson, H.T., 2000. A new magnetic bead-based, filterless bio-separator with planar electromagnet surfaces for integrated bio-detection systems. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 68 (1-3), 34–39.
- Chou, C.F., Tegenfeldt, J.O., Bakajin, O., Chan, S.S., Cox, E.C., Darnton, N., Duke, T., and Austin, R.H., 2002. Electrodeless dielectrophoresis of single- and double-stranded DNA. *Biophysical Journal*, 83 (4), 2170–2179.
- Cong, H. and Pan, T., 2009. Microfabrication of conductive PDMS on flexible substrates for biomedical applications. In: *Nano/Micro Engineered and Molecular Systems, 2009. NEMS 2009. 4th IEEE International Conference on*. 731 –734.
- Cummings, E.B. and Singh, A.K., 2003. Dielectrophoresis in microchips containing arrays of insulating posts: Theoretical and experimental results. *Analytical Chemistry*, 75 (18), 4724–4731.
- Čemažar, J. and Kotnik, T., 2012. Dielectrophoretic field-flow fractionation of electroporated cells. *Electrophoresis*, 33 (18), 2867–2874.
- Dainiak, M., Kumar, A., Galaev, I., and Mattiasson, B., 2007. Methods in cell separations. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 106, 1–18.
- Davalos, R.V., Mir, L.M., and Rubinsky, B., 2005. Tissue Ablation with Irreversible Electroporation. *Annals of Biomedical Engineering*, 33 (2), 223–231.
- David, R., Groebner, M., and Franz, W.-M., 2005. Magnetic cell sorting purification of differentiated embryonic stem cells stably expressing truncated human CD4 as surface marker. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 23 (4), 477–482.
- Delemotte, L., Dehez, F., Treptow, W., and Tarek, M., 2008. Modeling Membranes under a Transmembrane Potential. *The Journal of Physical Chemistry B*, 112 (18), 5547–5550.
- Delemotte, L. and Tarek, M., 2012. Molecular Dynamics Simulations of Lipid Membrane Electroporation. *The Journal of Membrane Biology*, 245 (9), 531–543.
- Dholakia, K., MacDonald, M.P., Zemánek, P., and Cizmár, T., 2007. Cellular and Colloidal Separation

- 
- Using Optical Forces. *In: Laser Manipulation of Cells and Tissues*. Academic Press, 467–495.
- Doh, I. and Cho, Y.H., 2005. A continuous cell separation chip using hydrodynamic dielectrophoresis (DEP) process. *Sensors and Actuators a-Physical*, 121 (1), 59–65.
- Falokun, C.D., Mavituna, F., and Markx, G.H., 2003. AC electrokinetic characterisation and separation of cells with high and low embryogenic potential in suspension cultures of carrot (*Daucus carota*). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 75 (3), 261–272.
- Fatoyinbo, H.O., Hoeffges, K.F., and Hughes, M.P., 2008. Rapid-on-chip determination of dielectric properties of biological cells using imaging techniques in a dielectrophoresis dot microsystem. *Electrophoresis*, 29 (1), 3–10.
- Fox, M.B., Esveld, D.C., Valero, A., Lutge, R., Mastwijk, H.C., Bartels, P.V., Van den Berg, A., and Boom, R.M., 2006. Electroporation of cells in microfluidic devices: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 385 (3), 474–485.
- Frenea, M., Faure, S.P., Le Pioufle, B., Coquet, P., and Fujita, H., 2003. Positioning living cells on a high-density electrode array by negative dielectrophoresis. *Materials Science & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems*, 23 (5), 597–603.
- Gabriel, B. and Teissié, J., 1997. Direct observation in the millisecond time range of fluorescent molecule asymmetrical interaction with the electropermeabilized cell membrane. *Biophysical Journal*, 73 (5), 2630–2637.
- Gagnon, Z.R., 2011. Cellular dielectrophoresis: Applications to the characterization, manipulation, separation and patterning of cells. *Electrophoresis*, 32 (18), 2466–2487.
- Gascoyne, P.R.C., 2009. Dielectrophoretic-field flow fractionation analysis of dielectric, density, and deformability characteristics of cells and particles. *Analytical Chemistry*, 81 (21), 8878–8885.
- Gascoyne, P.R.C., Satayavivad, J., and Ruchirawat, M., 2004. Microfluidic approaches to malaria detection. *Acta Tropica*, 89 (3), 357–369.
- Gascoyne, P.R.C., Wang, X.B., Huang, Y., and Becker, F.F., 1997. Dielectrophoretic separation of cancer cells from blood. *Ieee Transactions on Industry Applications*, 33 (3), 670–678.
- Gijs, M.A.M., 2004. Magnetic bead handling on-chip: new opportunities for analytical applications. *Microfluidics and Nanofluidics*, 1 (1), 22–40.
- Glaser, R.W., Leikin, S.L., Chernomordik, L.V., Pastushenko, V.F., and Sokirko, A.I., 1988. Reversible electrical breakdown of lipid bilayers: formation and evolution of pores. *Biochimica et biophysica acta*, 940 (2), 275–287.
- Golzio, M., Teissié, J., and Rols, M.P., 2002a. Cell synchronization effect on mammalian cell permeabilization and gene delivery by electric field. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1563, 23–28.
- Golzio, M., Teissié, J., and Rols, M.-P., 2002b. Direct visualization at the single-cell level of electrically



- 
- mediated gene delivery. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99 (3), 1292–1297.
- Gossett, D.R., Weaver, W.M., Mach, A.J., Hur, S.C., Tse, H.T.K., Lee, W., Amini, H., and Di Carlo, D., 2010. Label-free cell separation and sorting in microfluidic systems. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397 (8), 3249–3267.
- Han, K.-H. and Frazier, A.B., 2008. Lateral-driven continuous dielectrophoretic microseparators for blood cells suspended in a highly conductive medium. *Lab on a Chip*, 8 (7), 1079.
- Hawkes, J.J., Barber, R.W., Emerson, D.R., and Coakley, W.T., 2004. Continuous cell washing and mixing driven by an ultrasound standing wave within a microfluidic channel. *Lab on a Chip*, 4 (5), 446.
- Hawkins, B.G., Huang, C., Arasanipalai, S., and Kirby, B.J., 2011. Automated dielectrophoretic characterization of *Mycobacterium smegmatis*. *Analytical Chemistry*, 83 (9), 3507–3515.
- Holmes, D., Green, N.G., and Morgan, H., 2003. Microdevices for dielectrophoretic flow-through cell separation. *Ieee Engineering in Medicine and Biology Magazine*, 22 (6), 85–90.
- Hsu, J.-P., Yeh, L.-H., and Ku, M.-H., 2007. Evaluation of the electric force in electrophoresis. *Journal of Colloid and Interface Science*, 305 (2), 324–329.
- Hsu, T.R., 2008. *MEMS and microsystems : design, manufacture, and nanoscale engineering*. 2nd ed. John Wiley & Sons.
- Hu, N., Yang, J., Yin, Z.-Q., Ai, Y., Qian, S., Svir, I.B., Xia, B., Yan, J.-W., Hou, W.-S., and Zheng, X.-L., 2011. A high-throughput dielectrophoresis-based cell electrofusion microfluidic device. *Electrophoresis*, 32, 2488–2495.
- Hu, Q., Joshi, R.P., and Beskok, A., 2009. Model study of electroporation effects on the dielectrophoretic response of spheroidal cells. *Journal of Applied Physics*, 106 (2), 024701.
- Huang, Y., Wang, X.B., Becker, F.F., and Gascoyne, P.R.C., 1997. Introducing dielectrophoresis as a new force field for field-flow fractionation. *Biophysical Journal*, 73 (2), 1118–1129.
- Huang, Y., Wang, X.-B., Tame, J.A., and Pethig, R., 1993. Electrokinetic behaviour of colloidal particles in travelling electric fields: studies using yeast cells. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 26 (9), 1528–1535.
- Hughes, M.P., 2002. Strategies for dielectrophoretic separation in laboratory-on-a-chip systems. *Electrophoresis*, 23 (16), 2569–2582.
- Hughes, M.P., 2003. *Nanoelectromechanics in Engineering and Biology*. New York: CRC Press.
- Iliescu, C., Yu, L.M., Xu, G.L., and Tay, F.E.H., 2006. A dielectrophoretic chip with a 3-D electric field gradient. *Journal of Microelectromechanical Systems*, 15 (6), 1506–1513.
- Irimajiri, A., Hanai, T., and Inouye, A., 1979. A dielectric theory of “multi-stratified shell” model with its application to a lymphoma cell. *Journal of Theoretical Biology*, 78 (2), 251–269.

- 
- Jamnani, D., 2009. Modelling and Simulation of a Single Particle in Laminar Flow Regime of a Newtonian Liquid. In: *Proceedings of the COMSOL Conference 2009 Bangalore*. Presented at the COMSOL Conference 2009 Bangalore.
- Jang, L.-S., Huang, P.-H., and Lan, K.-C., 2009. Single-cell trapping utilizing negative dielectrophoretic quadrupole and microwell electrodes. *Biosensors and Bioelectronics*, 24 (12), 3637–3644.
- Jen, C.-P. and Chen, T.-W., 2009. Trapping of cells by insulator-based dielectrophoresis using open-top microstructures. *Microsystem Technologies*, 15 (8), 1141–1148.
- Jonáš, A. and Zemánek, P., 2008. Light at work: The use of optical forces for particle manipulation, sorting, and analysis. *Electrophoresis*, 29 (24), 4813–4851.
- Jones, T.B., 1985. Multipole corrections to dielectrophoretic force. *IEEE Transactions on Industry Applications*, 21 (4), 930–934.
- Jones, T.B., 2003. Basic theory of dielectrophoresis and electrorotation. *Ieee Engineering in Medicine and Biology Magazine*, 22 (6), 33–42.
- Joseph, D.D. and Ocano, D., 2002. Slip velocity and lift. *Journal of Fluid Mechanics*, 454, 263–286.
- Kandušer, M., Šentjerc, M., and Miklavčič, D., 2005. Cell membrane fluidity related to electroporation and resealing. *European Biophysics Journal*, 35 (3), 196–204.
- Kandušer, M., Šentjerc, M., and Miklavčič, D., 2008. The temperature effect during pulse application on cell membrane fluidity and permeabilization. *Bioelectrochemistry*, 74 (1), 52–57.
- Kang, Y., Li, D., Kalams, S.A., and Eid, J.E., 2008. DC-Dielectrophoretic separation of biological cells by size. *Biomedical Microdevices*, 10 (2), 243–249.
- Kapishnikov, S., Kantsler, V., and Steinberg, V., 2006. Continuous particle size separation and size sorting using ultrasound in a microchannel. *Journal of Statistical Mechanics: Theory and Experiment*, 2006 (01), 01012–01012.
- Khoshmanesh, K., Nahavandi, S., Baratchi, S., Mitchell, A., and Kalantar-zadeh, K., 2011. Dielectrophoretic platforms for bio-microfluidic systems. *Biosensors and Bioelectronics*, 26 (5), 1800–1814.
- Khoshmanesh, K., Zhang, C., Tovar-Lopez, F., Nahavandi, S., Baratchi, S., Mitchell, A., and Kalantar-Zadeh, K., 2010. Dielectrophoretic-activated cell sorter based on curved microelectrodes. *Microfluidics and Nanofluidics*, 9, 411–426.
- Kim, J., Hwang, I., Britain, D., Chung, T.D., Sun, Y., and Kim, D.-H., 2011. Microfluidic approaches for gene delivery and gene therapy. *Lab on a Chip*, 11 (23), 3941–3948.
- Kim, S.H., Yamamoto, T., Fourmy, D., and Fujii, T., 2011. Electroactive Microwell Arrays for Highly Efficient Single-Cell Trapping and Analysis. *Small*, 7 (22), 3239–3247.
- Kim, U., Shu, C.-W., Dane, K.Y., Daugherty, P.S., Wang, J.Y.J., and Soh, H.T., 2007. Selection of mammalian cells based on their cell-cycle phase using dielectrophoresis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104 (52), 20708–20712.

- 
- Kirschbaum, M., Guernth-Marschner, C.R., Cherré, S., Peña, A. de P., Jaeger, M.S., Kroczeck, R.A., Schnelle, T., Mueller, T., and Duschl, C., 2012. Highly controlled electrofusion of individually selected cells in dielectrophoretic field cages. *Lab on a Chip*, 12 (3), 443–450.
- Klößen, B., Reichle, C., Kohlsmann, S., and Kramer, K.D., 1996. Dielectric spectroscopy as a sensor of membrane headgroup mobility and hydration. *Biophysical Journal*, 71 (6), 3251–3260.
- Kotnik, T., Maček-Lebar, A., Kandušer, M., Pucihar, G., Pavlin, M., Valič, B., and Miklavčič, D., 2005. Elektroporacija celične membrane : teorija ter poizkusi in vitro. *Medicinski razgledi*, 44, 81–90.
- Kotnik, T. and Miklavčič, D., 2000a. Theoretical evaluation of the distributed power dissipation in biological cells exposed to electric field. *Bioelectromagnetics*, 21, 385–394.
- Kotnik, T. and Miklavčič, D., 2000b. Second-order model of membrane electric field induced by alternating external electric fields. *IEEE transactions on bio-medical engineering*, 47 (8), 1074–1081.
- Kotnik, T., Pucihar, G., Reberšek, M., Miklavčič, D., and Mir, L.M., 2003. Role of pulse shape in cell membrane electropermeabilization. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1614 (2), 193–200.
- Kuo, C.T. and Liu, C.H., 2009. A Bubble-Free AC Electrokinetic Micropump Using the Asymmetric Capacitance-Modulated Microelectrode Array for Microfluidic Flow Control. *Journal of Microelectromechanical Systems*, 18 (1), 38–51.
- Lapizco-Encinas, B.H., Davalos, R.V., Simmons, B.A., Cummings, E.B., and Fintschenko, Y., 2005. An insulator-based (electrodeless) dielectrophoretic concentrator for microbes in water. *Journal of Microbiological Methods*, 62 (3), 317–326.
- Lapizco-Encinas, B.H., Simmons, B.A., Cummings, E.B., and Fintschenko, Y., 2004. Dielectrophoretic concentration and separation of live and dead bacteria in an array of insulators. *Analytical Chemistry*, 76 (6), 1571–1579.
- Lau, A.N.K., Ohta, A.T., Phan, H.L., Hsu, H.-Y., Jamshidi, A., Chiou, P.-Y., and Wu, M.C., 2009. Antifouling coatings for optoelectronic tweezers. *Lab on a Chip*, 9 (20), 2952.
- Laurell, T., Petersson, F., and Nilsson, A., 2007. Chip integrated strategies for acoustic separation and manipulation of cells and particles. *Chemical Society Reviews*, 36 (3), 492.
- Lee, E.W., Thai, S., and Kee, S.T., 2010. Irreversible electroporation: a novel image-guided cancer therapy. *Gut and Liver*, 4 Suppl 1, 99–104.
- Lee, S.W. and Tai, Y.C., 1999. A micro cell lysis device. *Sensors and Actuators a-Physical*, 73 (1-2), 74–79.
- Lee, Y. and Deng, P., 2012. Review of micro/nano technologies and theories for electroporation of biological cells. *Science China Physics, Mechanics and Astronomy*, 55 (6), 996–1003.
- Lewpiriyawong, N., Kandaswamy, K., Yang, C., Ivanov, V., and Stocker, R., 2011. Microfluidic characterization and continuous separation of cells and particles using conducting

- 
- poly(dimethyl siloxane) electrode induced alternating current-dielectrophoresis. *Analytical Chemistry*, 83 (24), 9579–9585.
- Li, H.B. and Bashir, R., 2002. Dielectrophoretic separation and manipulation of live and heat-treated cells of *Listeria* on microfabricated devices with interdigitated electrodes. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 86 (2-3), 215–221.
- Li, H.B. and Bashir, R., 2004. On the design and optimization of micro-fluidic dielectrophoretic devices: A dynamic simulation study. *Biomedical Microdevices*, 6 (4), 289–295.
- Li, Y.L., Dalton, C., Crabtree, H.J., Nilsson, G., and Kaler, K., 2007. Continuous dielectrophoretic cell separation microfluidic device. *Lab on a Chip*, 7 (2), 239–248.
- Liang, H.-W., Guan, Q.-F., Zhu, Z.-, Song, L.-T., Yao, H.-B., Lei, X., and Yu, S.-H., 2012. Highly conductive and stretchable conductors fabricated from bacterial cellulose. *NPG Asia Materials*, 4 (6), e19.
- Lis, M., Wizert, A., Przybylo, M., Langner, M., Swiatek, J., Jungwirth, P., and Cwiklik, L., 2011. The effect of lipid oxidation on the water permeability of phospholipids bilayers. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 13 (39), 17555–17563.
- Liu, H. and Bau, H.H., 2004. The dielectrophoresis of cylindrical and spherical particles submerged in shells and in semi-infinite media. *Physics of Fluids*, 16 (5), 1217–1228.
- Liu, Y., Cheng, D.K., Sonek, G.J., Berns, M.W., Chapman, C.F., and Tromberg, B.J., 1995. Evidence for localized cell heating induced by infrared optical tweezers. *Biophysical Journal*, 68 (5), 2137–2144.
- Lu, H., Schmidt, M.A., and Jensen, K.F., 2005. A microfluidic electroporation device for cell lysis. *Lab on a Chip*, 5 (1), 23–29.
- MacQueen, L.A., Buschmann, M.D., and Wertheimer, M.R., 2008. Gene delivery by electroporation after dielectrophoretic positioning of cells in a non-uniform electric field. *Bioelectrochemistry*, 72 (2), 141–148.
- MacQueen, L.A., Thibault, M., Buschmann, M.D., and Wertheimer, M.R., 2012. Electro-manipulation of biological cells in microdevices. *IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation*, 19 (4), 1261–1268.
- Maček-Lebar, A. and Miklavčič, D., 2001. Cell electropermeabilization to small molecules in vitro: control by pulse parameters. *Radiology and Oncology*, 35 (3), 193–202.
- Marjanovič, I., Haberl, S., Miklavčič, D., Kandušer, M., and Pavlin, M., 2010. Analysis and comparison of electrical pulse parameters for gene electrotransfer of two different cell lines. *Journal of Membrane Biology*, 236 (1), 97–105.
- Markx, G.H., Pethig, R., and Rousselet, J., 1997. The dielectrophoretic levitation of latex beads, with reference to field-flow fractionation. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 30 (17), 2470.
- Martinez-Duarte, R., 2012. Microfabrication technologies in dielectrophoresis applications—A

- 
- review. *Electrophoresis*, 33 (21), 3110–3132.
- Marty, M., Serša, G., Garbay, J., Gehl, J., Collins, C., Snoj, M., Billard, V., Geertsen, P., Larkin, J., and Miklavčič, D., 2006. Electrochemotherapy – An easy, highly effective and safe treatment of cutaneous and subcutaneous metastases: Results of ESOPE (European Standard Operating Procedures of Electrochemotherapy) study. *European Journal of Cancer Supplements*, 4 (11), 3–13.
- Masuda, S., Washizu, M., and Nanba, T., 1989. Novel method of cell fusion in field constriction area in fluid integration circuit. *IEEE Transactions on Industry Applications*, 25 (4), 732–737.
- Meighan, M.M., Staton, S.J.R., and Hayes, M.A., 2009. Bioanalytical separations using electric field gradient techniques. *Electrophoresis*, 30 (5), 852–865.
- Mernier, G., Majocchi, S., Mermod, N., and Renaud, P., 2012. In situ evaluation of single-cell lysis by cytosol extraction observation through fluorescence decay and dielectrophoretic trapping time. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 166-167, 907–912.
- Miklavčič, D., 2012. Network for Development of Electroporation-Based Technologies and Treatments: COST TD1104. *The Journal of Membrane Biology*, 245 (10), 591–598.
- Miklavčič, D. and Puc, M., 2006. Electroporation. In: M. Akay, ed. *Wiley encyclopedia of biomedical engineering*. Hoboken: Wiley-Interscience.
- Morgan, H. and Green, N.G., 2003. *AC electrokinetics: colloids and nanoparticles*. Baldock, Hertfordshire: Research Studies.
- Mottet, G., Le Pioufle, B., and Mir, L.M., 2012. High-resolution analyses of cell fusion dynamics in a biochip. *Electrophoresis*, 33 (16), 2508–2515.
- Müller, T., Gradl, G., Howitz, S., Shirley, S., Schnelle, T., and Fuhr, G., 1999. A 3-D microelectrode system for handling and caging single cells and particles. *Biosensors and Bioelectronics*, 14 (3), 247–256.
- Murakami, Y., Motohashi, K., Yano, K., Ikebukuro, K., Yokoyama, K., Tamiya, E., and Karube, I., 1994. Micromachined electroporation system for transgenic fish. *Journal of Biotechnology*, 34 (1), 35–42.
- Neumann, E., Schaeffer, M., Wang, Y., and Hofschneider, P., 1982. Gene-Transfer into Mouse Lyoma Cells by Electroporation in High Electric-Fields. *Embo Journal*, 1 (7), 841–845.
- Niu, X.Z., Peng, S.L., Liu, L.Y., Wen, W.J., and Sheng, P., 2007. Characterizing and Patterning of PDMS-Based Conducting Composites. *Advanced Materials*, 19 (18), 2682–2686.
- Oblak, J., Križaj, D., Amon, S., Maček-Lebar, A., and Miklavčič, D., 2007. Feasibility study for cell electroporation detection and separation by means of dielectrophoresis. *Bioelectrochemistry*, 71 (2), 164–171.
- Pakhomov, A.G., Kolb, J.F., White, J.A., Joshi, R.P., Xiao, S., and Schoenbach, K.H., 2007. Long-lasting plasma membrane permeabilization in mammalian cells by nanosecond pulsed electric

---

field (nsPEF). *Bioelectromagnetics*, 28 (8), 655–663.

- Pakhomova, O.N., Khorokhorina, V.A., Bowman, A.M., Rodaitė-Riševičienė, R., Saulis, G., Xiao, S., and Pakhomov, A.G., 2012. Oxidative effects of nanosecond pulsed electric field exposure in cells and cell-free media. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 527 (1), 55–64.
- Pamme, N., 2007. Continuous flow separations in microfluidic devices. *Lab on a Chip*, 7 (12), 1644–1659.
- Pappas, D. and Wang, K., 2007. Cellular separations: A review of new challenges in analytical chemistry. *Analytica Chimica Acta*, 601 (1), 26–35.
- Patel, P.M., Bhat, A., and Markx, G.H., 2008. A comparative study of cell death using electrical capacitance measurements and dielectrophoresis. *Enzyme and Microbial Technology*, 43 (7), 523–530.
- Pavšelj, N. and Preat, V., 2005. DNA electrotransfer into the skin using a combination of one high- and one low-voltage pulse. *Journal of Controlled Release*, 106 (3), 407–415.
- Peng, H.Q., Alvarez, N.T., Kittrell, C., Hauge, R.H., and Schmidt, H.K., 2006. Dielectrophoresis field flow fractionation of single-walled carbon nanotubes. *Journal of the American Chemical Society*, 128 (26), 8396–8397.
- Petersson, F., Åberg, L., Swärd-Nilsson, A.-M., and Laurell, T., 2007. Free Flow Acoustophoresis: Microfluidic-Based Mode of Particle and Cell Separation. *Analytical Chemistry*, 79 (14), 5117–5123.
- Phoon, P.Y., Galindo, F.G., Vicente, A., and Dejmek, P., 2008. Pulsed electric field in combination with vacuum impregnation with trehalose improves the freezing tolerance of spinach leaves. *Journal of Food Engineering*, 88 (1), 144–148.
- Pohl, H.A. and Crane, J.S., 1971. Dielectrophoresis of cells. *Biophysical Journal*, 11 (9), 711–727.
- Puc, M., Kotnik, T., Mir, L.M., and Miklavčič, D., 2003. Quantitative model of small molecules uptake after in vitro cell electropermeabilization. *Bioelectrochemistry*, 60 (1-2), 1–10.
- Pucihar, G., Kotnik, T., Kandušer, M., and Miklavčič, D., 2001. The influence of medium conductivity on electropermeabilization and survival of cells in vitro. *Bioelectrochemistry*, 54 (2), 107–115.
- Pucihar, G., Kotnik, T., Miklavčič, D., and Teissié, J., 2008. Kinetics of transmembrane transport of small molecules into electropermeabilized cells. *Biophysical Journal*, 95 (6), 2837–2848.
- Pucihar, G., Mir, L.M., and Miklavčič, D., 2002. The effect of pulse repetition frequency on the uptake into electropermeabilization cells in vitro with possible applications in electrochemotherapy. *Bioelectrochemistry*, 57, 167–172.
- Ramadan, Q., Samper, V., Poenar, D., Liang, Z., Yu, C., and Lim, T.M., 2006. Simultaneous cell lysis and bead trapping in a continuous flow microfluidic device. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 113 (2), 944–955.

- 
- Rieder, A., Schwartz, T., Schön-Hölz, K., Marten, S.-M., Süss, J., Gusbeth, C., Kohnen, W., Swoboda, W., Obst, U., and Frey, W., 2008. Molecular monitoring of inactivation efficiencies of bacteria during pulsed electric field treatment of clinical wastewater. *Journal of applied microbiology*, 105 (6), 2035–2045.
- Roda, B., Zattoni, A., Reschiglian, P., Moon, M.H., Mirasoli, M., Michelini, E., and Roda, A., 2009. Field-flow fractionation in bioanalysis: A review of recent trends. *Analytica Chimica Acta*, 635 (2), 132–143.
- De la Rosa, C., Tilley, P.A., Fox, J.D., and Kaler, K.V.I., 2008. Microfluidic Device for Dielectrophoresis Manipulation and Electrodisruption of Respiratory Pathogen *Bordetella pertussis*. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 55 (10), 2426–2432.
- Rosales, C. and Lim, K.M., 2005. Numerical comparison between Maxwell stress method and equivalent multipole approach for calculation of the dielectrophoretic force in single-cell traps. *Electrophoresis*, 26 (11), 2057–2065.
- Sabounchi, P., Morales, A.M., Ponce, P., Lee, L.P., Simmons, B.A., and Davalos, R.V., 2008. Sample concentration and impedance detection on a microfluidic polymer chip. *Biomedical Microdevices*, 10 (5), 661–670.
- Sack, M., Sigler, J., Frenzel, S., Eing, C., Arnold, J., Michelberger, T., Frey, W., Attmann, F., Stukenbrock, L., and Müller, G., 2010. Research on Industrial-Scale Electroporation Devices Fostering the Extraction of Substances from Biological Tissue. *Food Engineering Reviews*, 2 (2), 147–156.
- Salmanzadeh, A., Romero, L., Shafiee, H., Gallo-Villanueva, R.C., Stremmler, M.A., Cramer, S.D., and Davalos, R.V., 2012. Isolation of prostate tumor initiating cells (TICs) through their dielectrophoretic signature. *Lab on a Chip*, 12 (1), 182.
- Schneider, T., Karl, S., Moore, L.R., Chalmers, J.J., Williams, P.S., and Zborowski, M., 2010. Sequential CD34 cell fractionation by magnetophoresis in a magnetic dipole flow sorter. *Analyst*, 135 (1), 62.
- Serša, G., Miklavčič, D., Čemažar, M., Rudolf, Z., Pucihar, G., and Snoj, M., 2008. Electrochemotherapy in treatment of tumours. *European Journal of Surgical Oncology*, 34 (2), 232–240.
- Shafiee, H., Caldwell, J., Sano, M., and Davalos, R., 2009. Contactless dielectrophoresis: a new technique for cell manipulation. *Biomedical Microdevices*, 11 (5), 997–1006.
- Shafiee, H., Sano, M.B., Henslee, E.A., Caldwell, J.L., and Davalos, R.V., 2010. Selective isolation of live/dead cells using contactless dielectrophoresis (cDEP). *Lab on a Chip*, 10 (4), 438.
- Shew, B.Y., Chu, H.C., Chen, C.K., Su, Y.C., Hsieh, Y.H., Lai, L.J., Liu, S.J., and Leng, C.H., 2010. Enhancement of specific cell-capture efficiency using a reversible dielectrophoresis field. *Sensors and Actuators A: Physical*, 163 (1), 128–137.
- Siegel, A., Weibel, D., Lee, A., George, A., and Whitesides, G., 2007. Pumping fluids in microfluidic systems using the elastic deformation of poly(dimethylsiloxane). *Lab on a Chip*, 7 (12), 1832–1836.

- 
- Skelley, A.M., Kirak, O., Suh, H., Jaenisch, R., and Voldman, J., 2009. Microfluidic control of cell pairing and fusion. *Nature Methods*, 6 (2), 147–152.
- Srivastava, S.K., Gencoglu, A., and Minerick, A.R., 2010. DC insulator dielectrophoretic applications in microdevice technology: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399 (1), 301–321.
- Suehiro, J., Shutou, M., Hatano, T., and Hara, M., 2003. High sensitive detection of biological cells using dielectrophoretic impedance measurement method combined with electropermeabilization. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 96 (1-2), 144–151.
- Suehiro, J., Zhou, G.B., Imamura, M., and Hara, M., 2003. Dielectrophoretic filter for separation and recovery of biological cells in water. *Ieee Transactions on Industry Applications*, 39 (5), 1514–1521.
- Sukhorukov, V., Reuss, R., Endter, J., Fehrmann, S., Katsengloba, A., Gesner, P., Steinbach, A., Muller, K., Karpas, A., and Zimmermann, U., 2006. A biophysical approach to the optimisation of dendritic-tumour cell electrofusion. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 346 (3), 829–839.
- Tai, C.H., Hsiung, S.K., Chen, C.Y., Tsai, M.L., and Lee, G.B., 2007. Automatic microfluidic platform for cell separation and nucleus collection. *Biomedical Microdevices*, 9 (4), 533–543.
- Teissie, J. and Rols, M.P., 1993. An experimental evaluation of the critical potential difference including cell membrane electropermeabilization. *Biophysical Journal*, 65, 409–413.
- Teissie, J. and Rols, M.P., 1998. Correlation between electric field pulse induced long - lived permeabilization and fusogenicity in cell membranes. *Biophysical Journal*, 74, 1889–1898.
- Teissie, J. and Tsong, T.Y., 1981. Electric field induced transient pores in phospholipid bilayer vesicles. *Biochemistry*, 20, 1548–1554.
- Thomas, R.S.W., Mitchell, P.D., Oreffo, R.O.C., and Morgan, H., 2010. Trapping single human osteoblast-like cells from a heterogeneous population using a dielectrophoretic microfluidic device. *Biomicrofluidics*, 4 (2), 022806.
- Trontelj, K., Reberšek, M., Kandušer, M., Šerbec, V.Č., Šprohar, M., and Miklavčič, D., 2008. Optimization of bulk cell electrofusion in vitro for production of human–mouse heterohybridoma cells. *Bioelectrochemistry*, 74 (1), 124–129.
- Tsukahara, S., Yamanaka, K., and Watarai, H., 2001. Flow Fractionation of Microparticles under a Dielectrophoretic Field in a Quadrupole Electrode Capillary. *Analytical Chemistry*, 73 (23), 5661–5668.
- Tsutsui, H. and Ho, C.-M., 2009. Cell separation by non-inertial force fields in microfluidic systems. *Mechanics Research Communications*, 36 (1), 92–103.
- Ušaj, M., Trontelj, K., Hudej, R., Kandušer, M., and Miklavčič, D., 2009. Cell size dynamics and viability of cells exposed to hypotonic treatment and electroporation for electrofusion optimization. *Radiology and Oncology*, 43 (2), 108–119.



- 
- Velev, O.D. and Bhatt, K.H., 2006. On-chip micromanipulation and assembly of colloidal particles by electric fields. *Soft Matter*, 2 (9), 738–750.
- Voldman, J., 2006. Electrical forces for microscale cell manipulation. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 8, 425–454.
- Voldman, J., Toner, M., Gray, M.L., and Schmidt, M.A., 2003. Design and analysis of extruded quadrupolar dielectrophoretic traps. *Journal of Electrostatics*, 57 (1), 69–90.
- Wang, L.S., Flanagan, L., and Lee, A.P., 2007. Side-wall vertical electrodes for lateral field microfluidic applications. *Journal of Microelectromechanical Systems*, 16 (2), 454–461.
- Wang, X.-B., Yang, J., Huang, Y., Vykoukal, J., Becker, F.F., and Gascoyne, P.R.C., 2000. Cell separation by dielectrophoretic field-flow-fractionation. *Analytical Chemistry*, 72 (4), 832–839.
- Weaver, J. and Chizmadzhev, Y., 1996. Theory of electroporation: A review. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 41 (2), 135–160.
- Weaver, J.C. and Mintzer, R.A., 1981. Decreased bilayer stability due to transmembrane potentials. *Physics Letters A*, 86 (1), 57–59.
- Wiklund, M., Gunther, C., Lemor, R., Jager, M., Fuhr, G., and Hertz, H.M., 2006. Ultrasonic standing wave manipulation technology integrated into a dielectrophoretic chip. *Lab on a Chip*, 6 (12), 1537–1544.
- Wolf, H., Rols, M.P., Boldt, E., Neumann, E., and Teissie, J., 1994. Control by pulse parameters of electric field - mediated gene transfer in mammalian cells. *Biophysical Journal*, 66, 524–531.
- Wong, P.K., Wang, T.H., Deval, J.H., and Ho, C.M., 2004. Electrokinetics in micro devices for biotechnology applications. *Ieee-Asme Transactions on Mechatronics*, 9 (2), 366–376.
- Xia, N., Hunt, T., Mayers, B., Alsberg, E., Whitesides, G., Westervelt, R., and Ingber, D., 2006. Combined microfluidic-micromagnetic separation of living cells in continuous flow. *Biomedical Microdevices*, 8 (4), 299–308.
- Yang, F., Yang, X.M., Jiang, H., Bulkhauls, P., Wood, P., Hrushesky, W., and Wang, G.R., 2010. Dielectrophoretic separation of colorectal cancer cells. *Biomicrofluidics*, 4 (1), 013204–013204–13.
- Yang, J., Huang, Y., Wang, X.B., Becker, F.F., and Gascoyne, P.R.C., 1999. Cell separation on microfabricated electrodes using dielectrophoretic/gravitational field flow fractionation. *Analytical Chemistry*, 71 (5), 911–918.
- Yang, J., Huang, Y., Wang, X.B., Becker, F.F., and Gascoyne, P.R.C., 2000. Differential analysis of human leukocytes by dielectrophoretic field-flow-fractionation. *Biophysical Journal*, 78 (5), 2680–2689.
- Yang, J., Zhao, L.-P., Yin, Z.-Q., Hu, N., Chen, J., Li, T.-Y., Svir, I., and Zheng, X.-L., 2010. Chip-Based Cell Electrofusion. *Advanced Engineering Materials*, 12 (9), B398–B405.
- Yu, L.M., Iliescu, C., Xu, G.L., and Tay, F.E.H., 2007. Sequential field-flow cell separation method in a

---

dielectrophoretic chip with 3-D electrodes. *Journal of Microelectromechanical Systems*, 16 (5), 1120–1129.

Zborowski, M. and Chalmers, J.J., 2008. *Magnetic cell separation*. 1st ed. Elsevier.

Zhou, H., White, L.R., and Tilton, R.D., 2005. Lateral separation of colloids or cells by dielectrophoresis augmented by AC electroosmosis. *Journal of Colloid and Interface Science*, 285 (1), 179–191.

Zimmermann, U., Friedrich, U., Mussauer, H., Gessner, P., Hamel, K., and Sukhoruhov, V., 2000. Electromanipulation of mammalian cells: Fundamentals and application. Ieee-Inst Electrical Electronics Engineers Inc, 72–82.

## Spletni viri

Biogasmax, 2010. The Synthesis Report Biogasmax. Dostopno na: [http://www.biogasmax.eu/media/synthesis\\_report\\_biogasmax\\_web\\_036599500\\_1239\\_23122010.pdf](http://www.biogasmax.eu/media/synthesis_report_biogasmax_web_036599500_1239_23122010.pdf) [28 nov 2012].

Chollet, F. and Liu, H., 2009. *A (not so) short introduction to Micro Electro Mechanical Systems*. 3.0 ed. Singapur. Dostopno na: <http://memscyclopedia.org/introMEMS.html> [30 apr. 2010]

Semrock, 2012. Semrock - Flow Cytometry. Dostopno na: <http://www.semrock.com/flow-cytometry.aspx> [18 dec 2012].

## IZJAVA

Izjavljam, da sem doktorsko disertacijo izdelal samostojno, pod mentorstvom izr. prof. dr. Tadeja Kotnika. Pomoč ostalih sodelavcev sem navedel v zahvali.

Jaka Čemažar