

Титульник.

Аннотация.

Целью данной работы является освоение пакета программ COMSOL Multiphysics™ в целях математического моделирования процессов массопереноса в микрофлюидных системах. Для этого были смоделированы:

- специфическое связывание аналита с:
 - модифицированной поверхностью в канале, через который протекает раствор,
 - модифицированной поверхностью микросфер, находящихся в растворе;

С помощью данных моделей удалось:

- найти значение безразмерного коэффициента, позволяющее понизить размерность (с 2 до 1) задачи об адсорбции на поверхность канала,
- показать, что одномерный вариант задачи об адсорбции на поверхности канала пригоден для моделирования отмывки от неспецифически связавшегося с поверхностью вещества.

Оглавление

1. Обозначения и сокращения	4
2. Введение	4
3. Обзор литературы	4
3.1. Микрофабрикация	4
3.2. Микрофлюидика	5
3.3. Математическое описание релевантных физическо-химических процессов	6
3.4. Моделирование в микрофлюидике	10
4. Основное содержание	13
4.1. Адсорбция на поверхность бесконечно широкого канала с одним видом сайтов связывания	13
4.2. Адсорбция на поверхность бесконечно широкого канала с двумя видами сайтов связывания	17
4.3. Адсорбция на поверхность канала конечной ширины с двумя видами сайтов связывания	20
4.4. Адсорбция на микросферах	20
5. Материалы и методы	20
6. Результаты и обсуждение	20
7. Заключение	20
8. Выводы	20

1. Обозначения и сокращения

УрЧП: уравнение в частных производных, уравнение математической физики.

(Не)специфическая адсорбция: (не)специфическое связывание молекулы из раствора с молекулой на поверхности или с самой поверхностью, НЕ имеется в виду разницы между адсорбцией, обусловленной электростатическим притяжением иона к поверхности и обусловленной силами Ван-дер-Ваальса.

Уравнение: под уравнением зачастую имеется в виду система уравнений.

2. Введение

Микрофлюидика — научно-инженерная область, посвящённая поведению малых объёмов жидкости при малых потоках. Микрофлюидика применяется в биологии, медицине и нанотехнологиях.

В связи с малыми размерами микрофлюидных систем, их поведение не интуитивно, а наблюдения за состоянием и поведением таких систем затруднены. Из-за этого в микрофлюидной практике для создания систем с предсказуемыми свойствами (и для других целей) применяется математическое моделирование. Для этих целей широко применяется пакет программ COMSOL Multiphysics™ (далее COMSOL).

Целью работы является освоение COMSOL. Задачи работы:

- создание моделей специфического связывания аналита с:
 - модифицированной поверхностью канала, через который протекает раствор аналита: в двумерной и одномерной постановках, при наличии и отсутствии неспецифически связывающихся молекул в растворе, при наличии и отсутствии сайтов неспецифического связывания на поверхности;
 - модифицированной поверхностью микросфер, находящихся в растворе аналита: находящихся в потоке и при отсутствии течения.

3. Обзор литературы

3.1. Микрофабрикация

Микрофабрикация — научная и инженерная область, посвящённая созданию миниатюрных изделий со сложной геометрией. Изначально микрофабрикация была связана с созданием полупроводниковых микросхем малых размеров, высоких производительности и надёжности.

Методы микрофабрикации оказались применимы для создания микрофлюидных систем, как правило, называемых микрофлюидными чипами (или просто чипами для краткости), полезных для био-медицинского направления и не только.

Основные средства микрофабрикации — различные виды литографии.

3.2. Микрофлюидика

Микрофлюидика — наука о поведении малых объёмов жидкостей (от микро- до фемтолитров) при малых потоках. Малость объёмов и потоков можно определять значимостью эффектов масштаба: ламинарные потоки, определяющая роль капиллярных явлений.

Микрофлюидика применяется[4]:

- для создания диагностических систем (**lab-on-a-chip**) (рис. 1),
- для создания и исследования культур клеток (**organ-on-a-chip**),
- для адресной доставки лекарственных веществ (drug delivery),
- для синтеза наноматериалов.

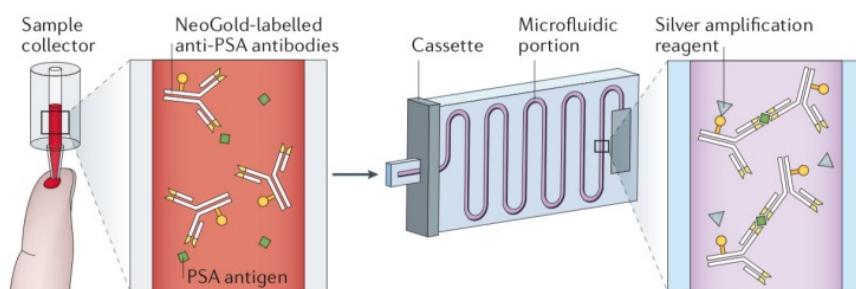


Рисунок 1 – Пример микрофлюидной диагностической системы из [2], пригодной для обнаружения простатического специфического антигена (ПСА) менее, чем за 15 минут

Для данной работы интерес представляют, в первую очередь, диагностические системы. Диагностическими здесь и далее называются системы, позволяющие обнаружить (по возможности, определить/оценить количественно) содержание конкретного вещества в некотором растворе (зачастую — в биологической жидкости, например, в крови, моче, слюне, лимфе и т. д.) К возможным преимуществам использования микрофлюидных диагностических систем относятся:

- работа с малыми объёмами исследуемой жидкости,
- использование малых количеств веществ-детекторов,
- минимизация потерь жидкости на стенках реактора в виду отсутствия необходимости переноса веществ между сосудами,
- увеличенная скорость диффузионного массопереноса,
- портативность,
- простота в использовании.

Последние два пункта являются ключевыми для создания диагностических устройств, которые можно использовать вдали от оснащённых лабораторий и квалифицированных специалистов (**PoC** (point-of-care) devices).

Далее будем подразумевать, что ключом к детекции так или иначе является специфическая адсорбция аналита, что исключает из числа рассматриваемых диагностических методик, например, ПЦР.

3.3. Математическое описание релевантных физическо-химических процессов

Основная система уравнений

Течение жидкости в микрофлюидных системах характеризуется малыми числами Рейнольдса, т. е. поток в микроканалах можно считать ламинарным. Жидкость можно считать несжимаемой, что приводит к системе уравнений

$$\begin{cases} \rho \frac{\partial \mathbf{v}}{\partial t} = -\nabla P + \eta \Delta \mathbf{v} + \mathbf{f} & \text{(уравнение Стокса)} \\ \nabla \cdot \mathbf{v} = 0 & \text{(несжимаемость)} \\ \frac{\partial c_i}{\partial t} = -\nabla \cdot \mathbf{j}_i + R_i & \text{(массоперенос + химия)} \\ \mathbf{j}_i = -D_i \nabla c_i + c_i \mathbf{v} & \text{(конвекция-диффузия)} \end{cases} \quad (1)$$

где ρ — плотность раствора [г/мл], \mathbf{v} — скорость ламинарного течения [мм/с], P — гидростатическое давление [Па], η — динамическая вязкость раствора [Па · с], \mathbf{f} — внешняя сила, действующая на элемент объёма раствора [дина/мл] (например, сила тягетси), c_i — концентрация i -ого вещества в растворе [мМ], \mathbf{j}_i — поток i -ого вещества в растворе [мМ/(мм² · с)], R_i — изменение концентрации i -ого вещества в растворе, связанное с химическими реакциями [мМ/с].

По всей видимости, (существенных для микрофлюидики) границ применимости у системы (1) две:

1. концентрации растворённых веществ должны быть достаточно большими, чтобы было допустимым не переходить к статистическому описанию движения их молекул, а остаться в рамках непрерывного приближения,
2. характерный размер λ (ширина) микрофлюидного канала должен значительно превосходить длины свободного пробега молекул, чтобы течение жидкости было вязкостным, а не переходным или молекулярным (Кнудсеновским); на практике, для водоподобный сред, это ограничение $\lambda \gtrsim 300\text{нм}$.

Граничные условия

Далее приняты следующие обозначения: Ω — расчётная область, $\mathcal{W} \subset \partial\Omega$ — стенка (на ней обнуляется скорость течения), $\mathcal{S}_i \subset \mathcal{W}$ — часть стенки, содержащая сайты связывания i -ого вещества, $\mathcal{I} \subset \partial\Omega$ — входное отверстие (inlet), $\mathcal{O} \subset \partial\Omega$ — выходное отверстие (outlet).

Граничные условия для системы (1) на стенке \mathcal{W} :

$$\begin{cases} \mathbf{v}|_{\mathcal{W}} = \mathbf{0} \\ \mathbf{n} \cdot \mathbf{j}_i|_{\mathcal{W}} = r_i \chi_{\mathcal{S}_i} \end{cases} \quad (2)$$

где r_i — скорость адсорбции i -ого вещества, $\chi_{\mathcal{S}_i}$ — характеристическая функция части стенок, на которой адсорбция вообще происходит, \mathbf{n} — поле единичных внешних нормалей к $\partial\Omega$. Такое описание несколько избыточно: действительно, можно сделать замену $r_i = r_i \chi_{\mathcal{S}_i}$.

Граничные условия на входном/выходном отверстиях \mathcal{I}/\mathcal{O} :

$$\begin{cases} \mathbf{v}|_{\mathcal{I}/\mathcal{O}}(t, x, y, z) \\ P|_{\mathcal{I}/\mathcal{O}}(t, x, y, z) \\ c_i|_{\mathcal{I}}(t, x, y, z) \\ \mathbf{n} \cdot \nabla c_i|_{\mathcal{O}} = 0 \end{cases} \quad (3)$$

здесь отсутствие правой части равенства подразумевает, что зафиксирована (известна) «стоящая в левой части равенства» функция.

Изотермы адсорбции

Под изотермой адсорбции будем понимать всякое уравнение $F(c_{i=\overline{1,n}}, \gamma_{i=\overline{1,n}}) = 0$, где c_i — равновесная концентрация i -ого вещества в растворе, γ_i — равновесная (поверхностная) концентрация i -ого вещества на поверхности, или параметрические семейства таких уравнений, параметрами в которых будут такие величины как поверхностная концентрация сайтов связывания и равновесные химические константы (например, константа диссоциации). Дополнительно потребуем, чтобы такие уравнения задавали функции $\gamma_i(c_{i=\overline{1,n}}, \gamma_{j \neq i})$.

Изотермы адсорбции здесь представляют интерес с точки зрения получения выражений для скоростей реакций r_i в граничных условиях (2). Они также могут использоваться для приближений.

Простейшей (не считая изотерму адсорбции Генри) изотермой адсорбции является изотерма **Ленгмюра** для одного вещества с единственным видом сайтов связывания с поверхностной концентрацией Γ

$$\gamma = \frac{\Gamma c}{K_d + c}, \quad (4)$$

где K_d — константа диссоциации вещества и сайтов связывания на поверхности. Изотерме Ленгмюра соответствует кинетика, описываемая законом действующих масс

$$r = k_f c (\Gamma - \gamma) - k_r \gamma, \quad K_d = \frac{k_r}{k_f}. \quad (5)$$

Усложнением будет многокомпонентная изотерма Ленгмюра с единственным видом сайтов связывания

$$\gamma_i = \frac{\Gamma K_{a,i} c_i}{1 + \sum_{j=1}^n K_{a,j} c_j}, \quad (6)$$

где $K_{a,i} = 1/K_{d,i}$ — константа аффинности i -ого вещества и сайтов связывания. Этой изотерме соответствует кинетика, схожая с (5)

$$r_i = k_{f,i} c_i \left(\Gamma - \sum_{j=1}^n \gamma_j \right) - k_{r,i} \gamma_i = k_{f,i} c_i \Gamma_{\text{free}} - k_{r,i} \gamma_i. \quad (7)$$

При наличии m видов сайтов связывания изотерма Ленгмюра усложнится до

$$\gamma_i = \sum_{k=1}^m \frac{\Gamma^k K_{a,i}^k c_i}{1 + \sum_{j=1}^n K_{a,j}^k c_j}, \quad (8)$$

а кинетика — до

$$r_i = \sum_{k=1}^m \left[k_{f,i}^k c_i \left(\Gamma^k - \sum_{j=1}^n \gamma_j^k \right) - k_{r,i}^k \gamma_i^k \right] = \sum_{k=1}^m [k_{f,i}^k c_i \Gamma_{\text{free}}^k - k_{r,i}^k \gamma_i^k]. \quad (9)$$

Другой пример изотермы адсорбции — **БЭТ**-изотерма (Брунауэр-Эммет-Теллер). Эта изотерма, в отличие от Ленгмюровской, описывает полислойную адсорбцию. При наличии единственного вида сайтов связывания и единственного аналита скорость образования i -ого адсорбционного слоя считается равной

$$r_i = k_{f,i} c \gamma_{i-1} - k_{r,i} \gamma_i, \quad (10)$$

где $\gamma_{i \neq 0}$ — поверхностная концентрация аналита в i -ом адсорбционном слое, а γ_0 — концентрация свободных сайтов связывания. Скорость адсорбции в таком случае равна $r = \sum_{i=1}^{\infty} r_i$.

Если предположить, что $\forall i \in \mathbb{N} \quad i > 1 \Rightarrow k_{f,i}/k_{r,i} = K_a = \text{const}$, то в равновесии получится уравнение изотермы БЭТ

$$\gamma = \sum_{i=1}^{\infty} \gamma_i = \Gamma \frac{c k_{f,1}/k_{r,1}}{(1 - c K_a) [1 - c (K_a - k_{f,1}/k_{r,1})]}. \quad (11)$$

Изотерма **Фрейндлиха** описывает ситуацию, когда энергия адсорбции распределена по сайтам связывания неравномерно. Изотерма Фрейндлиха — эмпирическое соотношение, что затрудняет его физическую интерпретацию.

Сама изотерма:

$$\gamma = K^* c^{1/n}, \quad (12)$$

где K^* — константа, $n > 1$ — число. Учёт насыщения адсорбирующей поверхности приводит к уравнению изотермы Фрейндлиха-Ленгмюра

$$\gamma = \Gamma \frac{c^{1/n}}{K + c^{1/n}}, \quad (13)$$

где K — константа.

По всей видимости [5], если потребуется, имеет смысл считать, что кинетика, соответствующая изотерме (13) имеет вид

$$r = k_f c^{1/n} (\Gamma - \gamma) - k_r \gamma. \quad (14)$$

Приближения

Решение системы (1) в сложной геометрической области не всегда целесообразно, в связи с чем для упрощения задачи моделирования может быть использован ряд приближений. В частности, решение обратных задач для ОДУ (обыкновенных дифференциальных уравнений) значительно проще, чем для УрЧП (уравнений в частных производных), так что, например, для определения кинетических параметров исследуемой системы по данным, полученным с помощью биосенсора, предпочтительнее может оказаться использование приближения, описывающего исследуемую систему как ОДУ, а не как УрЧП (как это сделано, например в [1]).

Простейшее приближение состоит в пренебрежении диффузионными и конвекционными процессами. Реактор идеально перемешан и описывается системой ОДУ

$$\begin{cases} \dot{\gamma}_{i,j} = r_{i,j} \\ \dot{c}_i = \frac{S}{V} \sum_{j=1}^m -r_{i,j} \end{cases} \quad (15)$$

где m $\gamma_{i,j}$ — поверхностная концентрация i -ого вещества, адсорбировавшегося на j -ом виде сайтов связывания, c_i — объёмная концентрация i -ого вещества, $r_{i,j}$ — скорость адсорбции i -ого вещества на j -ом виде сайтов связывания, S и V — площадь поверхности и объём реактора соответственно. Всего в реакторе n веществ, а на его поверхности m видов сайтов связывания.

Более сложным приближением является **модель двух компартментов** (two-compartment model (**ТСМ**))[3]. Пространство реактора разделяется на две области (два компартмента): внешний — с постоянной концентрацией аналита c_0 , и внутренний — с концентрацией аналита c . Скорость обмена аналитом между компартментами полагается равной

$$v_{\text{ex}} = k_m (c_0 - c) \quad (16)$$

где $k_m = 1.282 \sqrt[3]{D^2 v_{\text{н}} / (L_s h_c)}$ [м/с], $v_{\text{н}}$ — скорость течения раствора, L_s — характерный размер адсорбирующей поверхности, h_c — высота внутреннего компартмента. Скорость адсорбции полагается равной

$$\dot{\gamma} = k_f c (\Gamma - \gamma) - k_r \gamma, \quad (17)$$

а скорость изменения концентрации аналита во внутреннем компартменте —

$$\dot{c} = \frac{v_{\text{ex}} - \dot{\gamma}}{h_c} = k_m^* (c_0 - c) - k_f c (\Gamma^* - \gamma^*) + k_r \gamma^*, \quad (18)$$

где $k_m^* = k_m / h_c$, $\Gamma^* = \Gamma / h_c$, $\gamma^* = \gamma / h_c$.

Вязкостный и диффузионный слои

В силу граничных условий, скорость течения жидкости около стенки равна нулю. В связи с этим вводят понятие вязкостного слоя, одна из границ которого совпадает с границей расчётной области, прилегающей к стенке, а около другой границы скорость течения практически не меняется в пространстве и совпадает со скоростью течения вне вязкостного слоя.

Аналогично при наличии поглощения вещества на поверхности вводится понятие диффузионного слоя, не имеющее прямого отношения к аналогичному понятию из электрохимии. Аналогом величины скорости выступает концентрация реагента в объёме жидкости.

Вышесказанное проиллюстрировано на рисунке (2), взятом из [6]. Там же есть обоснование формул для оценки толщин этих слоёв:

$$\delta_U \sim \sqrt{\frac{U \nu}{L}}, \quad (19)$$

$$\delta_D \sim \sqrt[3]{\frac{D}{\nu}} \delta_U. \quad (20)$$

Здесь U — скорость течения вне вязкостного слоя, L — характерный размер задачи (характерная длина вдоль потока), ν — кинематическая вязкость текущей жидкости, D — коэффициент диффузии растворённого реагирующего с поверхностью вещества.

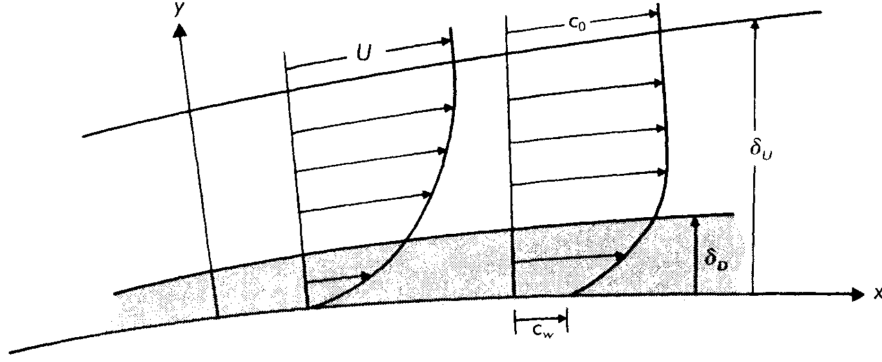


Рисунок 2 – Вязкостный и диффузионный слой; δ_U и δ_D — их толщины соответственно

3.4. Моделирование в микрофлюидике

Математическое моделирование микрофлюидных систем может быть использовано для:

- предсказания свойств чипа до его производства, что удешевляет разработку конечного функционального изделия,
- интерпретации данных, получаемых с помощью чипа,
- определения свойств исследуемой системы (путём решения обратных задач).

Решение системы (1)

Как правило, говорить об аналитическом решении системы (1) не приходится и система решается численно, методами конечных элементов.

Методы конечных элементов — семейство методов численного решения уравнений математической физики, состоящие в разбиении расчётной области на конечное число подобластей — конечных элементов, на которых выбираются базисные функции, равные нулю всюду кроме своих элементов (или конечного их числа, смотря что иметь в виду под элементом), а решение ищется в виде линейной комбинации этих функций. Это проиллюстрировано на рисунке 3.

На примере уравнения Пуассона

$$\Delta u = f(\mathbf{x}) \quad (21)$$

выберем гильбертово пространство H и будем искать $u : \Omega \rightarrow \mathbb{R} \in H : \forall \psi \in H$

$$\int_{\Omega} \psi \Delta u d\mathbf{x} = \int_{\partial\Omega} \psi \nabla u \cdot \mathbf{dS} - \int_{\Omega} \nabla \psi \cdot \nabla u d\mathbf{x} = \int_{\Omega} \psi f d\mathbf{x}. \quad (22)$$

Здесь (22) — слабая (вариационная) формулировка, ψ — пробная функция.

При применении методов конечных элементов в качестве H выбирается линейная оболочка набора финитных базисных функций ψ_i , о которых речь шла выше. Решение ищется в виде их линейной комбинации $u = \sum_i u_i \psi_i$. Уравнение (22) заменяется на систему (по индексу j)

$$\sum_i u_i \left(\int_{\partial\Omega} \psi_j \nabla \psi_i \cdot \mathbf{dS} - \int_{\Omega} \nabla \psi_j \cdot \nabla \psi_i d\mathbf{x} \right) = \int_{\Omega} \psi_j f d\mathbf{x}, \quad (23)$$

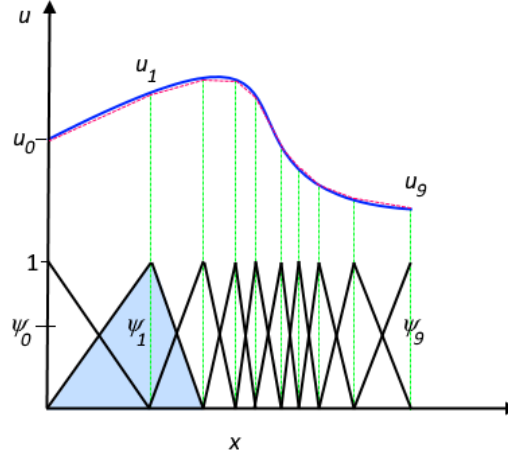


Рисунок 3 – Аппроксимация функции $u(x)$ линейной комбинацией финитных базисных функций $\psi_{i=\overline{0,9}}(x)$ (www.comsol.com/multiphysics/finite-element-method)

что можно записать в виде

$$\hat{A}\mathbf{u} = \mathbf{f}, \quad (24)$$

где \mathbf{u} — столбец с элементами u_i , \mathbf{f} — столбец с элементами $f_i = \int_{\Omega} \psi_i f d\mathbf{x}$, \hat{A} — матрица с элементами $A_{ij} = \int_{\partial\Omega} \psi_i \nabla \psi_j \cdot d\mathbf{S} - \int_{\Omega} \nabla \psi_i \cdot \nabla \psi_j d\mathbf{x}$. Таким образом, численное решение уравнения Пуассона методами конечных элементов запишется как

$$u(\mathbf{x}) = \sum_i \left[\hat{A}^{-1} \mathbf{f} \right]_i \psi_i(\mathbf{x}). \quad (25)$$

В случае с уравнением теплопроводности

$$\frac{\partial u}{\partial t} - \Delta u = f(\mathbf{x}, t, u(\mathbf{x}, t)) \quad (26)$$

имеет смысл (для уменьшения вычислительных затрат) искать приближённое решение в виде $u = \sum_i u_i(t) \psi_i(\mathbf{x})$ (вместо $\sum_i u_i \psi_i(\mathbf{x}, t)$). В таком случае уравнение (26) будет приближаться (аналогично (23))

$$\sum_i \frac{\partial u_i}{\partial t} \int_{\Omega} \psi_i \psi_j d\mathbf{x} + \sum_i u_i \left(- \int_{\partial\Omega} \psi_j \nabla \psi_i \cdot d\mathbf{S} + \int_{\Omega} \nabla \psi_j \cdot \nabla \psi_i d\mathbf{x} \right) = \int_{\Omega} \psi_j f_t d\mathbf{x}, \quad (27)$$

где $f_t(\mathbf{x}) = f(\mathbf{x}, t, \sum_i u_i \psi_i(\mathbf{x}))$. Выражение $\partial u_i / \partial t$ заменится конечной разностью, например

$$\frac{\partial u_i}{\partial t} \approx \frac{u_i(t + \Delta t) - u_i(t)}{\Delta t}, \quad (28)$$

в таком случае подстановка $u_i = u_i(t)$ в (27) позволит явно выразить $u_i(t + \Delta t)$ через $u_i(t)$:

$$\mathbf{u}(t + \Delta t) = \mathbf{u}(t) + \Delta t \hat{\Psi}^{-1} \left(\hat{A} \mathbf{u}(t) + \mathbf{f}_t(\mathbf{u}(t)) \right), \quad (29)$$

где $\hat{\Psi}$ — матрица с элементами $\Psi_{ij} = \int_{\Omega} \psi_i \psi_j d\mathbf{x}$, $\mathbf{u}(t)$ — столбец с элементами $u_i(t)$, $\mathbf{f}_t(\mathbf{u}(t))$ — столбец с элементами $f_{t,i} = \int_{\Omega} \psi_i f_t d\mathbf{x}$, \hat{A} определена так же, как и для уравнения Пуассона выше.

Если пользоваться (28), и принять $u_i = u_i(t + \Delta t)$ в (27), то полученное уравнение будет задавать $u_i(t + \Delta t)$ как функцию $u_i(t)$ неявно. Неявная постановка вычислительно более затратна, но оказывается необходимой при решении так называемых *жестких* систем, которые часто встречаются при наличии химических реакций (когда уравнение теплопроводности является, по сути, уравнением диффузии).

Методы конечных элементов реализованы, например, в программном обеспечении COMSOL Multiphysics™ (далее — COMSOL), которое и используется в этой работе.

Решение обратных задач

Как было сказано выше, для определения характеристик исследуемых систем могут решаться обратные задачи. Если решение прямой задачи состоит в предсказании поведения системы, про которую всё известно, то решение обратной задачи состоит в оценке параметров системы по её поведению.

Обратные задачи математически формулируются как задачи оптимизации — минимизации некоторого функционала ошибки $Q : \mathbb{P} \rightarrow \mathbb{R}_+$, где \mathbb{P} — пространство параметров, $\mathbb{R}_+ = \{x \in \mathbb{R} | x \leq 0\}$. Если \mathbf{x}_t — состояние системы в момент времени t , а $\mathbf{f}(t, \mathbf{p})$ — предсказание состояния системы с параметрами $\mathbf{p} \in \mathbb{P}$ в момент времени t , то типичным функционалом ошибки

$$Q(\mathbf{p}) = \frac{\sum_{t \in T} (\mathbf{f}(t, \mathbf{p}) - \mathbf{x}_t)^2}{|T|}, \quad (30)$$

где T — конечное множество времён. Данный функционал гладкий, что позволяет для его оптимизации использовать градиентные методы; если аналитическое выражение для градиента не известно, он может быть в каждой точке оценён численно.

Например, при адсорбции из идеально перемешанного реактора согласно кинетике действующих масс, соответствующей изотерме Ленгмюра, поверхностная концентрация адсорбированного аналита в момент времени t будет равна

$$\gamma(t) = f[c](\Gamma_0, k_f, k_r, t), \quad (31)$$

где $c : T \rightarrow \mathbb{R}_+$ — концентрация аналита в растворе в зависимости от времени, Γ_0 — поверхностная концентрация сайтов связывания, k_f и k_r — кинетические константы, характеризующие адсорбцию и десорбцию, f — решение уравнения $\dot{\gamma} = k_f(\Gamma_0 - \gamma)c - k_r\gamma$, которое может быть получено численно. Пусть теперь в каждый момент времени известна концентрация $c(t)$ (например, через реакционную камеру протекают растворы с известными концентрациями) и имеется линейный по поверхностной концентрации адсорбированного аналита сигнал с прибора $s(t) = \alpha\gamma(t)$. Тогда для сигнала будет справедливо

$$\begin{cases} \dot{s} = \alpha\dot{\gamma} = k_f(s_{\max} - s) - k_r s \\ s = s_t = s_0 + \int_{t_0}^t \dot{s} dt = g(t, s_{\max}, k_f, k_r) \end{cases} \quad (32)$$

и по набору значений $s_{t \in T}$ можно будет оценить параметры s_{\max} , k_f и k_r , как это сделано в [1] (рис. 4).

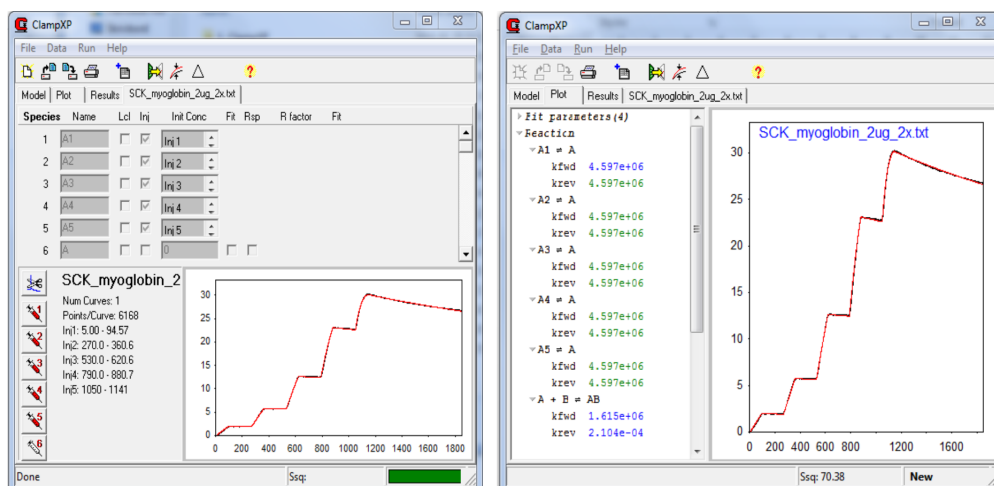


Рисунок 4 – Решение обратной задачи в [1] с помощью ClampXP: в левом окне задаётся концентрация аналита в растворе от времени, в правом окне внизу слева полученные оценки кинетических констант

4. Основное содержание

4.1. Адсорбция на поверхность бесконечно широкого канала с одним видом сайтов связывания

Физическое описание

Имеется раствор вещества А (аналит), в котором так же может присутствовать вещество В (примесь). На плоской поверхности канала, вдоль которой течёт этот раствор, имеются сайты связывания. Это проиллюстрировано на рисунке 5 (см. также 2).

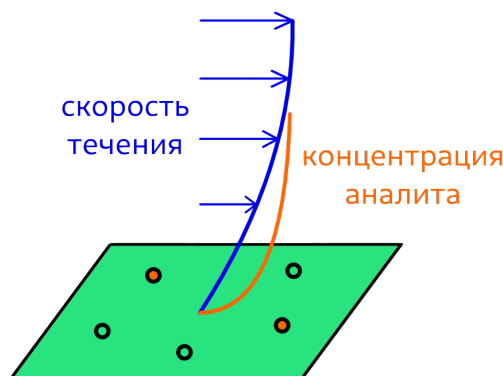


Рисунок 5 – Иллюстрация к задаче об адсорбции на поверхность; цветные кривые изображают зависимость скорости течения и концентрации аналита от расстояния до поверхности; оранжевые круги — сайты связывания, связавшиеся с аналитом, салатовые — свободные сайты связывания

Кинетика связывания соответствует изотерме Ленгмюра (см. (9)).

Одномерная постановка без примеси

В качестве расчётной области берётся отрезок с длиной δ_D диффузионного слоя (см. (20)). На одном конце отрезка происходит химическая реакция связывания веществ из раствора с сайтами связывания на поверхности, на другом — фиксируется концентрация c_0 .

Изначально концентрация веществ в растворе однородна (всюду равна c_0) и все сайты связывания свободны (на поверхности нет связывающегося аналита).

Толщину вязкостного слоя δ_U можно представить в виде

$$\delta_U = \alpha \sqrt{\frac{U\nu}{L}}, \quad (33)$$

где α — безразмерный параметр порядка единицы. В этой части в формуле (20) для расчёта δ_D знак \sim заменён на знак равенства, а α в (33) принимается равным $\sqrt{2}$, последнее будет обосновано ниже.

Параметры задачи: скорость течения раствора равна $U = 0.1$ мм/с, характерная длина $L = 2$ мм, вязкость раствора равна вязкости воды (20°C). В качестве аналита принимается стрептавидин, его коэффициент диффузии оценён в $D = 8 \cdot 10^{-5}$ мм²/с, а молекулярная масса — в $m_{\text{str}} = 60$ кДа. Кинетические константы были приняты равными $k_f = 10^7$ (М · с)⁻¹ и $k_r = 10^{-7}$ с⁻¹ в соответствии с оценкой из [8] кинетики связывания комплекса биотин-стрептавидин. Поверхностная концентрация сайтов связывания принята равной $\Gamma = 3.85 \cdot 10^{-8}$ моль/м² = 0.023 нм⁻² = $1/(43.5 \text{ нм}^2)$ (связывание со всеми сайтами будет соответствовать примерно 70% заполнения всей поверхности молекулами стрептавидаина).

На рисунке 6 представлены результаты симуляций со значениями концентрации $c_0 = 0.1$ мг/мл и $c_0 = 0.01$ мг/мл. Во втором случае диффузионный слой успевает истощиться до насыщения поверхности, после 100–200 секунд с нулевого момента времени адсорбции лимитируется максимальной возможной скоростью диффузии через диффузионный слой $j_{\text{max}} = Dc_0/\delta_D$.

Одномерная постановка с примесью

Относительно стрептавидаина, задача идентична предыдущей с $c_0 = 0.01$ мг/мл. Добавляется примесь с начальной и граничной концентрациями $c_1 = 100c_0$. Константа диссоциации примеси и сайтов связывания равна $K_{B,d} = 10^{-3}$ М, для кинетической константы $k_{B,f}$ рассматриваются значения $k_{B,f} = 10^3$ (М · с)⁻¹ и $k_{B,f} = 10^4$ (М · с)⁻¹. Полученные зависимости поверхностных концентраций стрептавидаина, примеси и свободных сайтов связывания от времени приведены на рисунке 7.

Двумерная постановка

Расчётная область представляет из себя прямоугольник со сторонами $a = 3L$ и $b = 2\delta_U$. Значение δ_U рассчитывается по формуле (19) с заменой знака \sim на $=$. Значения всех параметров те же, что и в одномерной постановке; $c_0 = 0.01$ мг/мл.

На поверхности канала (сторона a , нижняя граница расчётной области) сайты связывания расположены на отрезке длиной $L = 2$ мм, отстоящем от обоих концов рассматриваемой части поверхности канала на расстоянии L (см. рис. 8 сверху слева).

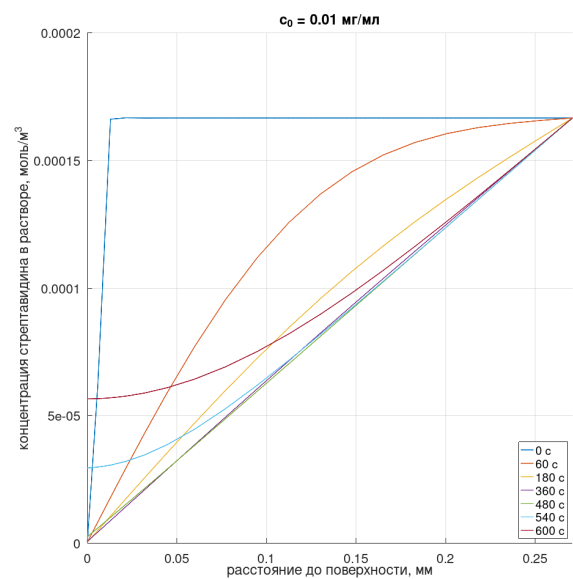
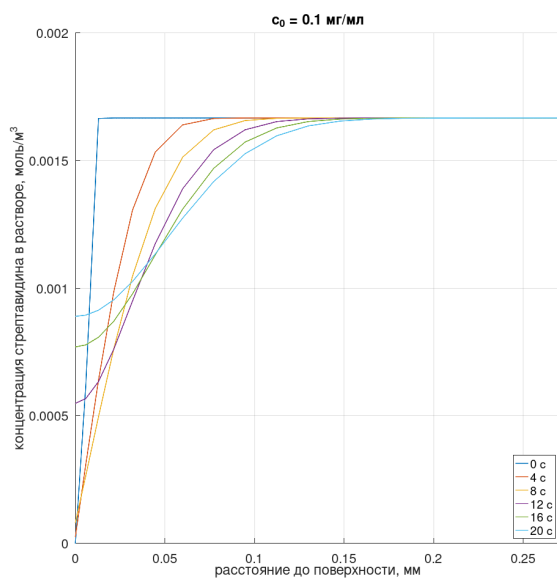
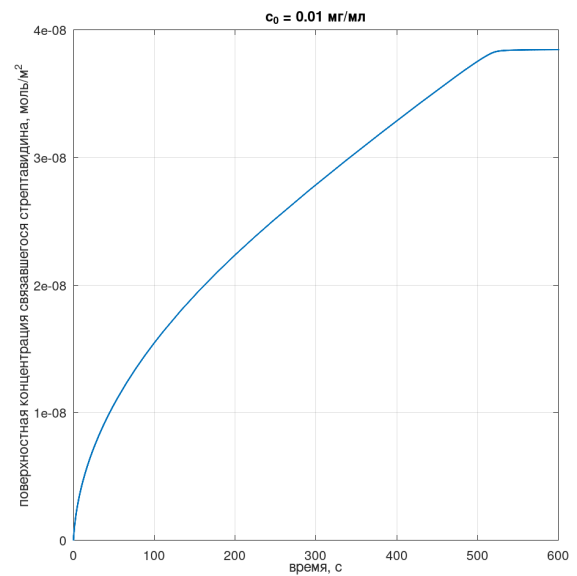
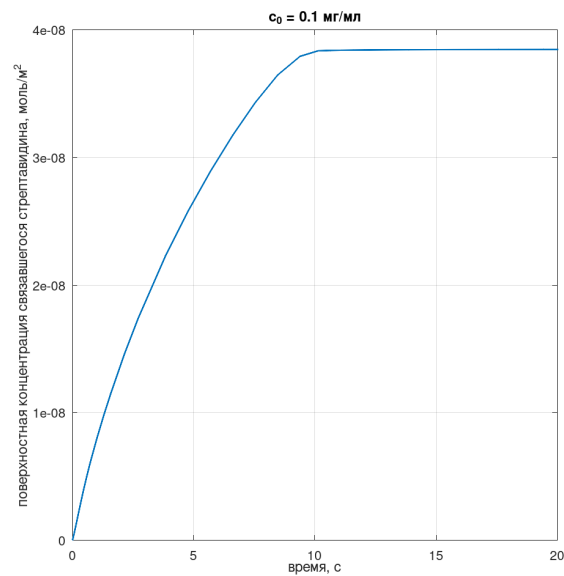


Рисунок 6 – Результаты расчётов в одномерной задаче об адсорбции на стенку бесконечно широкого канала; **сверху:** зависимость концентрации связывающегося стрептавида от времени, **снизу:** пространственное распределение стрептавида по объёму раствора; **слева:** $C_0 = 0.1 \text{ mg/ml}$, **справа:** $C_0 = 0.01 \text{ mg/ml}$

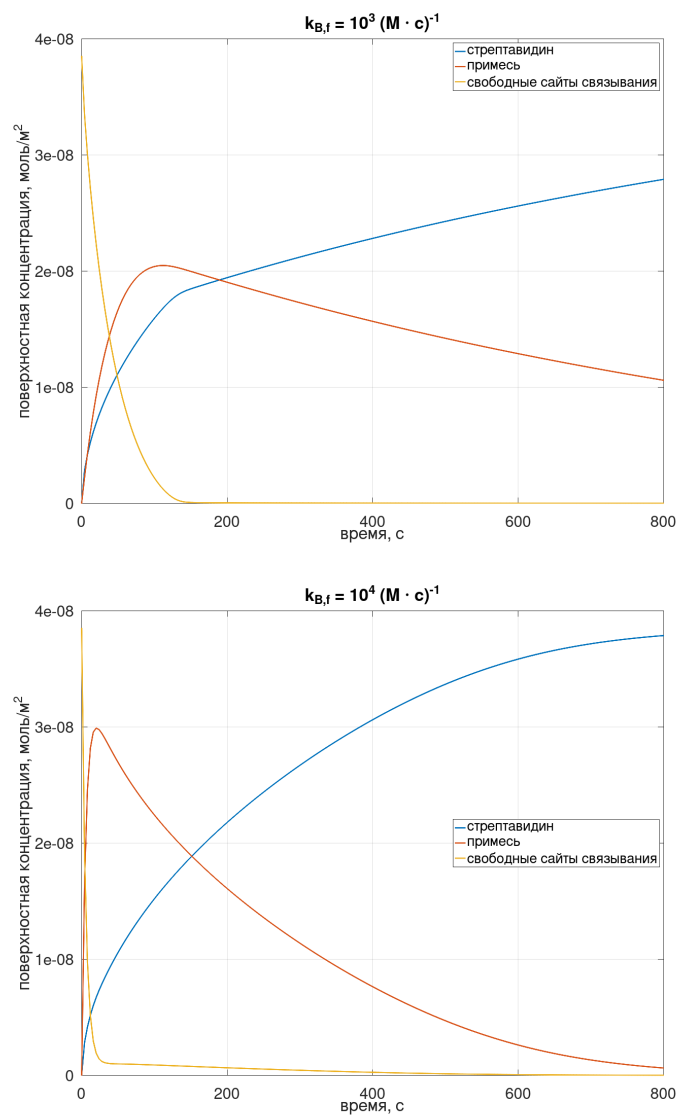


Рисунок 7 – Одномерная постановка задачи об адсорбции на стенку бесконечно широко канала при наличии примеси; зависимость поверхностных концентраций стрептавидина, примеси и свободных сайтов связывания от времени

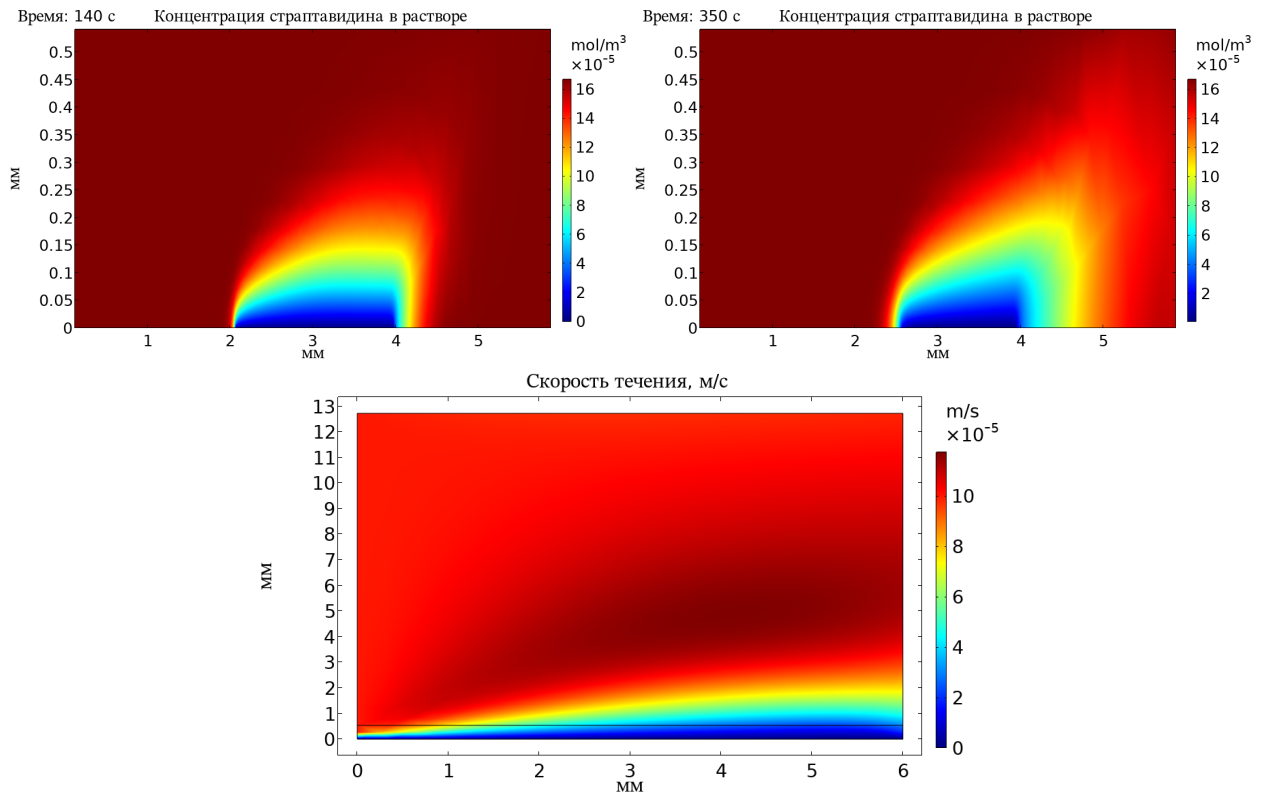


Рисунок 8 – Иллюстрация к двумерной постановке задачи об адсорбции на стенке бесконечно широкого канала; **сверху**: концентрация стрептавидина в растворе спустя 140с (слева) и 350с (справа) после нулевого момента времени, **снизу**: распределение скорости течения в объёме раствора

Вдоль левой границы расчётной области скорость потока равна $U = 0.1 \text{ мм/с}$ и направлена вдоль поверхности канала. На верхней границе расчётной области концентрация зафиксирована и равна $c_0 = 0.01 \text{ мг/мл}$.

На рисунке 8 изображены распределение концентрации стрептавидина в части объёма раствора в пределах $2\delta_D$ от стенки канала (в прямоугольнике со сторонами $a = 3L$ и $b = 2\delta_D$) в моменты времени 140с и 350с, а сверху — пространственное распределение скорости течения раствора во всей расчётной области. Этот рисунок подтверждает справедливость оценок (19) и (20) толщин δ_U и δ_D вязкостного и диффузионного слоёв.

На рисунке 9 представлено сравнение зависимости средней концентрации связывающегося стрептавида в данной (двумерной) постановке от времени с аналогичными зависимостями в одномерной постановке при значениях параметра $\alpha \in \{1, \sqrt{2}, 2\}$ (см. (33)). Этот рисунок говорит как о разумности применения одномерного приближения с оценками (19) и (20), так и о разумности выбора $\alpha = \sqrt{2}$.

4.2. Адсорбция на поверхность бесконечно широкого канала с двумя видами сайтов связывания

Одномерная постановка без примеси

Задача во многом похожа на предыдущую, но теперь имеются 2 вида сайтов связывания: А и В, соответствующие специфическому и неспецифическому связыванию.

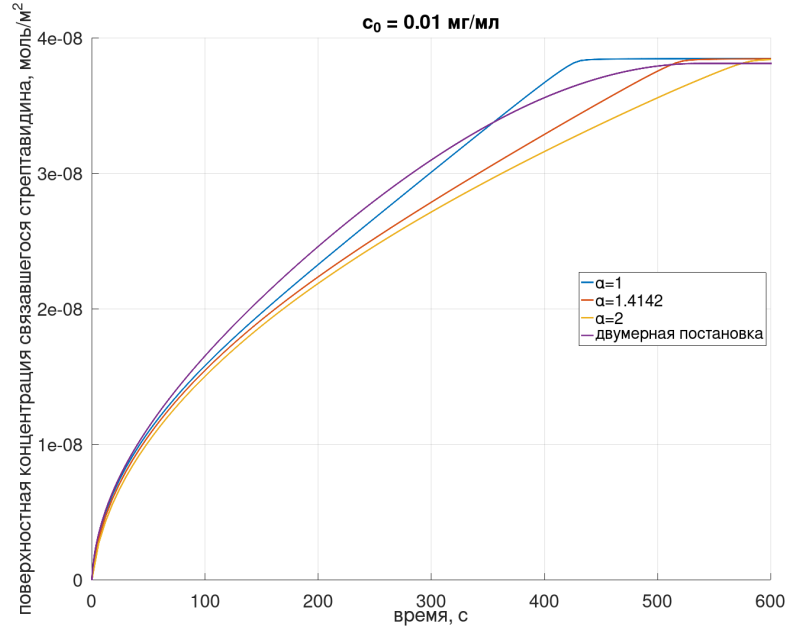


Рисунок 9 – Сравнение зависимости средней концентрации связавшегося стрептаведина в двумерной постановке от времени с аналогичными зависимостями в одномерной постановке при значениях параметра $\alpha \in \{1, \sqrt{2}, 2\}$

Химические константы равны $k_{A,f} = 3 \cdot 10^4 \text{ (М} \cdot \text{с)}^{-1}$, $k_{B,f} = 10^3 \text{ (М} \cdot \text{с)}^{-1}$, $K_{A,a} = 10^8 \text{ М}^{-1}$, $K_{B,a} = 10^6 \text{ М}^{-1}$. Это соответствует примерно кинетике связывания белка А и белка G с иммуноглобулином G, взятой из [7], с понижением $k_{B,f} = k_{G,f}$ и $K_{B,a} = K_{G,a}$ на порядок. Коэффициент диффузии принимается равным $D = 2 \cdot 10^{-5} \text{ мм}^2/\text{с}$, а масса молекулы анализа — $m = 50 \text{ кДа}$. Суммарная поверхностная концентрация сайтов связывания равна $\Gamma = 4.37 \cdot 10^{-8} \text{ моль/м}^2 = 0.026 \text{ нм}^{-2} = 1 / (38.5 \text{ нм}^2)$. Доли a и b сайтов А и В варьируются, но всегда $a + b = 1$ (количество сайтов А $\Gamma_A = a\Gamma$, сайтов В — $\Gamma_B = b\Gamma$).

Начальные условия выставляются неоднородные, см. рис. 10. Граничные условия меняются во времени: первые 1000с на границе фиксируется концентрация c_0 , следующие 7000с — нулевая концентрация, что соответствует отмывке неспецифически адсорбированного вещества.

На рисунке 11 представлена зависимость поверхностной концентрации анализа, связавшегося специфически (с сайтами А), неспецифически (с сайтами В), и их суммы при значении параметра $a = 0.5$, т. е. при одинаковом количестве сайтов А и В. Благодаря меньшему сродству анализа к сайтам В, чем к сайтам А, отмывка от неспецифически адсорбированного вещества возможна (с сохранением значимой части специфически адсорбированного).

На рисунке 12 представлены зависимости поверхностной концентрации связавшегося специфически (с сайтами А) и связавшегося всего (суммарно с сайтами А и В) анализа от времени при различных долях a сайтов А. Видно, что количество специфически связавшегося анализа существенно сильнее зависит от параметра a , чем общее количество связавшегося анализа, что может быть важно, если регистрируемый прибором сигнал пропорционален суммарному количеству связавшегося анализа или показания прибора иначе зависят от неспецифической адсорбции анализа. Это наблюдение говорит о возможной важности отмывки. Количество неспецифически связавшегося анализа не



Рисунок 10 – Иллюстрация к неоднородным начальным условиям в одномерной постановке задачи об адсорбции на поверхность канала

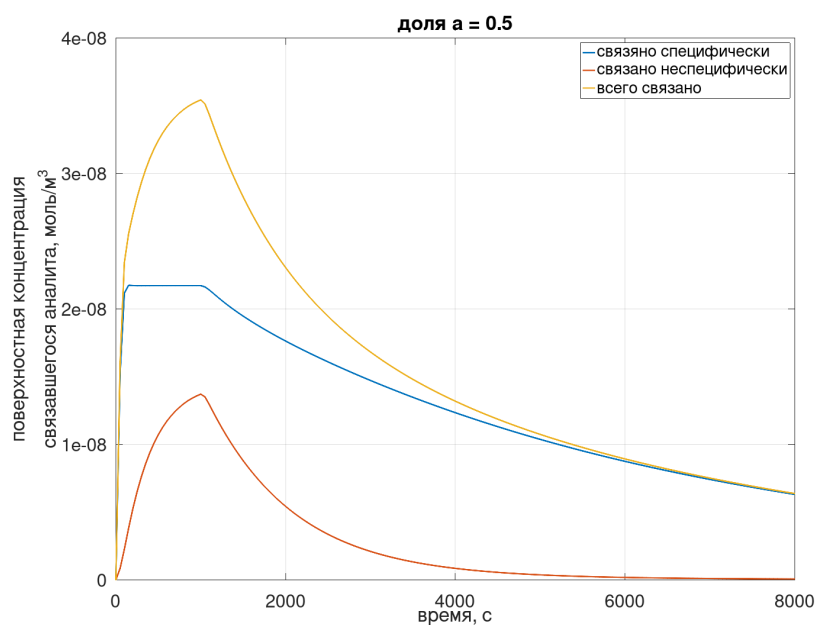


Рисунок 11 – Задача об одномерной адсорбции на стенку бесконечно широкого канала при наличии неспецифической адсорбции; зависимость поверхностной концентрации адсорбата, связанного специфически, неспецифически, и суммарно; доля сайтов А $a = 0.5$, т. е. сайтов А и В поровну

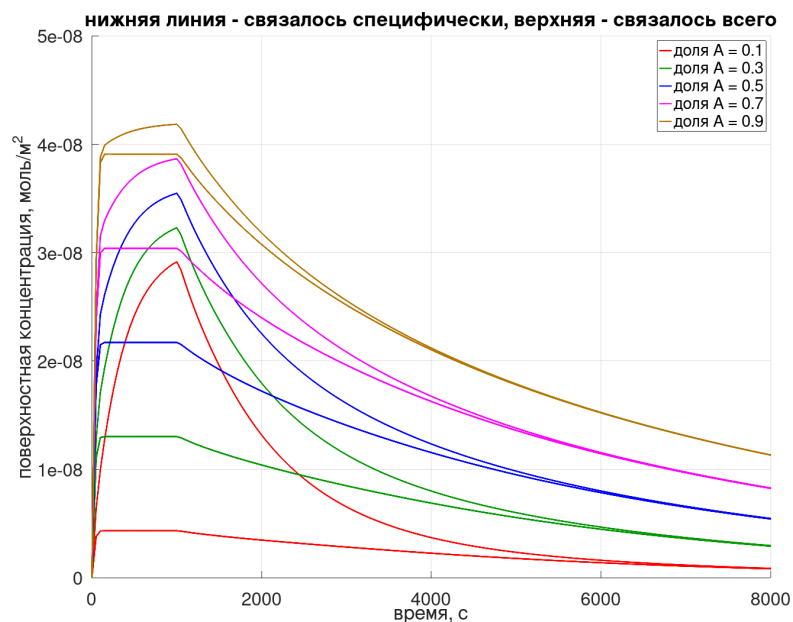


Рисунок 12 – Задача об одномерной адсорбции на стенку бесконечно широкого канала при наличии неспецифической адсорбции; цветом объединены графики зависимости специфически адсорбированного и суммарно адсорбированного аналита при фиксированном параметре a — доле сайтов специфического связывания от общего количества сайтов связывания (включая неспецифические)

изображено, т. к. это сделало бы рисунок нечитаемым.

4.3. Адсорбция на поверхность канала конечной ширины с двумя видами сайтов связывания

4.4. Адсорбция на микросферах

Физическое описание

В покое

В потоке

5. Материалы и методы

6. Результаты и обсуждение

7. Заключение

8. Выводы

Литература

- [1] Fredrik Boström. Single-cycle kinetics for qcm biosensors for high throughput nanoparticle characterization application, 2016.
- [2] Jorge Ricardo Mejía-Salazar, Kamilla Rodrigues Cruz, Elsa María Materón Vásques, and Osvaldo Novais de Oliveira Jr. Microfluidic point-of-care devices: New trends and future prospects for ehealth diagnostics. *Sensors*, 20(7), 2020.
- [3] David G. Myszka, Xiaoyi He, Micah Dembo, Thomas A. Morton, and Byron Goldstein. Extending the range of rate constants available from biacore: Interpreting mass transport-influenced binding data. *Biophysical Journal*, 75(2):583–594, 1998.
- [4] Adelina-Gabriela Niculescu, Cristina Chircov, Alexandra Cătălina Bîrcă, and Alexandru Mihai Grumezescu. Fabrication and applications of microfluidic devices: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 2021.
- [5] Patiha, M Firdaus, S Wahyuningsih, K D Nugrahaningtyas, and Y Hidayat. Derivation and constants determination of the freundlich and (fractal) langmuir adsorption isotherms from kinetics. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 333:012010, mar 2018.
- [6] Ronald F. Probstein. *Physicochemical Hydrodynamics*, chapter 4, pages 53–107. John Wiley & Sons, Ltd, 1994.
- [7] K. Saha, F. Bender, and E. Gizeli. Comparative study of IgG binding to proteins G and A: nonequilibrium kinetic and binding constant determination with the acoustic waveguide device. *Anal Chem*, 75(4):835–842, Feb 2003. [DOI:10.1021/ac0204911] [PubMed:12622374].
- [8] M. Srisa-Art, E. C. Dyson, A. J. deMello, and J. B. Edel. Monitoring of real-time streptavidin-biotin binding kinetics using droplet microfluidics. *Anal Chem*, 80(18):7063–7067, Sep 2008. [DOI:10.1021/ac801199k] [PubMed:18712935].