Выбор топологии канала проточной ячейки для реализации массового параллельного секвенирования ДНК

© Н.А. Есикова, П.К. Афоничева, М.А. Дубовик, Е.А. Ильин, А.А. Евстрапов, Д.А. Белов

Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург, Россия
E-mail: belov.da@list.ru

Поступило в Редакцию 5 мая 2026 г.
В окончательной редакции 18 июня 2026 г.
Принято к публикации 23 октября 2026 г.

Для реализации массового параллельного секвенирования нуклеиновых кислот требуется обеспечение равномерного заполнения микрофлюидного чипа (МФЧ) проточной ячейки реагентами. Эффективность использования МФЧ в значительной степени определяется топологией его каналов, которая должна обеспечивать рациональное использование доступной площади, и гидродинамическими условиями. Представлено обоснование выбора трех топологий МФЧ на основе результатов численного моделирования процессов массопереноса. Методом ксурографии изготовлены соответствующие МФЧ. На основании экспериментальных исследований процессов массопереноса в изготовленных МФЧ при различных параметрах движения жидкости выбрана предпочтительная топология.

Ключевые слова: секвенирование ДНК, численное моделирование, массоперенос, микрофлюидика.

DOI: 10.61011/PJTF.2026.23.64010.9726k

Технология массового параллельного секвенирования (МПС) нуклеиновых кислот стремительно развивается в последние два десятилетия и широко используется в научных исследованиях и клинической практике [1]. Для реализации методов МПС производители (компании Illumina, США; BGI, Китай; GeneMind, Китай; ИАП РАН, Россия и др.) используют различные конструкции проточных ячеек, содержащие стеклянные или кремний-стеклянные микрофлюидные чипы (МФЧ). В МФЧ, планарных устройствах с одним или несколькими каналами, попеременно протекают различные реагенты, обеспечивающие образование и рост олигонуклеотидных кластеров на функциональных зонах верхней и/или нижней поверхности реакционной камеры. Эффективная площадь функциональной зоны S_e характеризуется наилучшими условиями для роста кластеров плотностью $200-1500$ тыс. штук на mm^2 [2]. Равномерность распределения потоков реагентов в каналах МФЧ критически важна для обеспечения эффективности и воспроизводимости процесса секвенирования при максимальном размере площади S_e [3,4]. Неравномерность скоростных профилей может приводить к неоднородному распределению реагентов и снижению эффективности массообмена, что ухудшает условия проведения реакций и снижает производительность секвенирования. Цель работы — выбор и обоснование топологии МФЧ проточной ячейки для реализации МПС.

Современные системы секвенирования используют проточные ячейки с входными и выходными портами, которые располагаются с одной или противоположных сторон МФЧ. Исходя из особенностей технической реализации прибора для секвенирования, разрабатываемого в ИАП РАН, было выбрано одностороннее размещение портов с расстояниями между центрами 10 mm. При создании новой топологии учитывались два наиболее популярных подхода: с одной [3] и двумя реакционными камерами [5,6].

При выборе топологии канала было учтено следующее.

1. Средняя глубина канала должна составлять около $100\,\mu$m, а ширина кратно соответствовать апертуре используемого оптического детектора. Площадь S_e должна быть не менее $125\,\mathrm{mm}^2$, габариты МФЧ — не более 20×45 mm.

2. Отсутствие резких сужений и расширений, прямых и острых углов и асимметричного входа.

3. Обеспечение ламинарного течения жидкостей на протяжении всего канала и реакционной камеры.

4. Значения гидродинамических чисел: число Рейнольдса $\mathrm{Re} < 4$ — устойчивый ламинарный режим в микрофлюидных устройствах, число Дина $\mathrm{Dn} < 1$ — предотвращает искажение профиля течения в изогнутых каналах.

Численное моделирование выполнялось в программной среде COMSOL Multiphysics (версия 5.4). Построение сетки проводилось таким образом, чтобы обеспечить точность результатов при сохранении вычислительной эффективности. Анализ сходимости сетки был проведен при пяти различных размерах ее элементов и при различных объемных расходах жидкости $Q = (3-5)\cdot10^{-6}\,\mathrm{kg\cdot s^{-1}}$. Значительных изменений в профилях скоростей при количестве элементов более 500 000 не наблюдалось (коэффициент вариации менее 0.9 %).

Для реализации численного моделирования гидродинамических процессов в МФЧ использовались уравнения Навье–Стокса [7], что позволило получить пред-

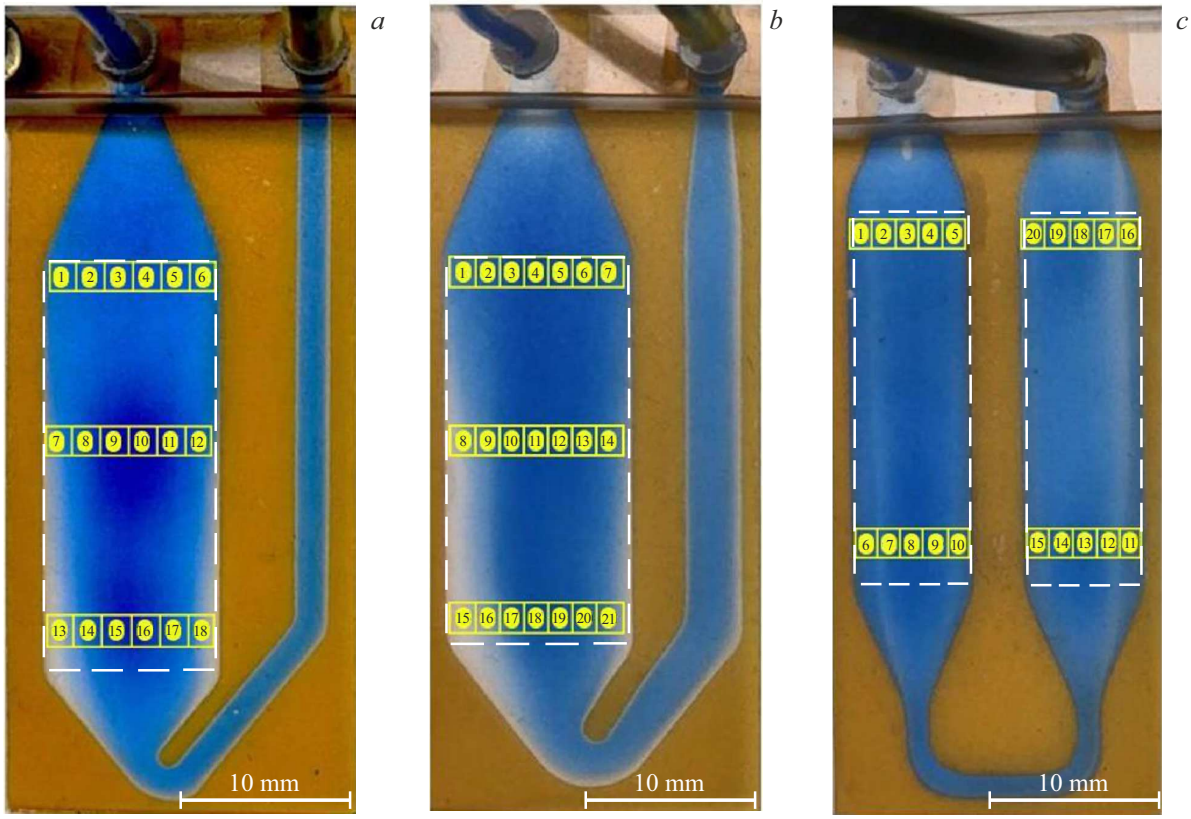


Рис. 1. Изображения чипов с анализируемыми областями: МФЧ № 1 (*a*), МФЧ № 2 (*b*) и МФЧ № 3 (*c*).

Эффективная площадь МФЧ при различных расходах жидкости

Наименование чипа	Совокупный объем каналов и камер чипа, μl	Q, kg·s^{-1}	V_{av}, m/s	S_{e1}, mm^2	S_{e2}, mm^2
МФЧ № 1	42.5	$3.3 \cdot 10^{-6}$	0.0018	157.0	220.6
		$33 \cdot 10^{-6}$	0.018	164.3	221.3
МФЧ № 2	47.1	$3.3 \cdot 10^{-6}$	0.0017	87.2	202.4
		$33 \cdot 10^{-6}$	0.017	81.2	204.3
МФЧ № 3	45.9	$3.3 \cdot 10^{-6}$	0.0025	243.6	288.6
		$33 \cdot 10^{-6}$	0.025	253.9	289.2

ставление о профилях скорости и давления жидкости в МФЧ. Были заданы следующие граничные условия: ламинарный поток, на входе (Inlet) — равномерный скоростной профиль (Normal Inflow Velocity) (упрощение, обусловленное коротким входным участком), на выходе (Outlet) — стандартное условие „Pressure“, равное нулю, а на стенках канала (Wall) — условие „No Slip“, что соответствует нулевой скорости потока на границе. Расходы жидкости Q выбраны по аналогии с расходами, реализуемыми в приборе для секвенирования „Нанофор СПС“ (ИАП РАН, Россия).

Численное моделирование позволило выбрать три топологии чипов для дальнейших экспериментальных исследований. Моделирование показало, что в центральной части реакционной камеры (двух камер в случае МФЧ № 3) формируется участок с наибольшей однородностью течения. Выполнена оценка эффективных площадей S_{e1} и S_{e2}, характеризующихся различием скоростей не более 5 и 10 % от медианной скорости V_{av} соответственно; штриховыми линиями на рис. 1 обозначены границы площади секвенирования S_e, из которой рассчитывались данные значения. Для этого был сформирован точечный массив векторов скоростей с шагом 72 μm на высоте 10 μm над нижней поверхностью канала. В таблице приведены значения S_{e1} и S_{e2} в зависимости от расходов потока жидкости.

Для экспериментальных исследований были изготовлены полимерные МФЧ с тремя топологиями методом ксурографии на плоттере Silhouette Cameo 4 с ножами Graphtec. Верхняя и нижняя часть МФЧ изготавливались из поликарбоната толщиной 250 μm (матовый),

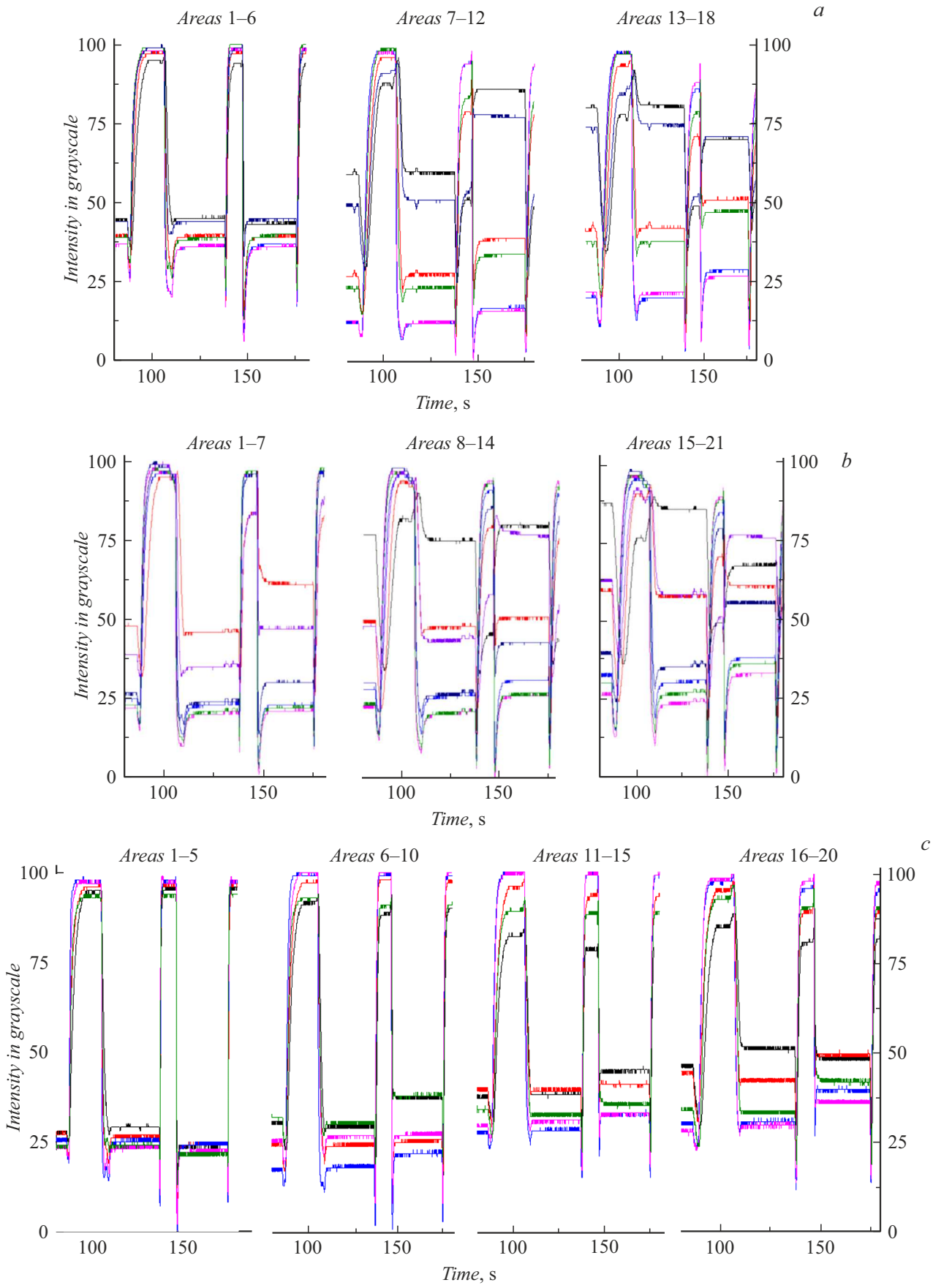


Рис. 2. Динамика изменения концентрации красителя в различных областях МФЧ № 1 (*a*), МФЧ № 2 (*b*) и МФЧ № 3 (*c*).

центральная часть, определяющая топологию, — из термоактивируемой ленты Tesa HAF 8402.

Экспериментальная установка для обеспечения течения жидкостей в МФЧ состояла из шприцевого насоса фирмы Runze fluid, трубки из политетрафторэтилена длиной 100 mm с внутренним диаметром 0.5 mm и прижимных устройств для подсоединения трубок к МФЧ. Видео регистрировалось при частоте кадров 30 fps с разрешением 1920×1080.

Реализовалась следующая программа работы насоса: 1) подача в чип 200 μl ТЕ-буфера с расходом жидкости $Q = 3.3 \cdot 10^{-6}\,\mathrm{kg \cdot s^{-1}}$; 2) подача в чип 100 μl 1 % раствора бромкрезолового зеленого в ТЕ-буфере с расходом $3.3 \cdot 10^{-6}\,\mathrm{kg \cdot s^{-1}}$; 3) промывка шприца насоса; 4) подача в чип 200 μl чистого ТЕ с $Q = 33 \cdot 10^{-6}\,\mathrm{kg \cdot s^{-1}}$; 5) подача в чип 100 μl 1 % раствора бромкрезолового зеленого в ТЕ-буфере с $Q = 33 \cdot 10^{-6}\,\mathrm{kg \cdot s^{-1}}$; 6) промывка шприца насоса (пункты 1–3 в трех повторах, затем пункты 4–6 в трех повторах). На рис. 1 приведены изображения чипов после подачи 1 % раствора бромкрезолового зеленого в ТЕ-буфере.

Наблюдаемая полосчатая структура потока свидетельствует о неоднородном распределении давлений в поперечном сечении канала, приводящем к неоднородному перезаполнению при смене раствора и неоднородному смешиванию жидкостей друг с другом (т. е. неоднородной концентрации красителя). Такое поведение снижает воспроизводимость эксперимента и может приводить к размыванию временны́х и количественных характеристик исследуемых процессов. Для МФЧ № 1 наблюдаются две последовательные зоны концентрирования красителя, что, вероятно, связано с сильным изменением площади сечения канала далее. Для МФЧ № 3 также наблюдаются подобные зоны.

Цифровой анализ видеофайлов выполнялся в программе Fiji. Цветовая модель видео переводилась в градации серого, затем выполнялась калибровка по значениям интенсивности, соответствующим чистому буферу и буферу с красителем, с помощью функции Calibrate. Далее с помощью функции ROI Manager оценивалось изменение средних интенсивностей выбранных областей одинаковой площади, выделенных прямоугольными контурами на рис. 1. Из графиков изменения интенсивностей, приведенных на рис. 2, и изображений на рис. 1 видно, что различие концентраций по ширине реакционных камер значительно растет при отдалении от входа в МФЧ. Для МФЧ № 1 и 2 наблюдаются по две зоны по краям камеры, в которых не происходит смены жидкости, что ведет к значительным уменьшениям площади рабочей зоны. Такой эффект в МФЧ № 3 в явном виде отсутствовал. Кроме того, на графиках для МФЧ № 1 четко отражена зона концентрирования красителя в центральной части камеры, нижние плато для зон 7–12 ниже, чем для зон 1–6. В МФЧ № 3 различие концентраций в двух реакционных камерах достигает 35 %, что может привести к значительному падению эффективности секвенирования во второй камере.

По совокупности признаков приоритетной является топология МФЧ № 3. Результаты численных и экспериментальных исследований показали, что преимуществами по площади эффективной зоны обладает МФЧ № 3 с двумя реакционными ячейками, что обусловлено меньшим расширением при переходе каналов в реакционные камеры. Из недостатков МФЧ № 3 можно отметить больший совокупный объем канала и реакционных камер по сравнению с МФЧ № 1 (на 7.5 %) и соответственно больший расход реагентов. Зафиксированная разница концентраций между камерами МФЧ № 3 (до 35 %), вероятно, обусловлена недостаточным объемом подаваемого буфера с красителем (100 μl). Кроме того, для применения топологии с двумя реакционными камерами необходимо иметь систему детектирования оптических сигналов со значительно бóльшим совокупным полем зрения или обеспечить возможность сканирования двумя детекторами. Дополнительным ограничением выбранной топологии является одностороннее расположение входного и выходного портов, которое определяет U-образную траекторию потока и препятствует дальнейшему увеличению эффективной площади чипа, а также приводит к росту гидравлического сопротивления.

Для практического использования предложенных МФЧ в задачах МПС требуются более тщательный подбор режима перезаполнения жидкостями и дополнительные экспериментальные исследования на стеклянных/кремний-стеклянных МФЧ.

Финансирование работы

Исследование выполнено в рамках государственного задания № 075-00444-26-00 Министерства науки и высшего образования РФ.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

[1] A. Isaic, N. Motofelea, T. Hoinoiu, A.C. Motofelea, I.C. Leancu, E. Stan, S.R. Gheorghe, A.G. Dutu, A. Crintea, Diagnostics, **15** (19), 2425 (2025). DOI: 10.3390/diagnostics15192425
[2] В.В. Манойлов, А.Г. Бородинов, А.С. Сараев, А.И. Петров, И.В. Заруцкий, В.Е. Курочкин, ЖТФ, **92** (7), 985 (2022). DOI: 10.21883/JTF.2022.07.52655.318-21 [V.V. Manoilov, A.G. Borodinov, A.S. Saraev, A.I. Petrov, I.V. Zarutskiy, V.E. Kurochkin, Tech. Phys., **67** (7), 818 (2022). DOI: 10.21883/TP.2022.07.54478.318-21].
[3] Patent US10830781B2 (2018).
[4] J. Ji, M. Tristan, F. Ketchum, W. Kuang, G. Fu, X. Ren, P. Zorlutuna, Lab Chip, **25** (23), 6401 (2025). DOI: 10.1039/d5lc00469a
[5] Patent US12168227B2 (2024).
[6] Patent US12188848B2 (2025).
[7] N.C. Ohalete, O. Ayo-Farai, C. Onwumere, C.P. Maduka, T.O. Olorunsogo, World J. Adv. Res., **21** (01), 1115 (2024). DOI: 10.30574/wjarr.2024.21.1.0120