

Dynamika mikro i nano-objektów zawieszonych w płynie

Tomasz A. Kowalewski

P. Nakielski, F. Perinni, K. Zembrzycki, P. Hejduk, S. Pawłowska
Zakład Mechaniki i Fizyki Płynów
IPPT PAN, Warszawa

Mikroświat a mechanika płynów

- ✓ Nanotechnologia, czyli „There’s Plenty of Room at the Bottom! *R.P. Feynman 1959*”
- ✓ Funkcje systemów biologicznych są oparte na mechanizmach oddziaływań w skali nano z płynami, wykorzystują przepływy do komunikacji i sygnalizacji.
- ✓ Systemy bio-analzy, zarówno w makro skali jak i obecnie budowane mikro-analizatory (microTAS, Lab-on-Chip) to wielofunkcyjne układy przepływowe
- ✓ Nowe zjawiska związane z manipulacją pojedynczymi makromolekułami
- ✓ Samoorganizacja – podstawa budowy materiału biologicznego
- ✓ Nanorurki, nanowłókna, nanodruty, nanocząstki jako zawiesiny w płynach – ich wykorzystanie jako sensory biochemiczne, materiał biomedycyny regeneracyjnej, antybakteryjne opatrunki



Konieczność połączenia wielu skal zjawisk i sprzężenie mechanizmów mechanicznych, fizycznych i chemicznych

Nanonauka: $R \sim 1 \text{ nm} - 100 \text{ nm}$

Nauka o systemach, materiałach, procesach i urządzeniach na których własności czy funkcjonowanie decydujący wpływ ma efekt skali.

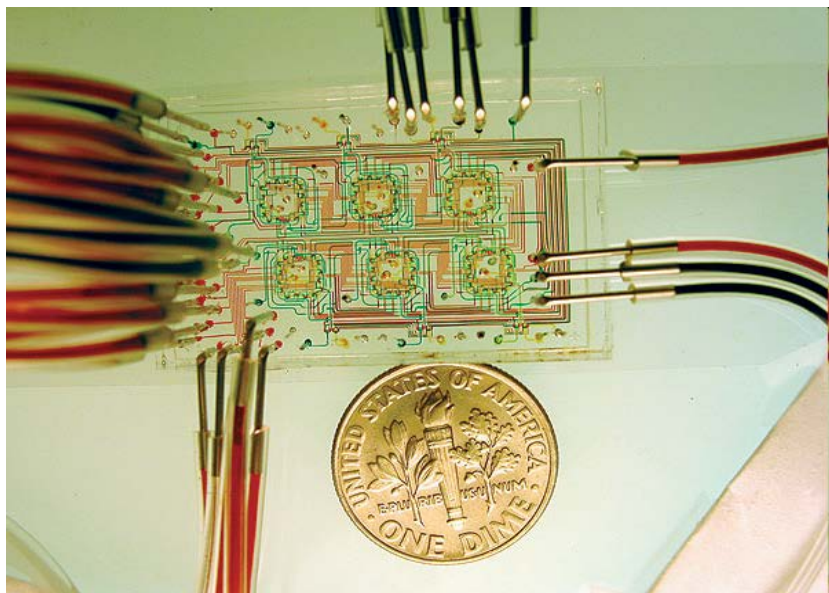
– Mikroprzepływy – modyfikacja opisu ciągłego

$$R \rightarrow 0$$

$$Re \sim UR/v \searrow \quad \Delta P \sim R^{-4} \nearrow \quad \langle \Delta x^2 \rangle \sim 2D\Delta t \nearrow \quad \Delta P \sim 2\sigma/R \nearrow$$

- Nanoprzepływy - istotne efekty molekularne
- Nanopłyn - zawiesina nanocząstek jako super coolant

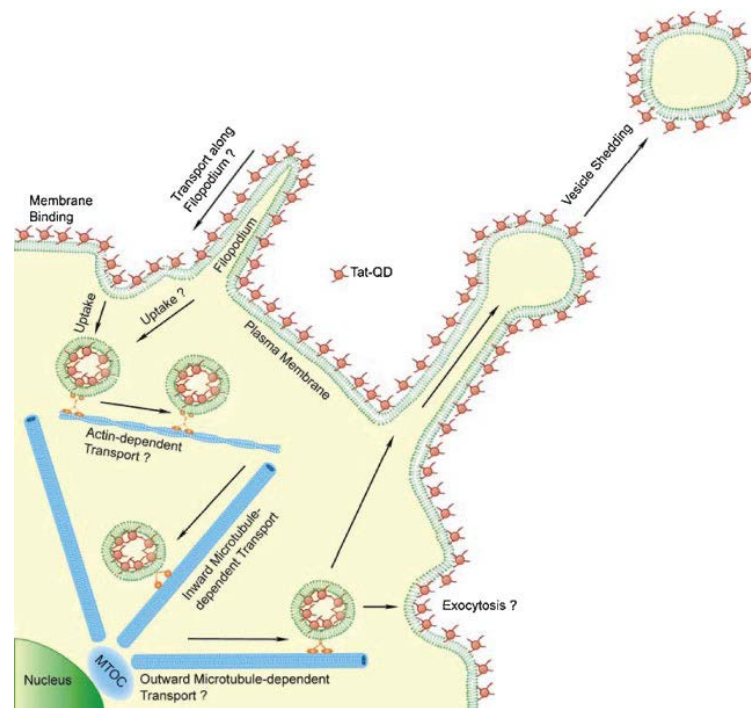
Lab on a chip mikrometry



System do analizy kilkadziesiąt komórek w sterowanych mikropompami zmiennych warunkach pobudzenia (Quake Laboratory)

Typowa komórka	≈ 5 -10μm
Bakteria	≈ 1μm
Wirus	20 – 300nm
Nano pory	2 - 5 nm

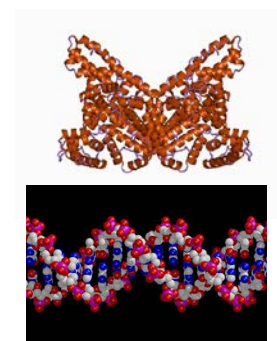
Błona komórkowa nanometry



Penetracja nanocząstek złota - model (Stellacci, Verma, Small 2009)

Albumina – jako sfera 5nm (?) (60kDa)

Human DNA – 3nm x 2m!
jak taki obiekt płynie?



Przepływy bio-nano-medyczne

- Oddziaływanie z przepływem mikrocząstek
- Lab-on-Chip jako narzędzie diagnostyczne
- Nanocząstki i ich oddziaływanie z komórkami
- Nanowłókna i kropki kwantowe w diagnostyce komórkowej i terapii celowej
- Mikroskopowa analiza przepływów biologicznych
- Zjawiska transportu na poziomie komórki, jądra, nanoporów (tłok molekularny, wpływ elastyczności transportowanego obiektu)

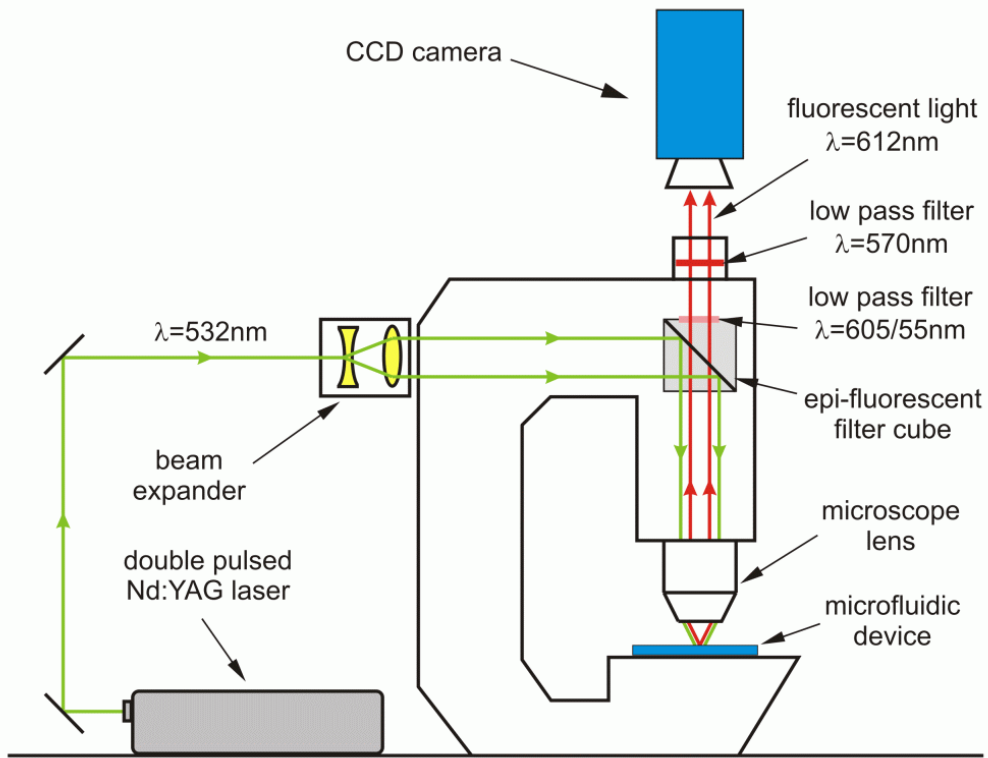


Analiza mobilności nano – mikro obiektów w płynie

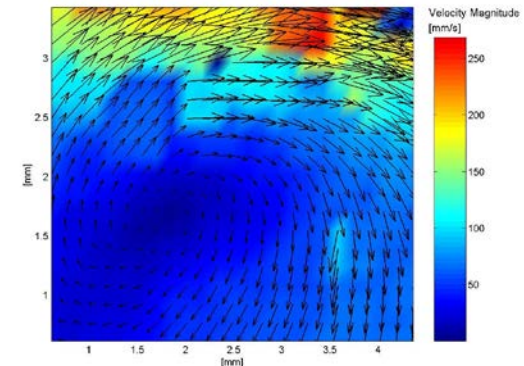
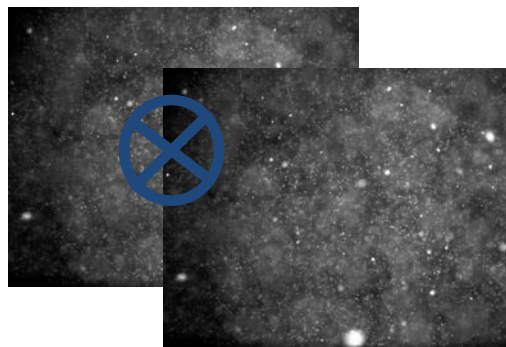
Narzędzia badawcze

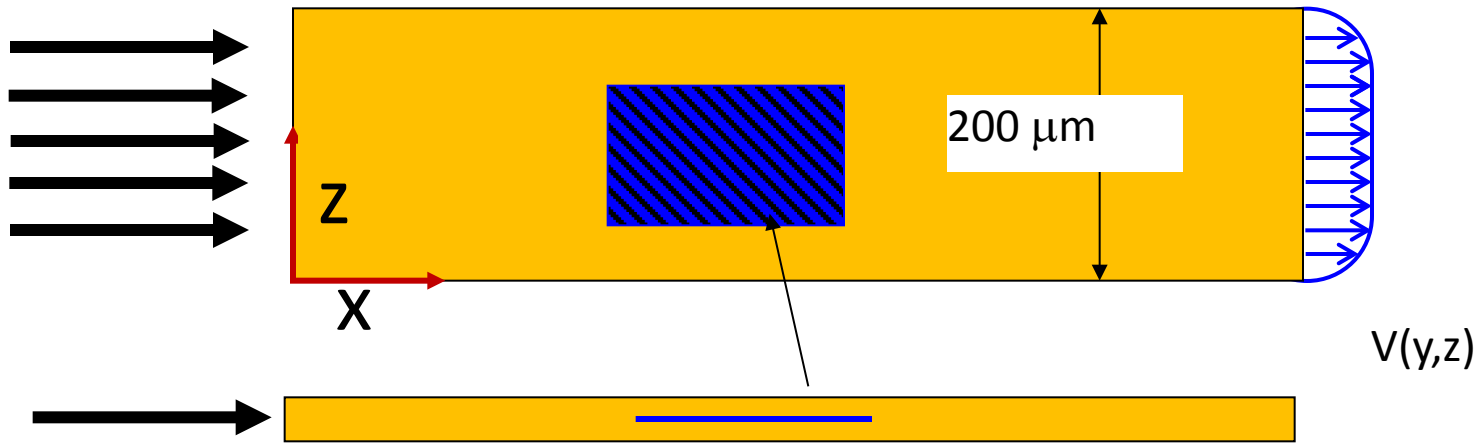
- Pomiar przepływu w mikro i nanoskali (uPIV)
- Pomiar transportu, temperatury (Brown)
- Pomiar własności ośrodka (mikro-reologia)
- Pomiar struktury (AFM, SEM)
- Pomiar mechaniczny (AFM, pułapka optyczna)
-

Micro Particle Image Velocimetry (μ PIV)



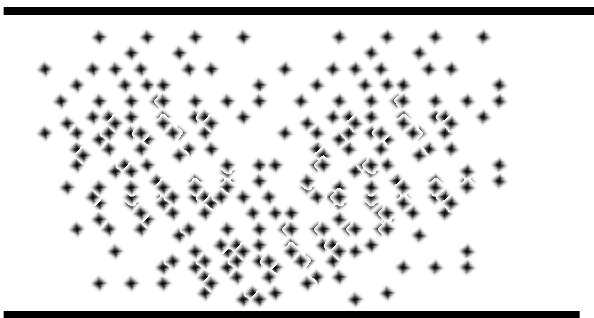
Cząstki fluorescencyjne pod mikroskopem



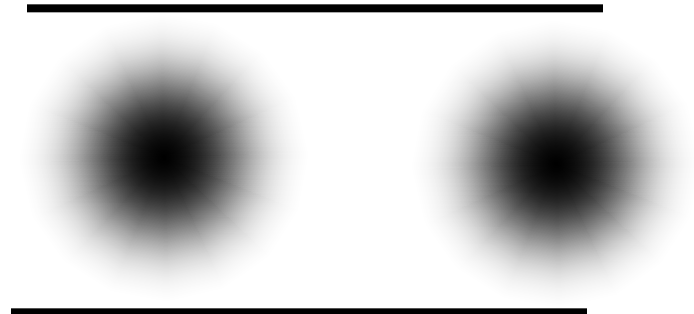


microPIV i nanoPIV

500 μm channel



500 nm

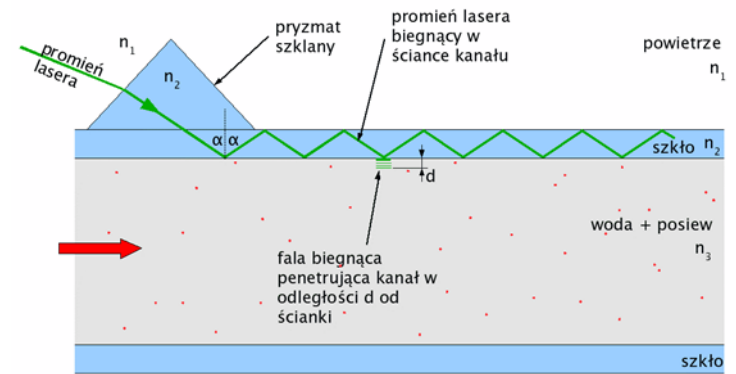


Obraz fluorescencji mikro i nanocząstek

Analiza mikroprzepływów

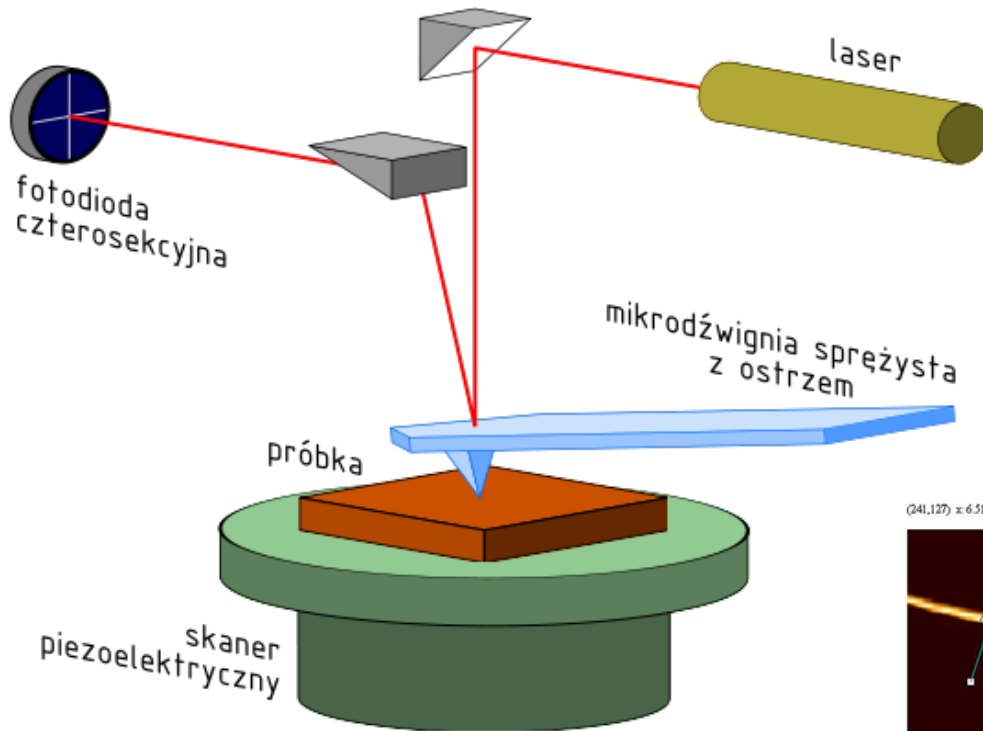


Mikroskopia fluorescencyjna
TIRF

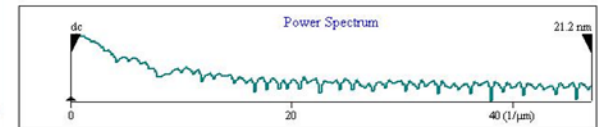
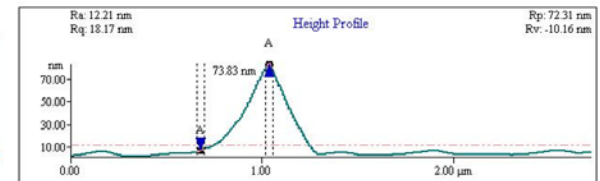
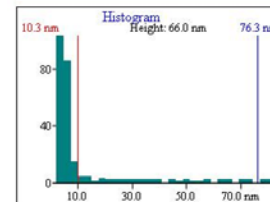
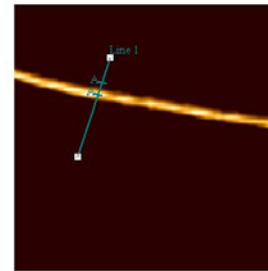


Pomiar w odległości
20 - 100nm
od ścianki

AFM – Mikroskop sił atomowych



(241,127) ± 6.51 μm y: 3.430 μm ± 0.007026 μm

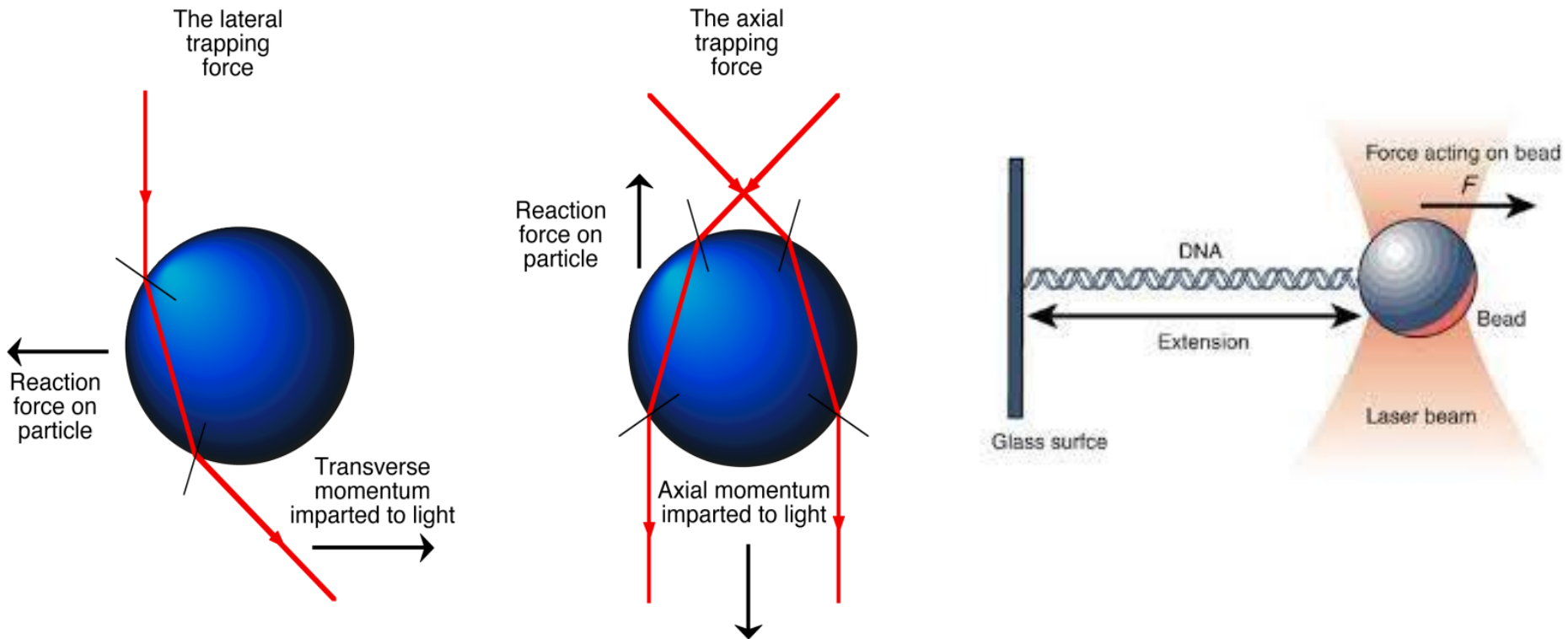


	Arc length	Bearing Ratio	Bearing Ratio	Peak (Pp)	Valley (Pv)	Cursor
Line 1	2.742 μm	@30.0% 6.68 nm	@80.0% 3.84 nm	72.31 nm	-10.16 nm	A h: 0.07383 μm
Delta []						

AFM - zasada działania i obraz nanowłókna

Szczypce optyczne

Optical tweezers



Wiązka laserowa kontroluje położenie nanocząstki - pomiar sił, oddziaływań, rozciąganie struktur molekularnych .

Nanopłyyny

Generalnie zawiesiny cząstek stałych lub kropeł o wymiarach poniżej 1 mikrometra. Decydującą rolę odgrywają:

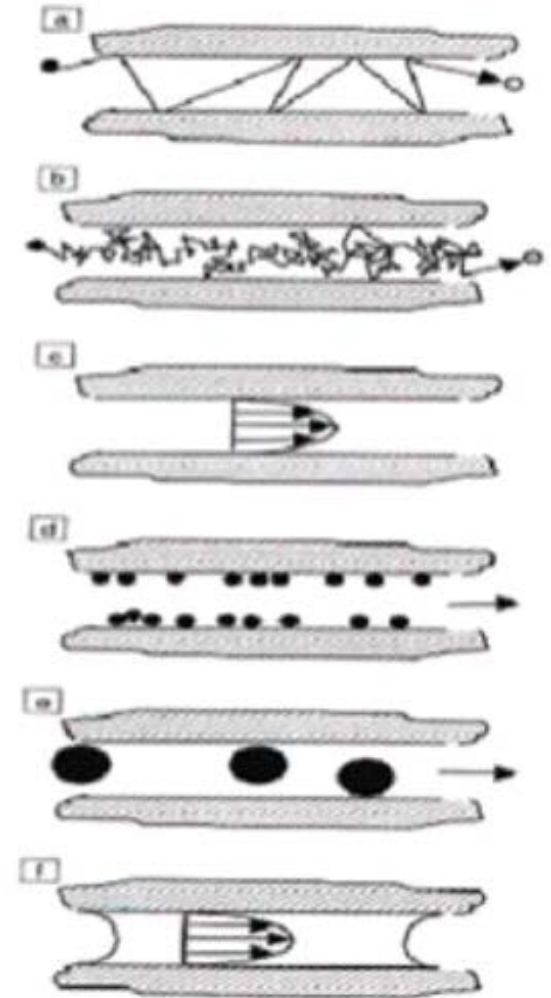
- Ruchy Browna
- Oddziaływania jonowe
- Oddziaływania steryczne
- Oddziaływania molekularne

Dawniej → „zawiesiny koloidalne”

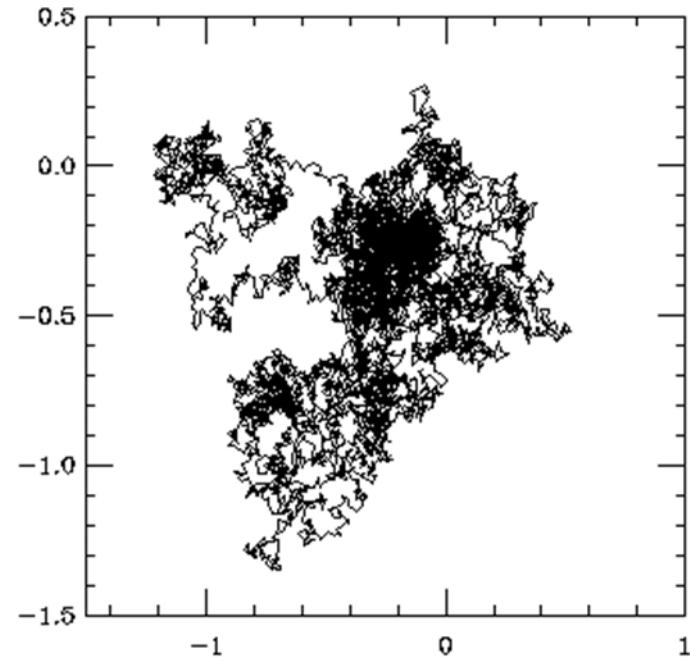
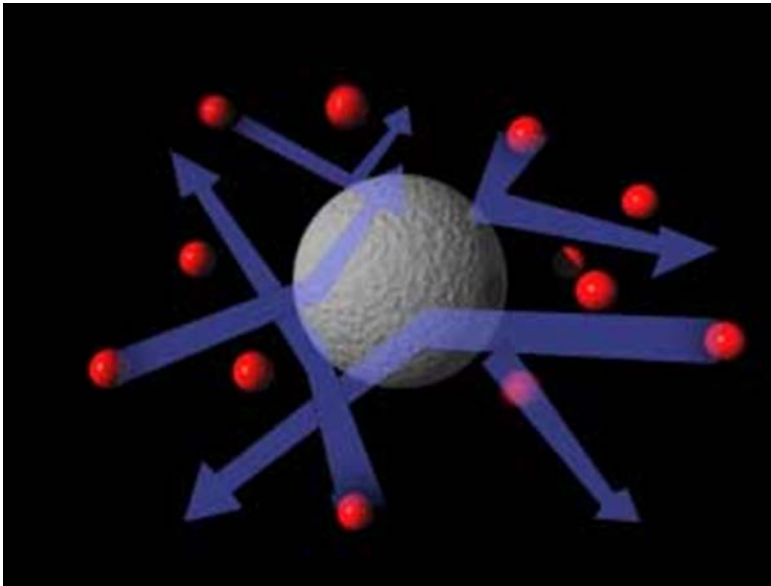
Niektóre problemy w nanoprzepływach

- ✓ Przepływ „balistyczny” - dyfuzja Knudsena
- ✓ Makro i nano dyfuzja
- ✓ Przepływ ośrodka ciągłego
- ✓ Makro i nano porowatość
- ✓ Włókna molekularne, np. włókna wody w CNT
- ✓ Efekty kapilarne

warunki brzegowe
studnie potencjału
konformacje



Ruchy Browna – narzędzie w nanoskali



Analiza ruchów Browna jako detektora własności
płynu i otoczenia w skalach nano i mikro

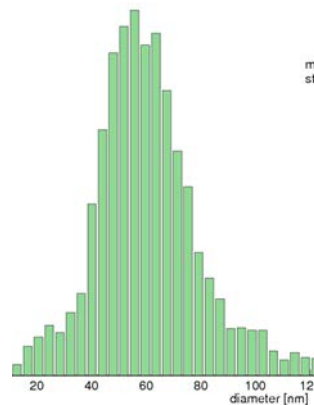
Analiza ruchów Browna nanocząstek

$$\langle s^2 \rangle = aD\Delta t \quad a = 2,4,6$$

Pomiar średnich przemieszczeń $\langle s^2 \rangle$ -> dyfuzja D

$$D = \frac{k_B T}{3\pi\mu d_p}$$

Dyfuzja -> wymiar cząstki d_p ,
opór (lepkość) μ , temperatura T



Problemy

$$D = \frac{k_B T}{3\pi\mu d_p}$$

- d_p średnica cząstki (kulki) - jak to się ma do rzeczywistości?
 - stopnie swobody obiektu 3D
 - powierzchnia – jej oddziaływanie z płynem
- $d_p \leq a$ (wymiar elementów płynu porównywalny) ?
- $\Delta x/L$ przemieszczenie porównywalne z wymiarem komórki, jądra, porów
- $\Delta x/C$ przemieszczenie porównywalne z odległością między obiektami
- μ - jaka lepkość ? To jest raczej współczynnik oporu, czy jest stały ?
- Stokes – czy obowiązuje? Krótkie czasy, przyspieszenia, poślizg na ściance
- Δt – czas między obserwacjami, za krótki - “ballistic motion”, za długi – “not random walk”
- ruchy termiczne, ale czy tylko ?

Inne siły zawsze obecne w skalach nano:

- elektrostatyczne
- molekularne
- chemiczne

Skąd mimo to mamy tak piękną zgodność pomiarów deklarowaną w prospektach?

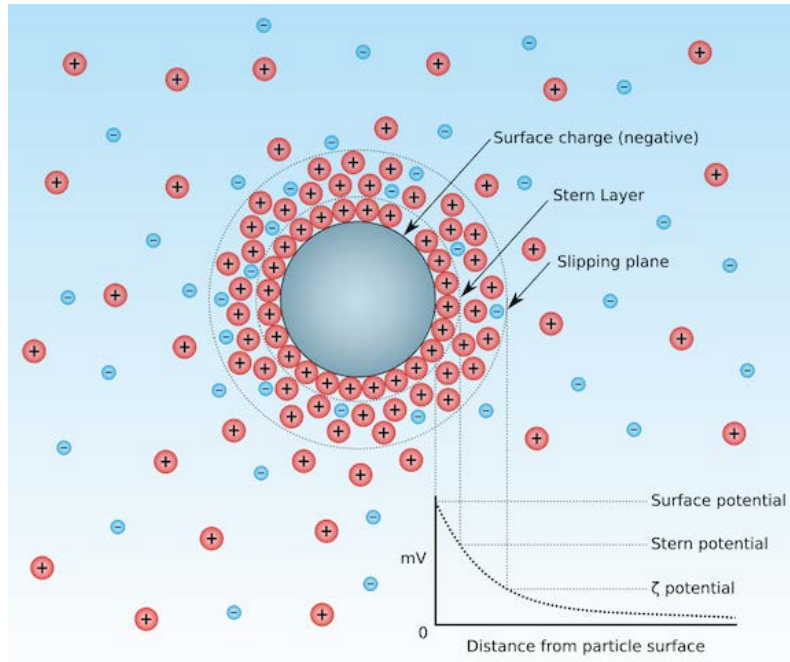
Efektywny (hydrodynamiczny) wymiar nanocząstki

Hydrodynamiczny wymiar cząstki $> d_p$ (nawet znacznie!):

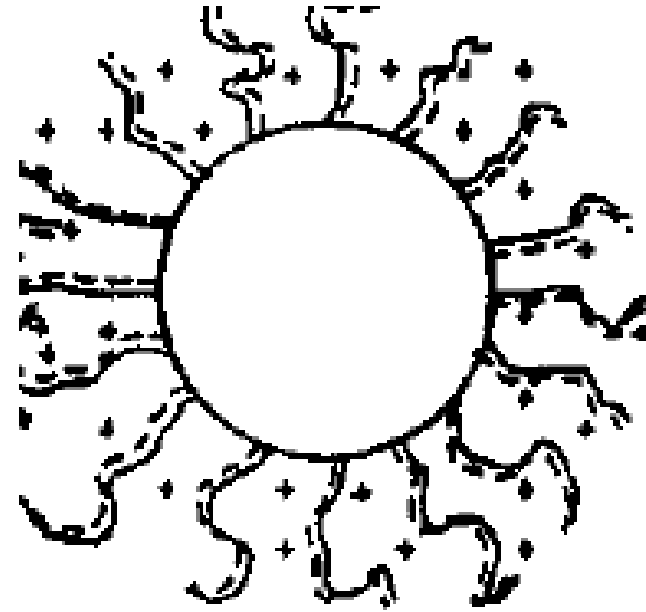
- Na granicy ciecz powierzchnia – nanocząstki otoczka jonów – EDL (elektryczna warstwa podwójna) - 3nm – 100nm
- Otoczka molekuł stabilizatora (białka, polimery) – 10nm – 1000nm
- Kinematyczny warunek brzegowy (poślizg na granicy ciecz – ciało stałe), efekty zwilżania powierzchni.

Istotny wpływ zarówno płynu jak i rodzaju powierzchni: znając fizyczny wymiar nanocząstki można wyznaczyć parametry oddziaływań powierzchnia ciała stałego - ciecz

Efektywny wymiar nanocząstki



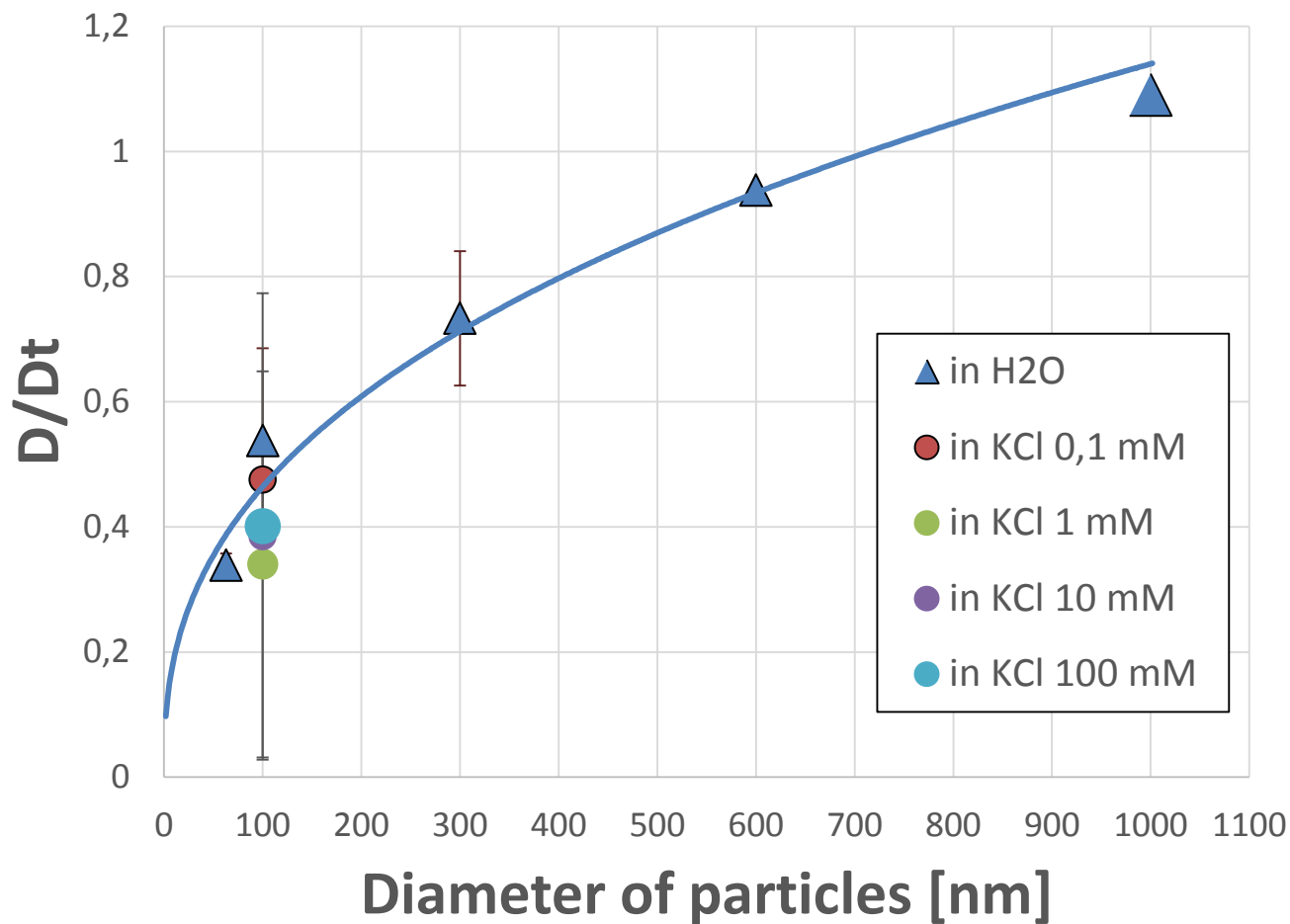
Otoczka jonowa



Otoczka steryczna

Jaki jest wymiar hydrodynamiczny (efektywny) cząstki? Pytanie znacznie bardziej złożone dla ruchów Browna cząstek niesferycznych, długich i deformowalnych łańcuchów (białka, DNA).

Wpływ wymiaru nanocząstki na jej efektywną mobilność (promień hydrodynamiczny)



Ruch Browna nanocząstki

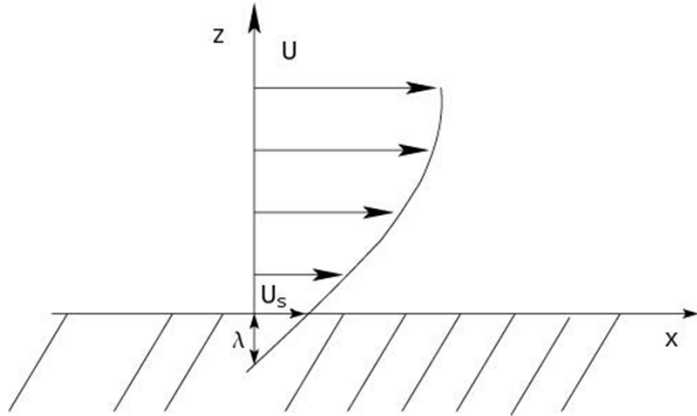
Wpływ otaczającej chmury jonów, molekuł

- **DLVO** (Derjaguin, Landau, Overbeek & Verwey) **model teoretyczny** uwzględnia siły molekularne **van der Waalsa i efekty elektrostatyczne.**

Złożony, nieliniowy problem – każdy krok czasowy wymaga uwzględnienia nie tylko oddziaływań hydrodynamicznych (klasyczny model ruchów Browna), ale również wpływu zmian otoczenia nanocząstki (nieizotropowe, zmienne w czasie pole jonowe).

Dodatkowe (niehydrodynamiczne) efekty znacznie modyfikują klasyczny obraz współczynnika dyfuzji dla nanocząstek. Powszechne użycie tzw. zastępczego wymiaru (promień hydrodynamiczny) – ale czy to wystarcza?

Ruch Browna nanocząstki wpływ kinematycznych warunków brzegowych



Slip length λ – wartość poślizgu w skali molekularnej, eksperymenty: 0 - 1000nm (?)

Hydrodynamiczne efekty poślizgu na powierzchni cząstki i na ściankach modyfikują klasyczny obraz współczynnika dyfuzji dla nanocząstek. Nieizotropowa dyfuzja w pobliżu ścianki (h).

$$D_{\perp} = \beta_{\perp} * D,$$

$$D_{\parallel} = \beta_{\parallel} * D,$$

$$Kn = \frac{\lambda}{h}$$

$$\beta_{\perp} = 1 - \frac{3d_p}{8h} [1 + 2I(Kn)] + O\left(\frac{d_p^3}{8h^3}\right),$$

$$\beta_{\parallel} = 1 - \frac{3d_p}{16h} [1 + 2J(Kn)] + O\left(\frac{d_p^3}{8h^3}\right),$$

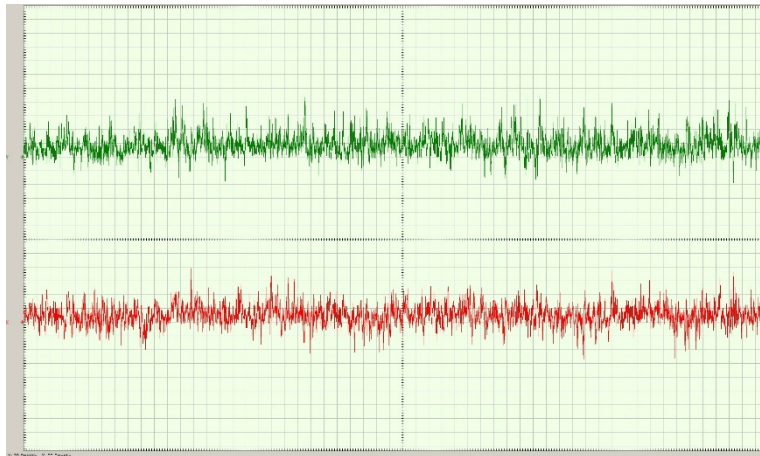
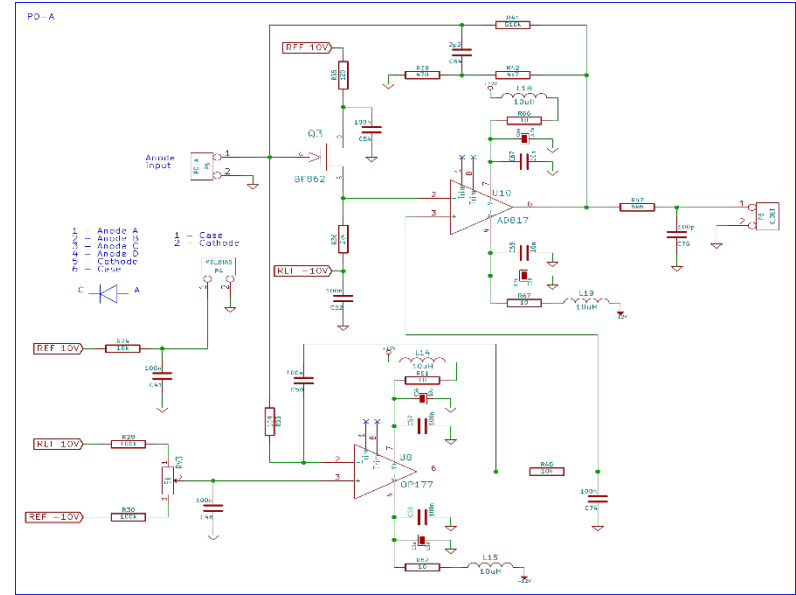
SZCZYPCE OPTYCZNE – pomiar sił w skalach pN

QPD Detector



$$S_x = (V_2 + V_4) - (V_1 + V_3)$$

$$S_y = (V_1 + V_2) - (V_3 + V_4)$$



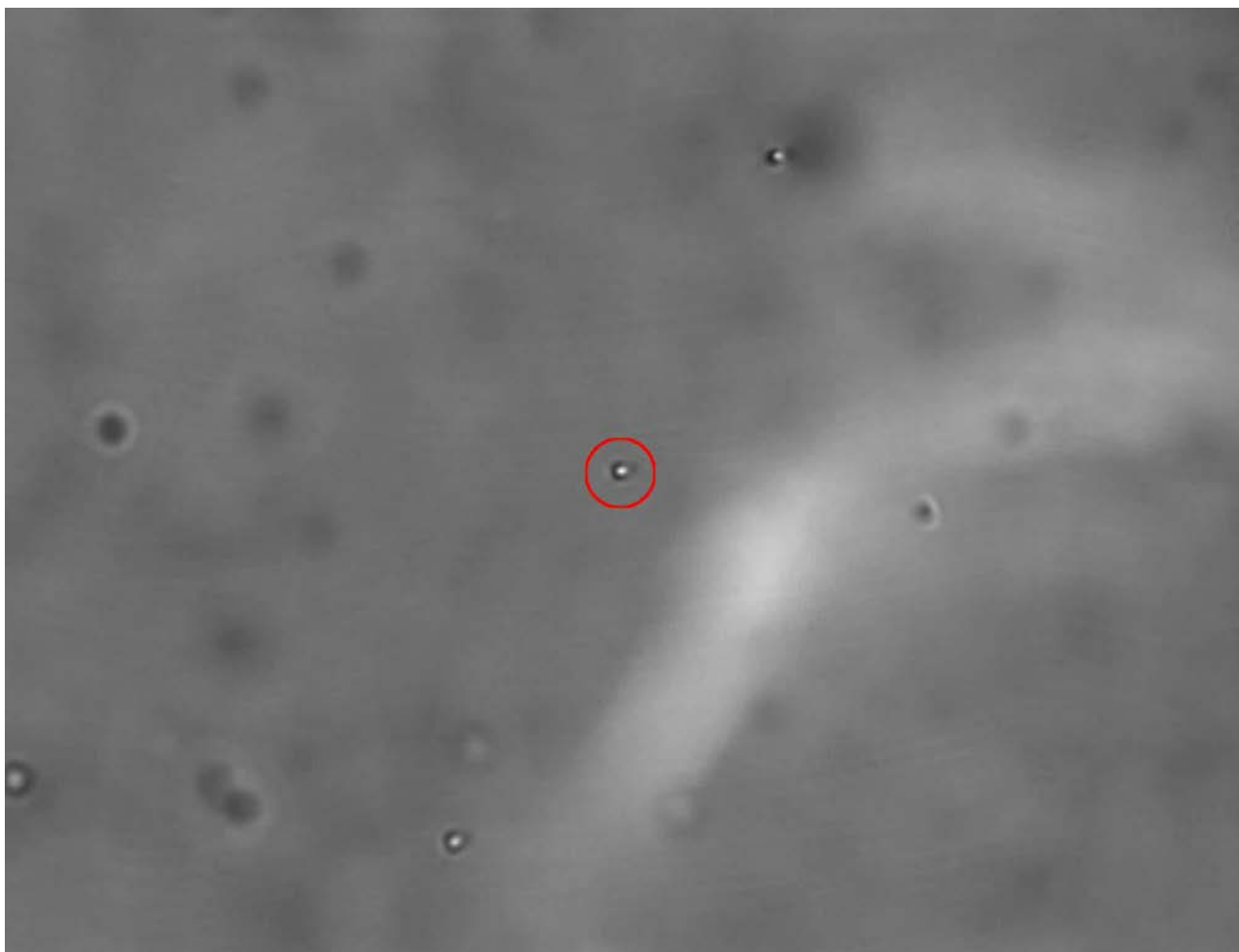
Instrumental noise



Trapped Particle

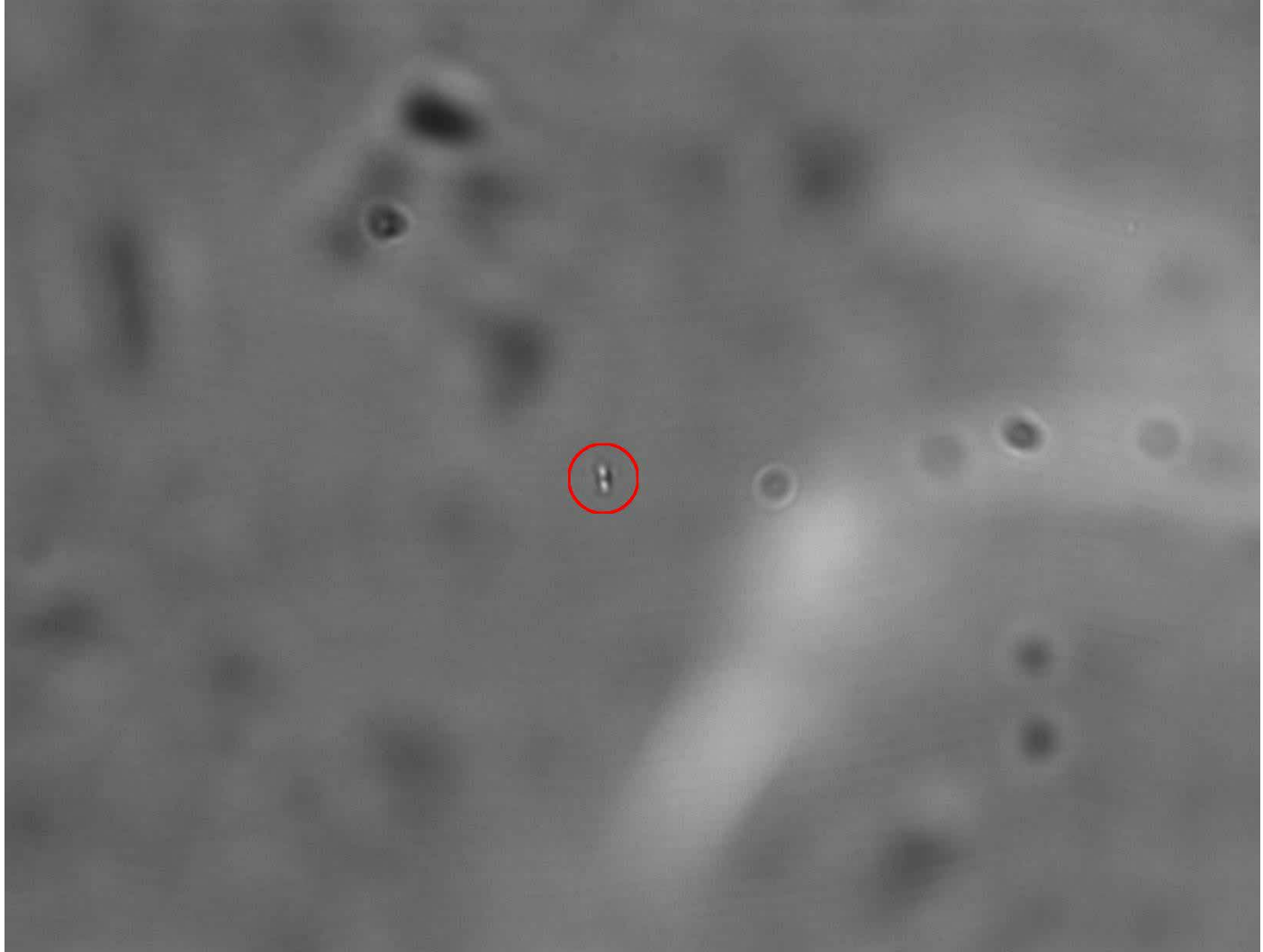
Przemieszczanie nanocząstki w płynie

Movie: Polystyrene 600 nm particle in KCl 10 mM (10 fps)

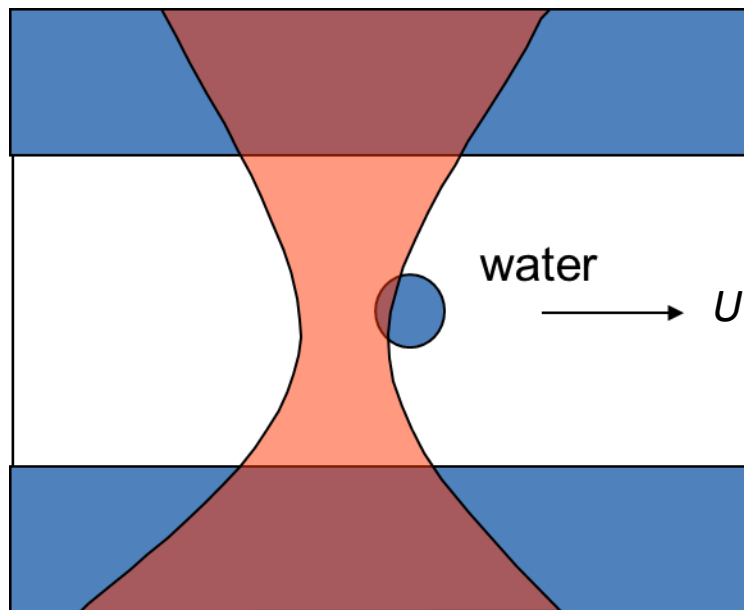
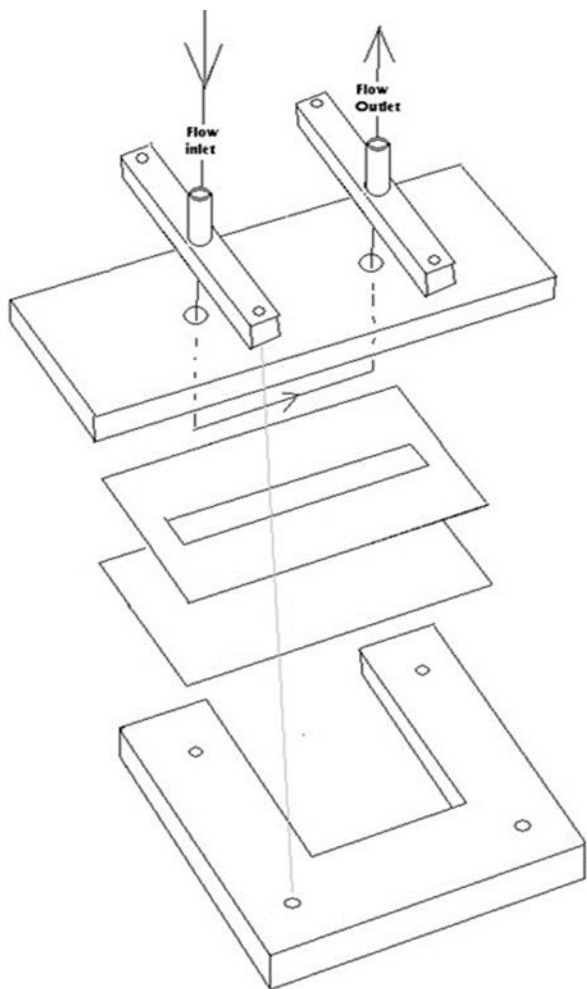


Przemieszczanie włókienka

Movie: Polyacrylamide fiber (length: $2\mu\text{m}$ - diameter: $0,6\mu\text{m}$) in DMF (10 fps)



Przeciąganie nanocząstki w płynie



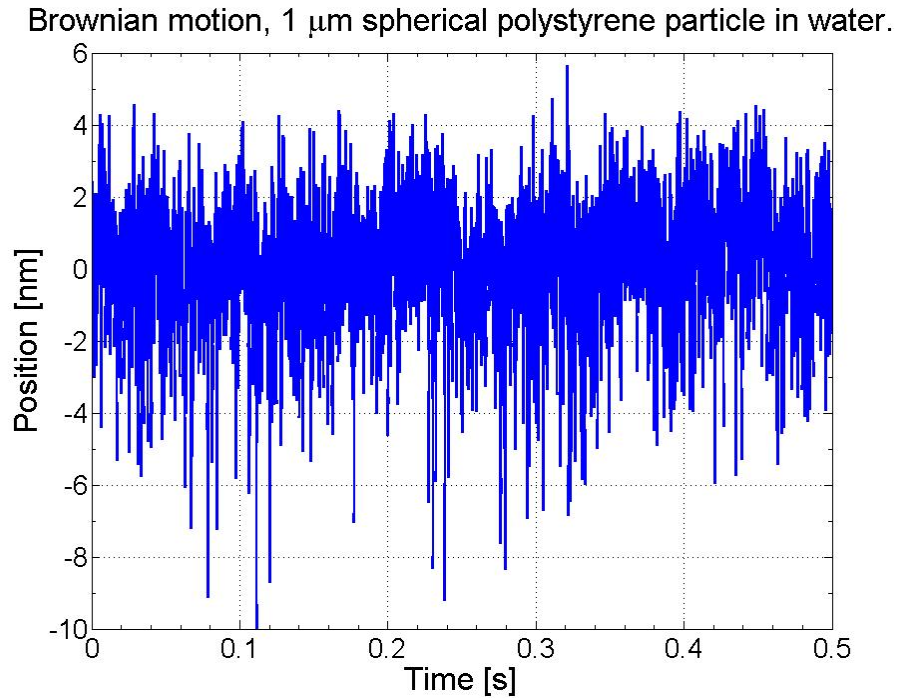
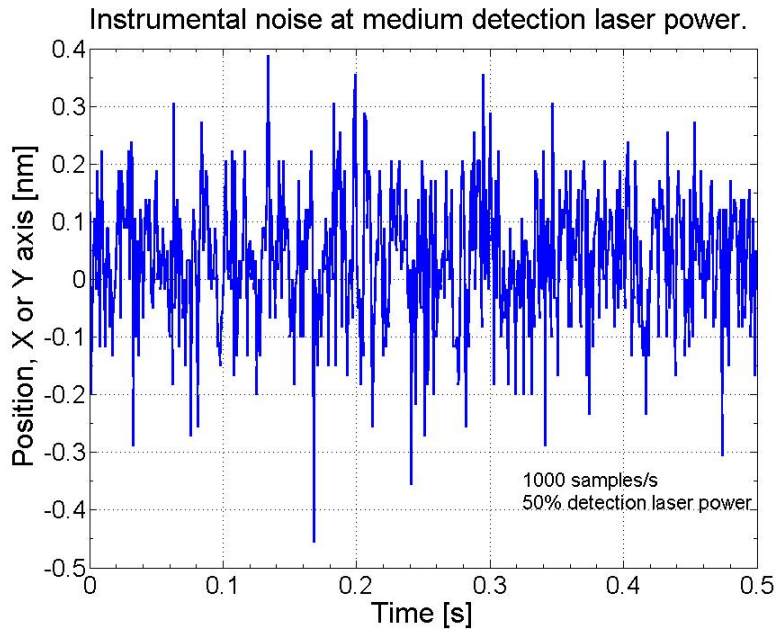
$$F_{drag} = 6\pi\eta rU$$

$$F = kx$$

$$k = \frac{6\pi\eta rU}{x}$$

szttywność pałapki

Ruchy Browna w pułapce



Sygnal elektroniczny: pomiar sztywności pułapki (kalibracja) – lub dla znanej pułapki – pomiar charakterystyk ruchów termicznych nawet w zakresie balistycznym

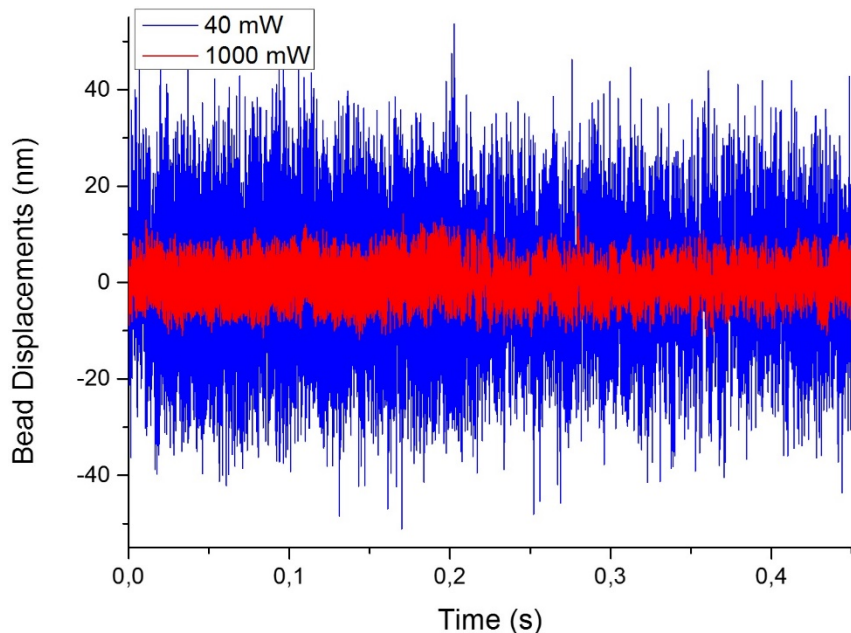
Fluktuacje termiczne w funkcji sztywności pułapki

Equipartition analysis

The Brownian motion which tend to displace the bead stochastically. Its spatial position is well-described by a Gaussian function centred in the focal laser point where the width of the Gaussian curve is associated with the trap stiffness.

The equipartition theorem defines the average translational kinetic energy of a particle for each translational degree of freedom as $\frac{1}{2} k_B T$ where k_B is the Boltzmann constant and T is the absolute temperature. Hence, it is possible to evaluate the trap stiffness (k) by solving the equation:

$k = k_B T / \langle \Delta x^2 \rangle$, where $\langle \Delta x^2 \rangle$ is the statistical variance in the particle position

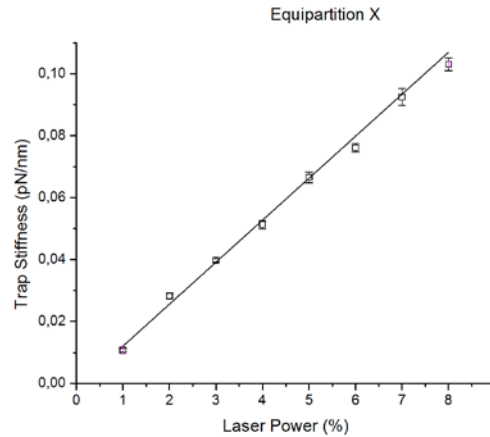
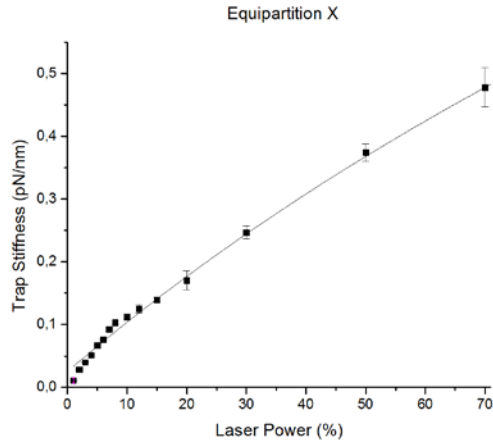


Particle: 1.0 μm diameter polystyrene bead
Trapping laser: 40 mW and 1000 mW
Sampling: 10 kHz

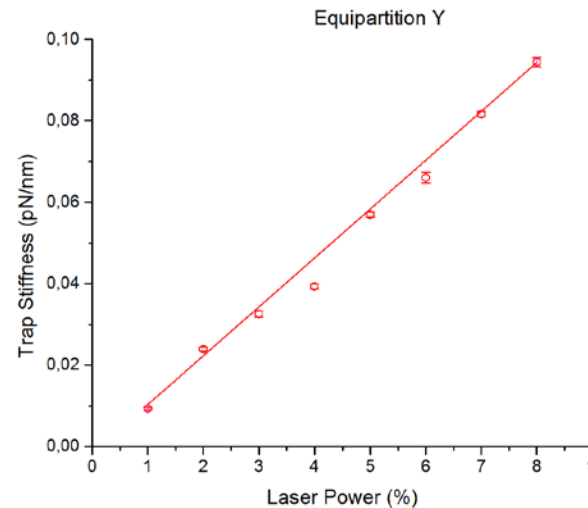
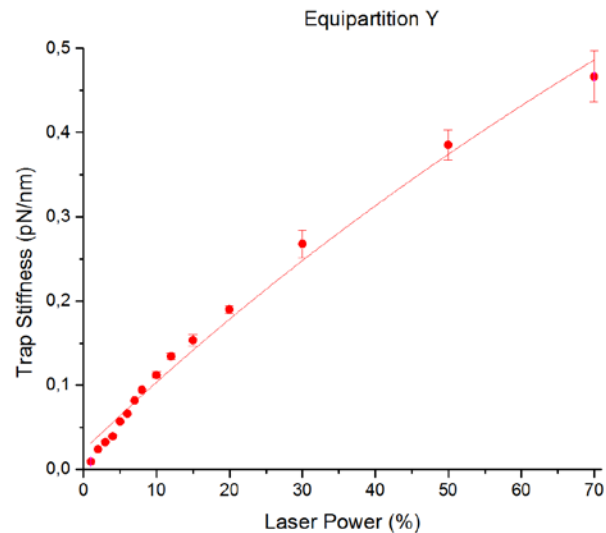
Sztywność pułapki w funkcji mocy lasera

Particle: 1.0 μm diameter polystyrene bead

Trapping laser: from 10 mW to 1400 mW, sampling: 1.0 kHz, track time: 20 s

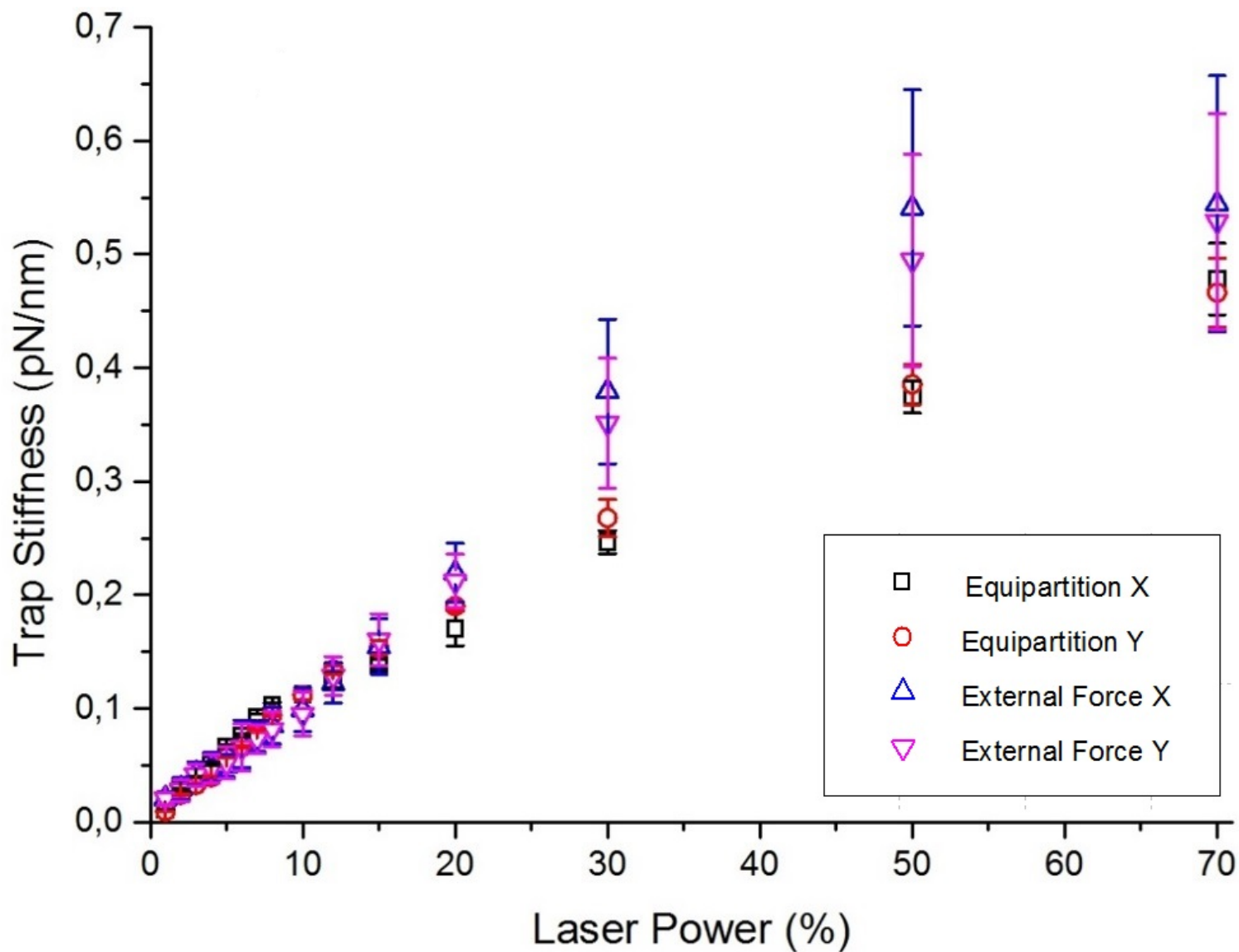


Non-linear correlation over the studied range of trapping laser power



Low standard deviation for the calibration measurements obtained using lower laser power

Porównanie pomiarów sztywności pułapki optycznej



Pułapka optyczna umożliwia analizę transportu „niedyfuzyjnego” – reżim balistyczny

$$t < \tau_p$$

$$\tau_p = M/6\pi\eta R$$

τ_p = czas relaksacji (τ_p dla 1 μm cząstki w wodzie $\sim 10\mu\text{s}$)

M = masa cząstki

η = współczynnik oporu

R = promień cząstki

R. Huang, I. Chavez, K.M. Taute, B. Lukic, S. Jeney, M.G. Raizen and E.-L. Florin, Direct observation of the full transition from ballistic to diffusive Brownian motion in a liquid, Nature Physics, (2011)

P.N. Pusey, Physics. Brownian motion goes ballistic, Science, (2011)

T. Li, M.G. Raizen, Brownian motion at short time scales, Ann.Phys.(Berlin), (2013)

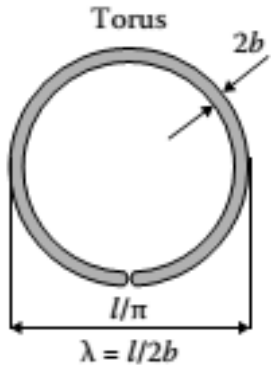
Niesferyczne nano-objekty

- Molekuły biologiczne, białka, DNA
- Polimery
- Mikroorganizmy (bakterie, wirusy)
- Nanorurki, nanowłókna

Wymiar poprzeczny – nanometry – wielowymiarowe ruchy Browna

Oddziaływania hydrodynamiczne, elektrostatyczne, chemiczne, molekularne motorem decydującym od dynamice tych obiektów.

Ruchy Browna plazmidu DNA



Model empiryczny

$$R_h = \frac{l}{2 \left[\frac{11}{12} \ln(2\lambda) - 1.2 \right]}$$

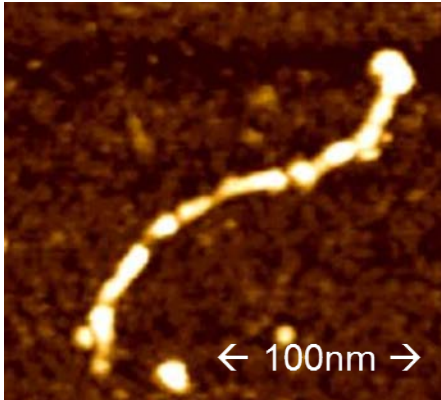
DNA (bp)	L (nm)	B (nm)	lambda = L/2B	Diameter of torus (nm)	Hydrodynamic radius (nm)
5000	1700	2	1700	541,1	133,8
6000	2040	2	2040	649,4	156,4

Rezultat z pomiarów ruchów Browna

Experiment nr	Dominant (nm)	Median (nm)	Mean (nm)
1	155	172	181
2	128	188	213
3	115	393	441
4	110	159	187



Niesferyczne nano-objekty



DNA – długość nawet 2m, średnica 3nm!

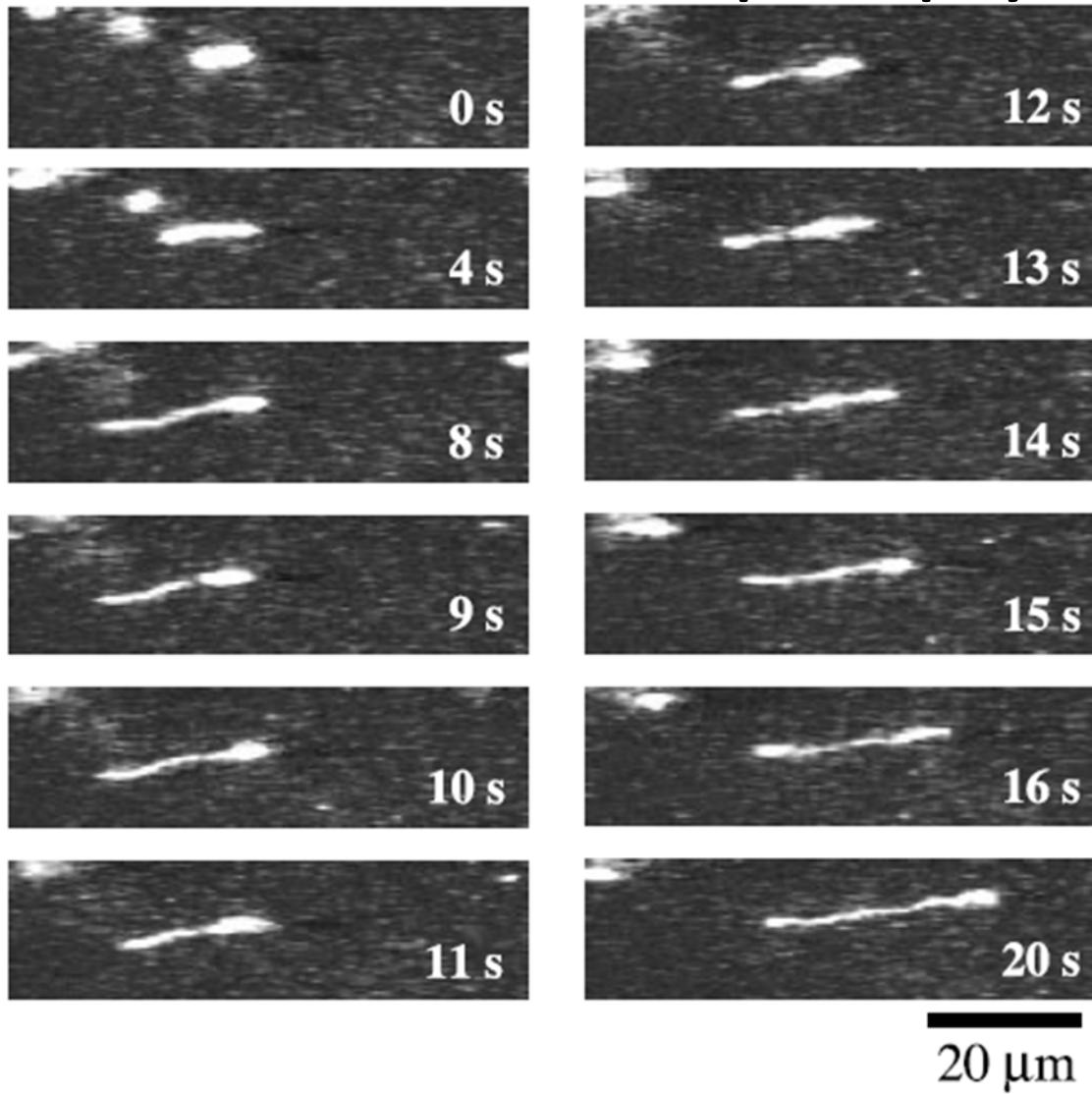


Białka, DNA, wirusy są transportowane przez nanopory błony komórkowej (~5nm). Mechanizm transportu, zwijanie i rozwijanie kłęбка molekularnego.

Rozciąganie i detekcja łańcucha DNA w 10nm nano-porze , A.J. Storm, TU Delft, 2004

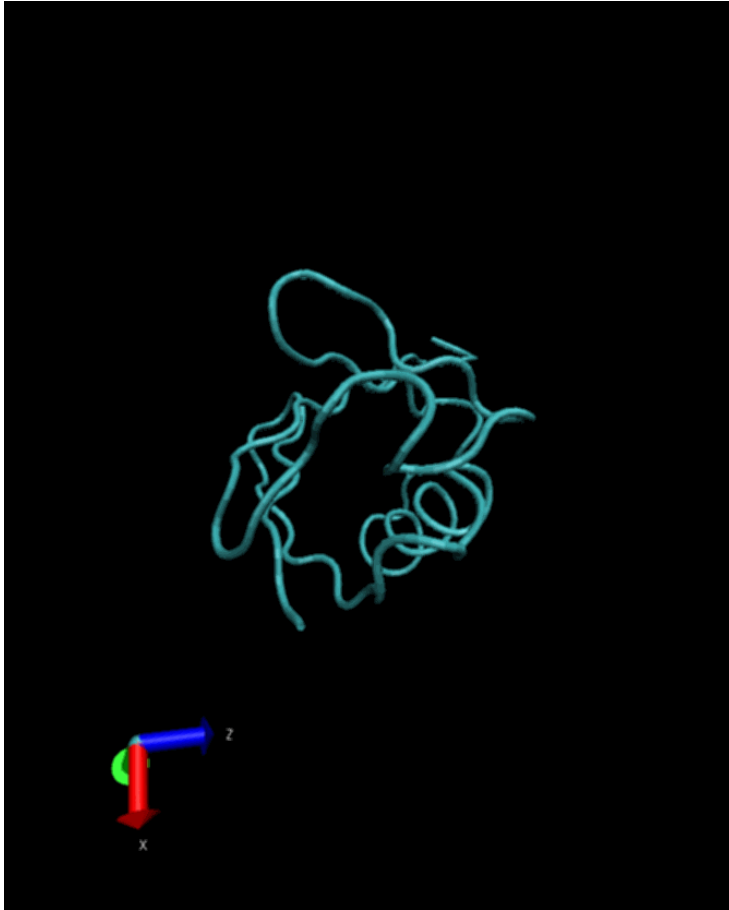


DNA w przepływie



Obrazy fluorescencyjne DNA w przepływie (N. Kaji et al., Biophysical J., 2002)

Modelowanie transportu długich łańcuchów białka i DNA



$$\Delta x = \text{nm} , \Delta x = \text{nm}$$

MD –LAMMPS (A. Słowicka 2010)

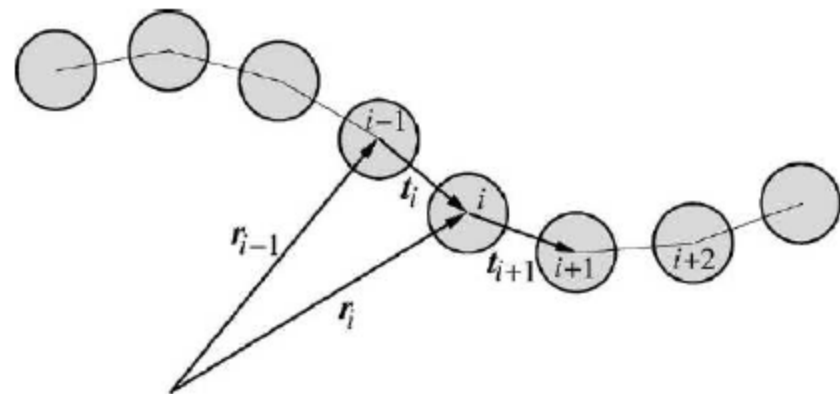
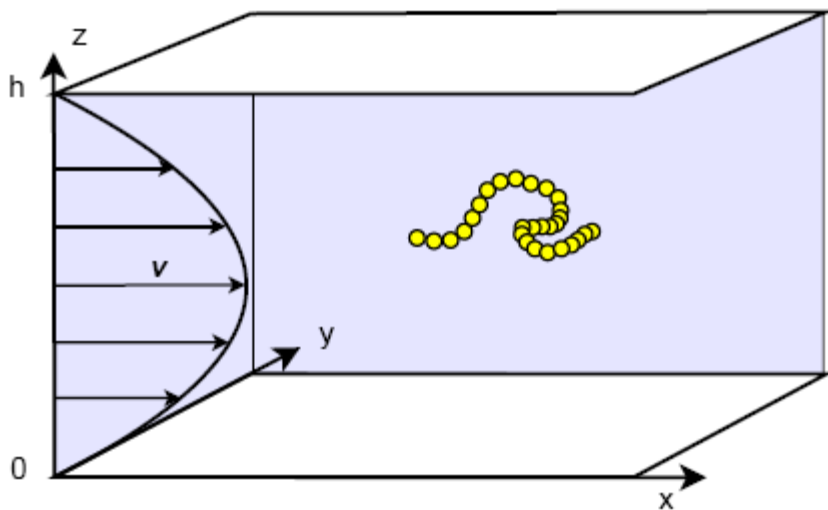
FENNE (J. Czerwińska 2011)

Jaka jest rola oddziaływań hydrodynamicznych?

Hydrodynamika

$$\eta \nabla^2 \mathbf{v} - \nabla p = \mathbf{0},$$
$$\nabla \cdot \mathbf{v} = 0,$$

Przepływ łańcucha „kuleczek” w przybliżeniu Stokes’a



Model vs. eksperyment

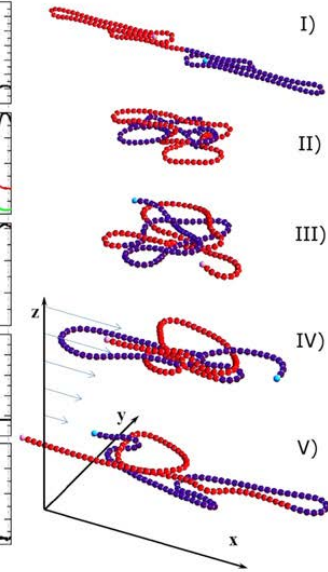
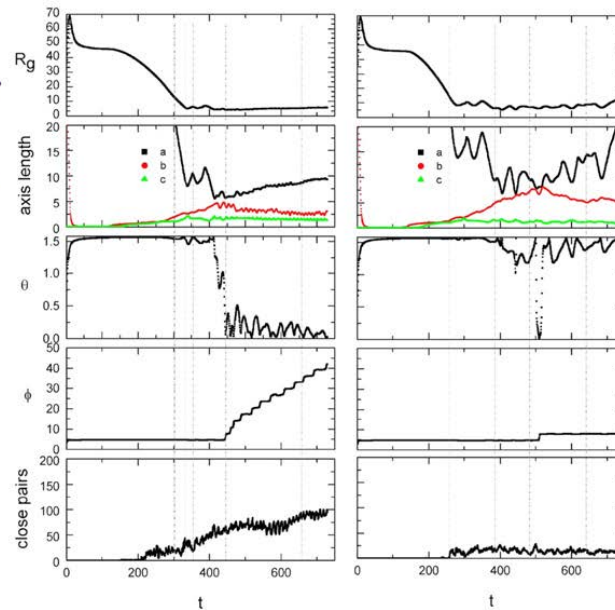
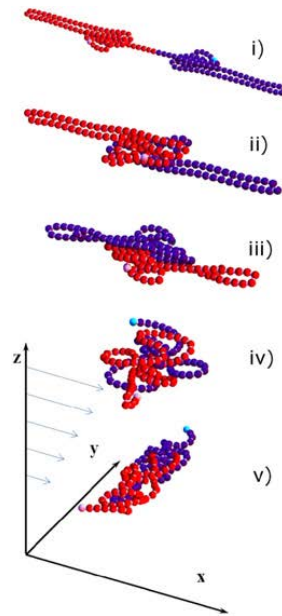
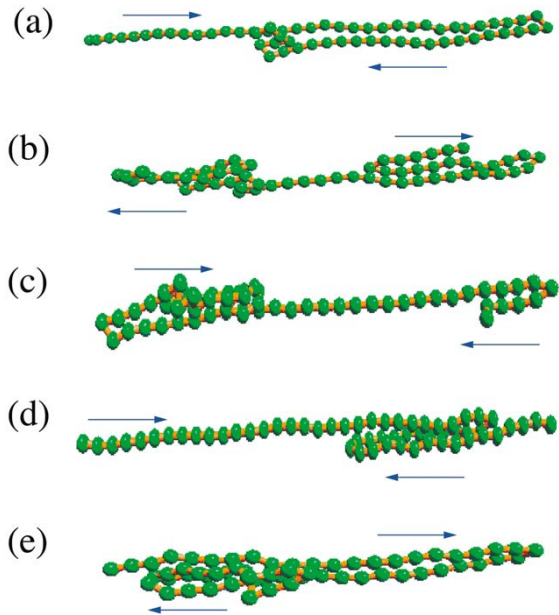


Model hydrodynamiczny (Sadlej et al. 2010)



Obserwowany ruch nanowłókien polimerowych – daleki od modelu hydrodynamicznego

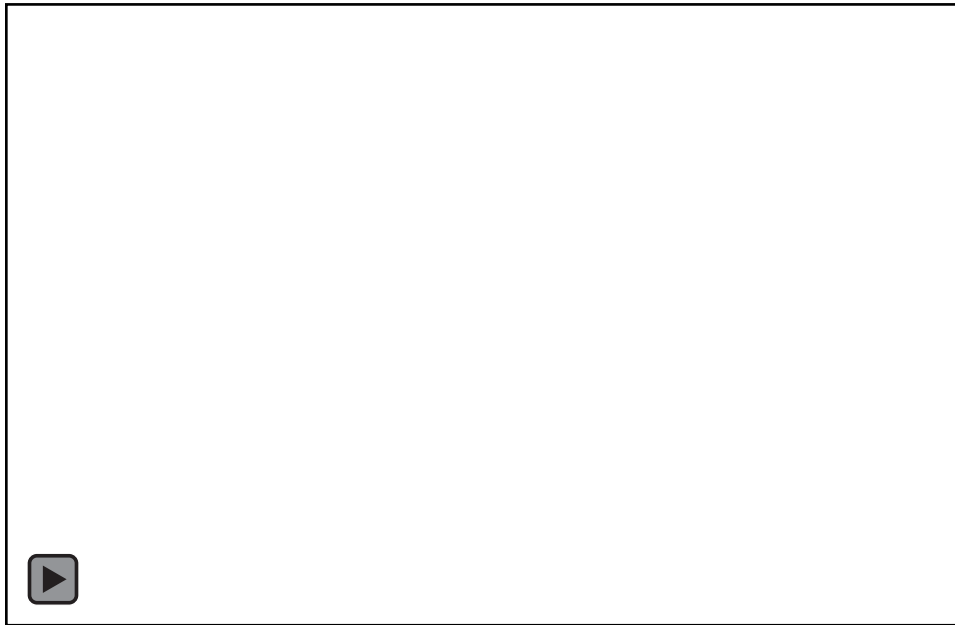
Hydrodynamika Symulacje



Brownian dynamics simulations
of bead-rod-chain in shear flow
Liu et al. 2004

Dynamics and topology of a flexible chain:
knots in steady shear flow
Kuei, Slowicka et al. 2015

Silnie deformowalne włókienka z materiału żelowego



Złożony opis dyfuzji:

$D_{\text{translacyjne}}(x, y, z)$

$D_{\text{rotacyjne}}(\theta, \phi)$

$D_{\text{deformacji}}(\dots)$

+ definicja mobilności

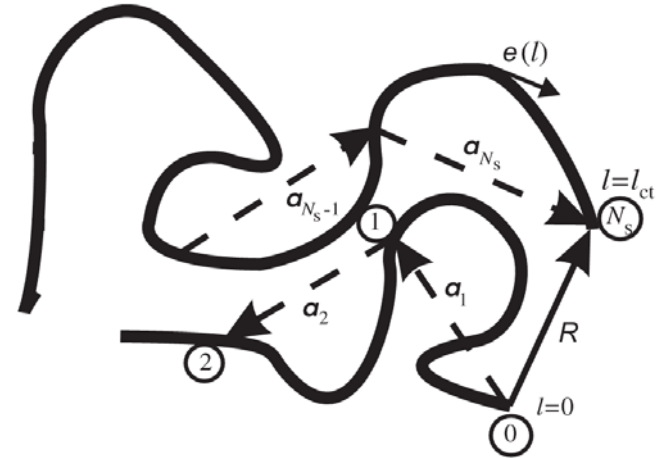
Ruchy Browna rejestrowane dla odcinka hydrożelowego włókienka $0,5 \times 10 \mu\text{m}$. Obraz fluorescencyjny, mikroskop konfokalny (kolor koduje pozycje z).

Wyznaczenie parametrów mechanicznych

Thermal fluctuations

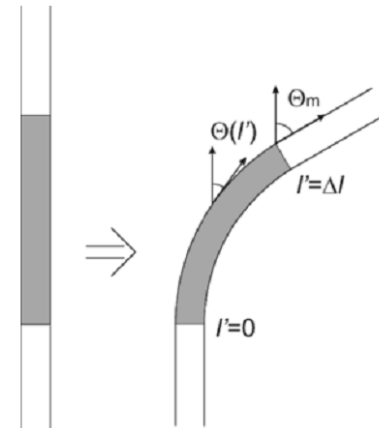
Persistence length

$$L_p = \frac{EI}{k_B T}$$

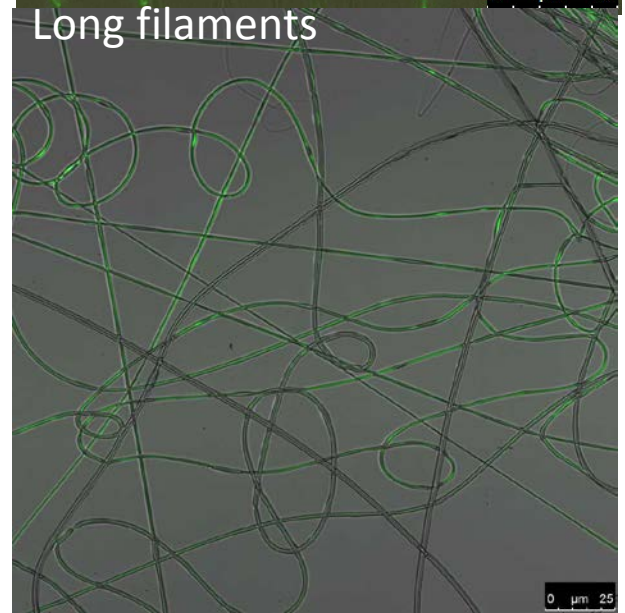
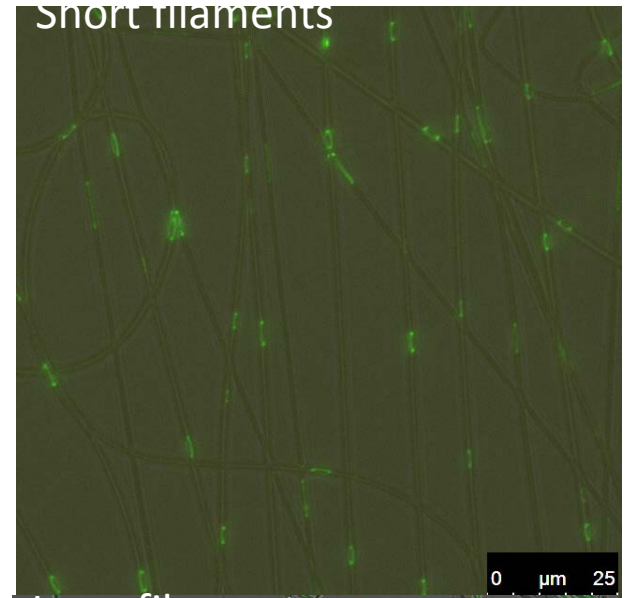
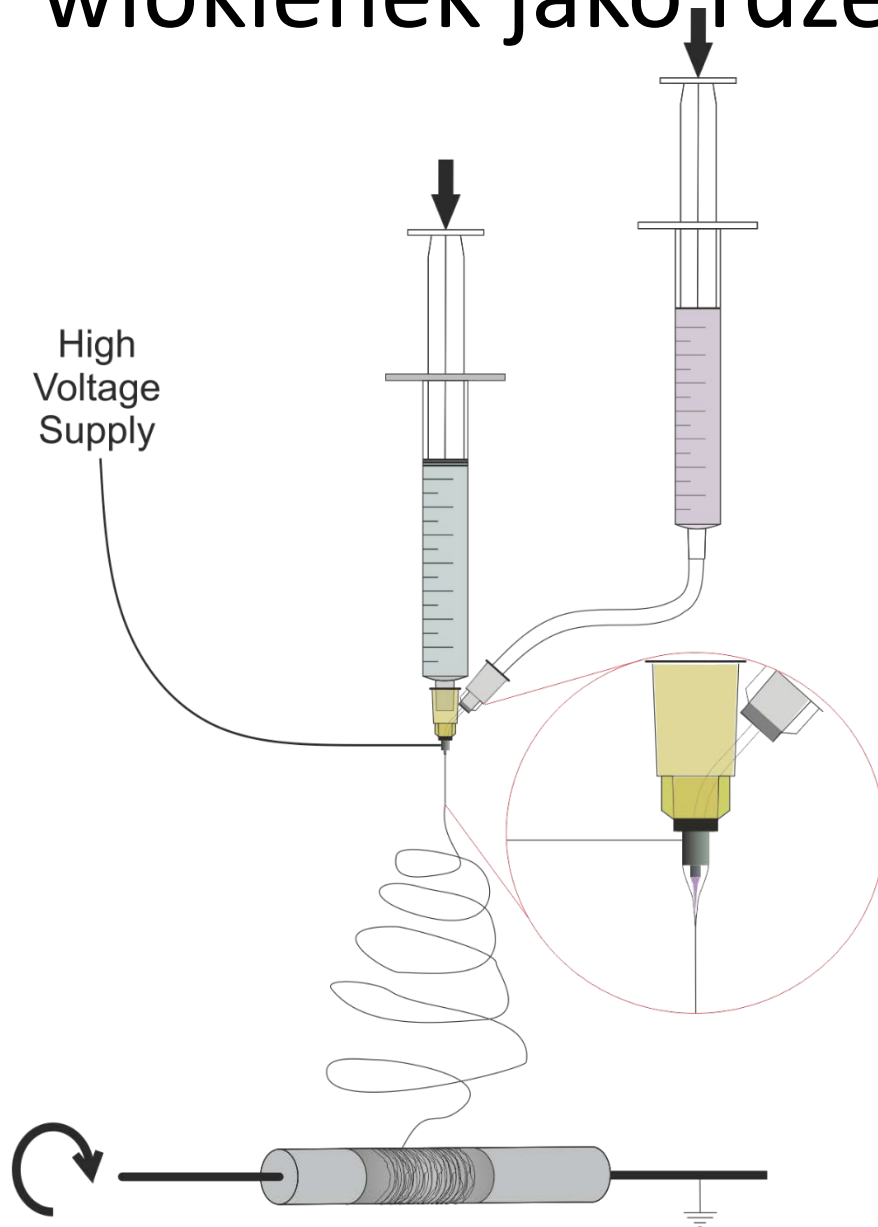


Cosine correlation method

$$\langle \cos \theta(s) \rangle = e^{-L/2L_p}$$



Elektroprzędzenie hydrożelowych włókienek jako rdzenia nanowłókien



Ruchy Browna włókienek hydrożelowych

Contour length: $15.6 \mu\text{m}$

Persistence length: $598 \mu\text{m}$

Experimental diffusion coefficients:

$$D_a = 0.266 \mu\text{m}^2$$

$$D_b = 0.070 \mu\text{m}^2$$

$$D_{\text{rot}} = 0.0023 \text{ rad}^2$$

Theoretical diffusion coefficients:

$$D_a = 0.182 \mu\text{m}^2$$

$$D_b = 0.116 \mu\text{m}^2$$

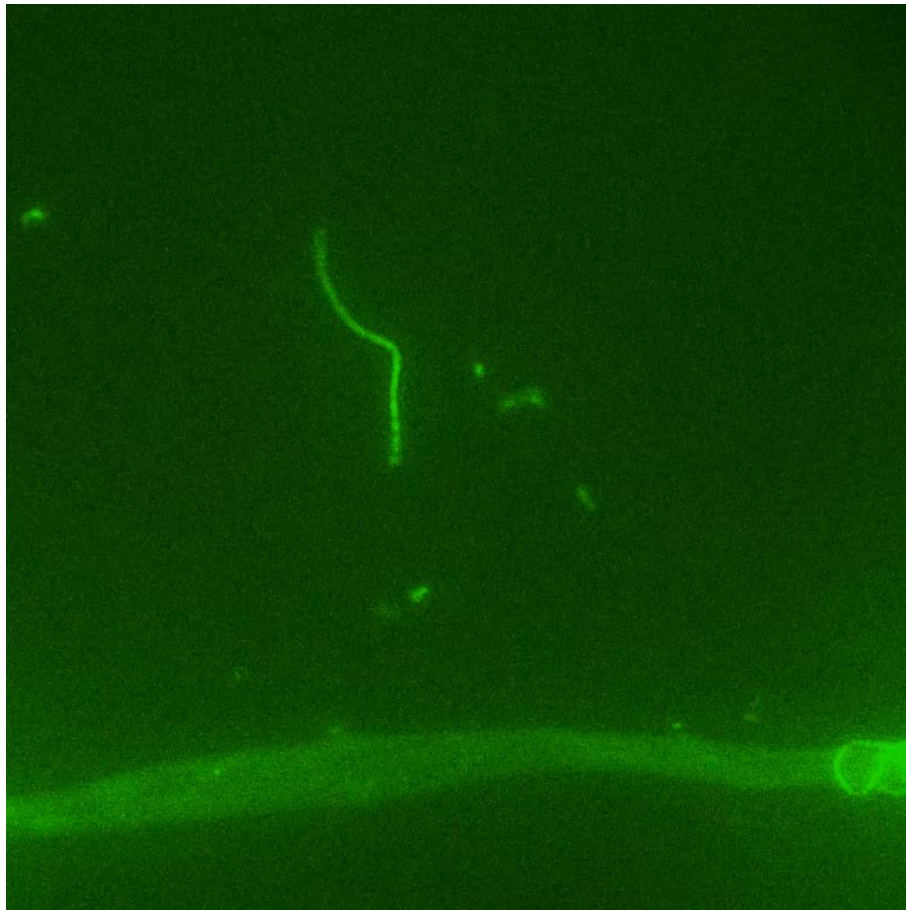
$$D_{\text{rot}} = 0.0044 \text{ rad}^2$$



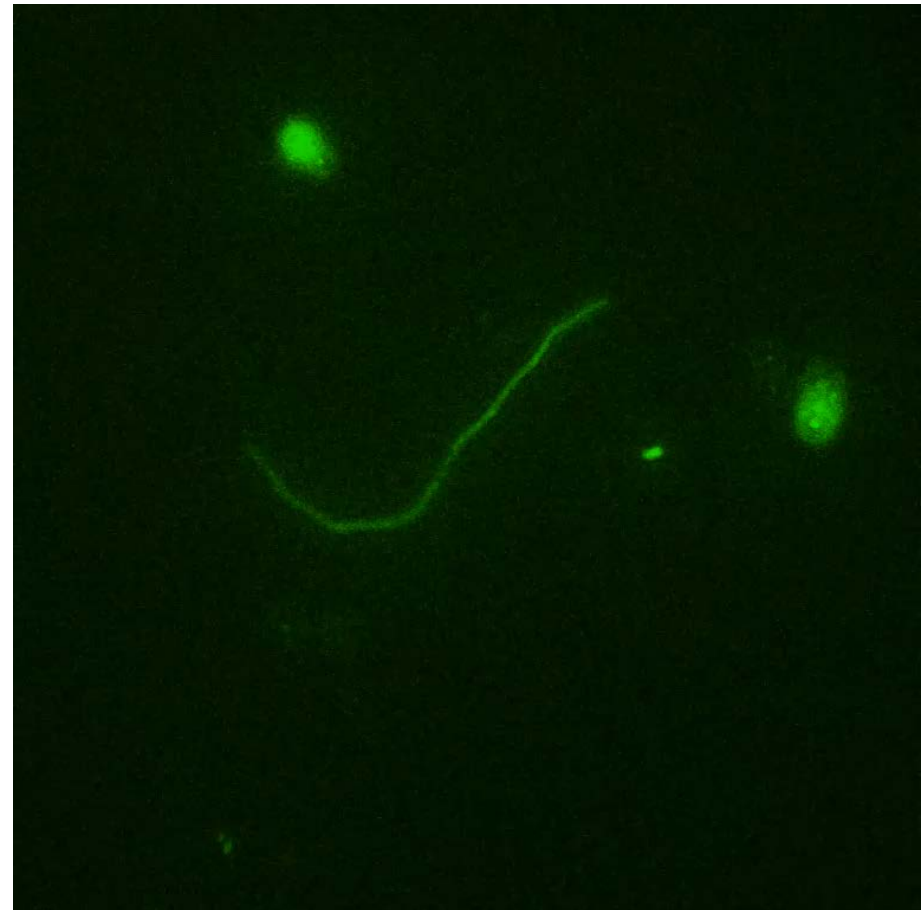
Bending dynamics of nanofilaments

thermal fluctuations

Contour length: 42.3 μm
Persistence length: 31 μm

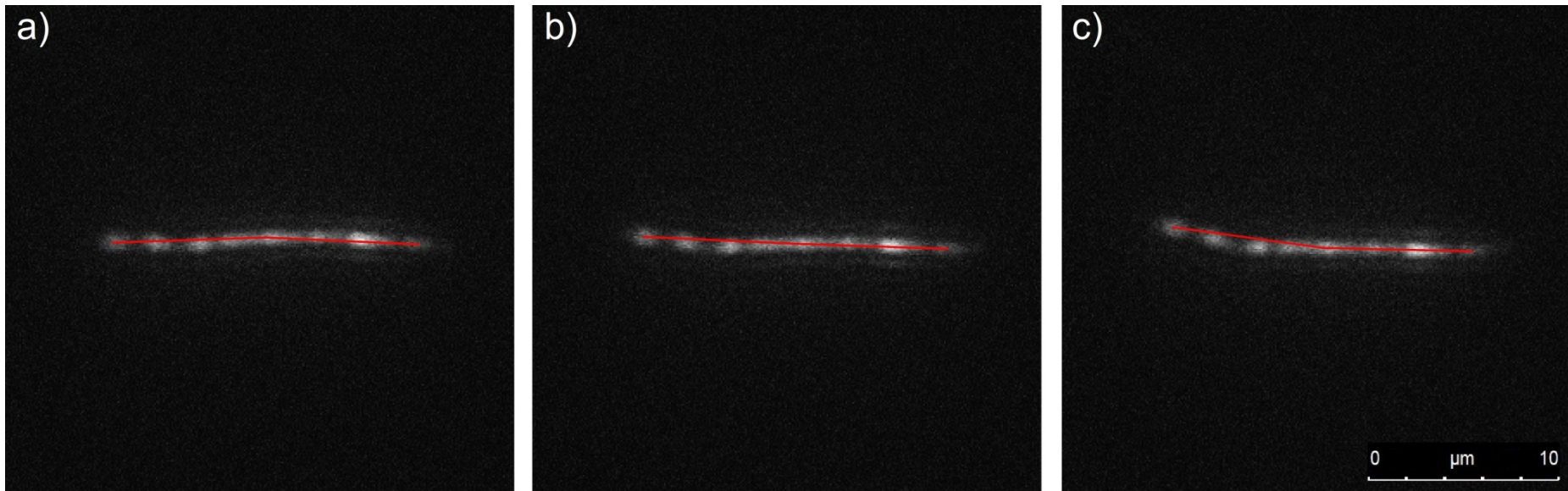


Contour length: 126.1 μm
Persistence length: 56 μm



Bending dynamics of nanofilaments

Bending dynamics of a nanofilament of contour length $21.5 \mu\text{m}$. Red lines indicate arms of the fibre starting from the centre of the fibre mass. The angle between the red lines was measured to assess flexibility. The time interval between frames is $t = 0.25 \text{ s}$.

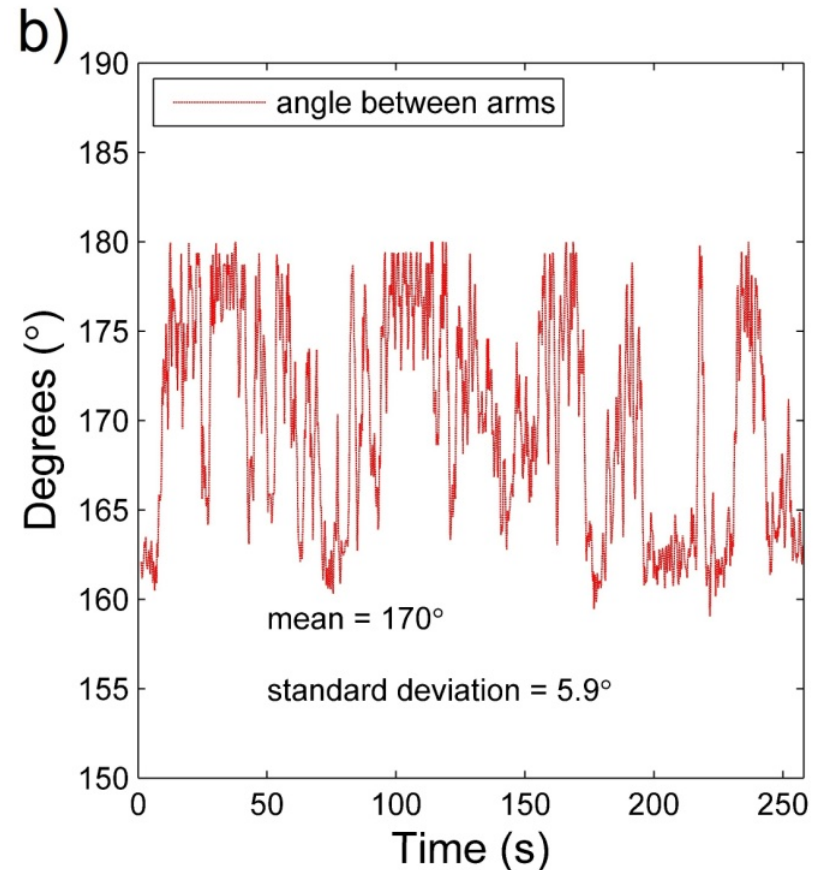
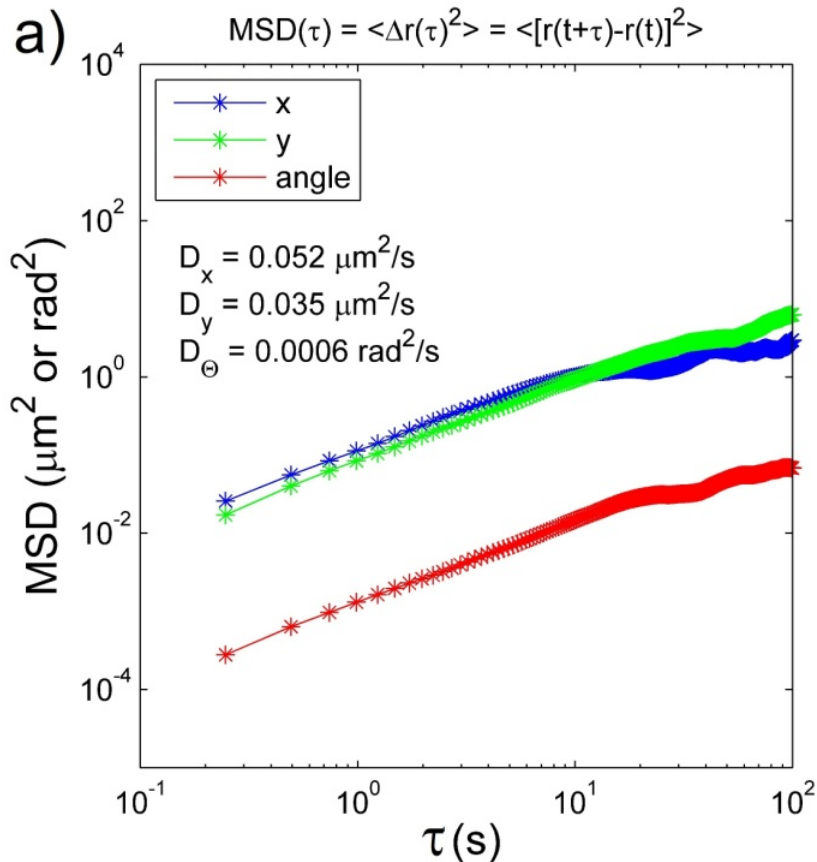




Quantitative assessment of bending dynamics

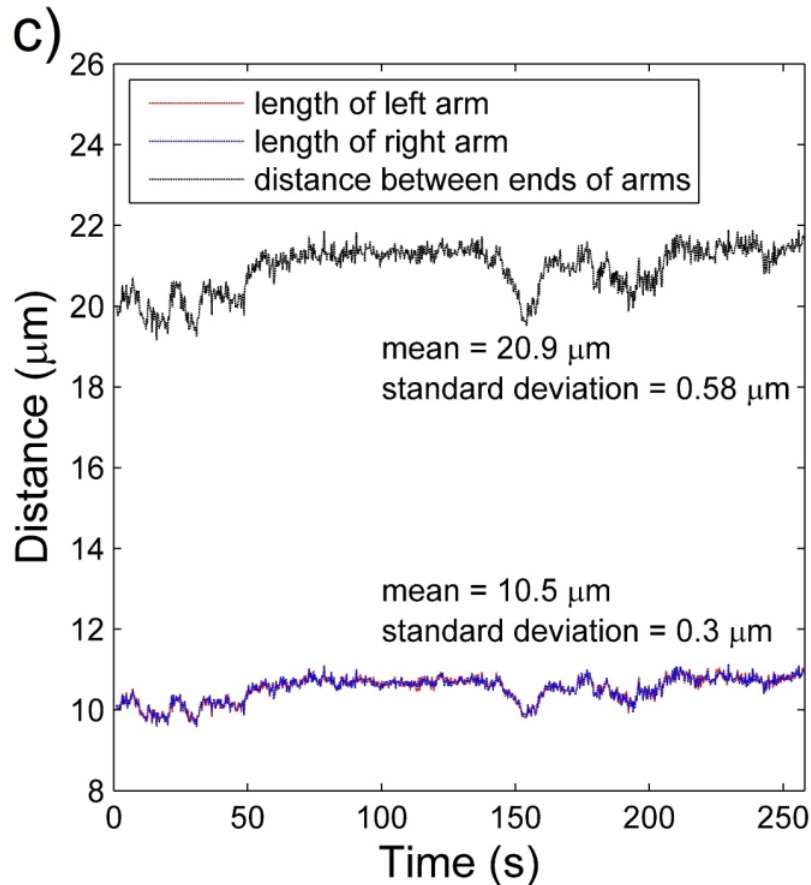
Mean square displacement of a filament of contour length $21.5 \mu\text{m}$ as a function of lag time.

Angle between arms of the bending filament as a function of time.

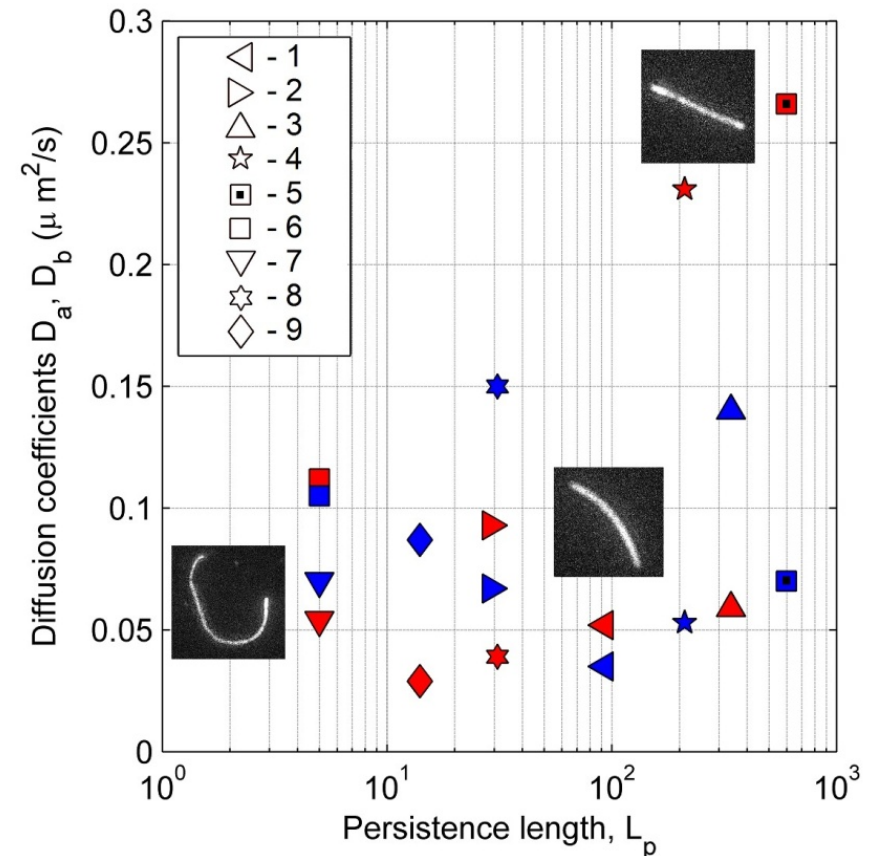


Quantitative assessment of bending dynamics

Length of left and right arm of the bending filament, and distance between both ends of the arms.



Diffusion coefficient D_a (red symbols) and D_b (black symbols) as a function of persistence length for nine analysed filaments.

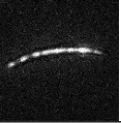

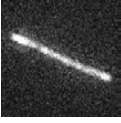
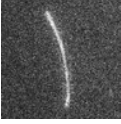

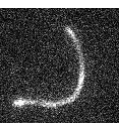

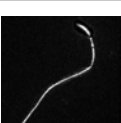
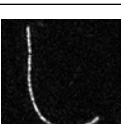


Teoria:
Dyfuzja ellipsoidy

$$D_a = \frac{k_B T [\ln(L/R) - 0.5]}{2\pi\eta_s L}$$

$$D_b = \frac{k_B T [\ln(L/R) + 0.5]}{4\pi\eta_s L}$$

$$D_\vartheta = \frac{3k_B T [\ln(L/R) - 0.5]}{\pi\eta_s L^3}$$

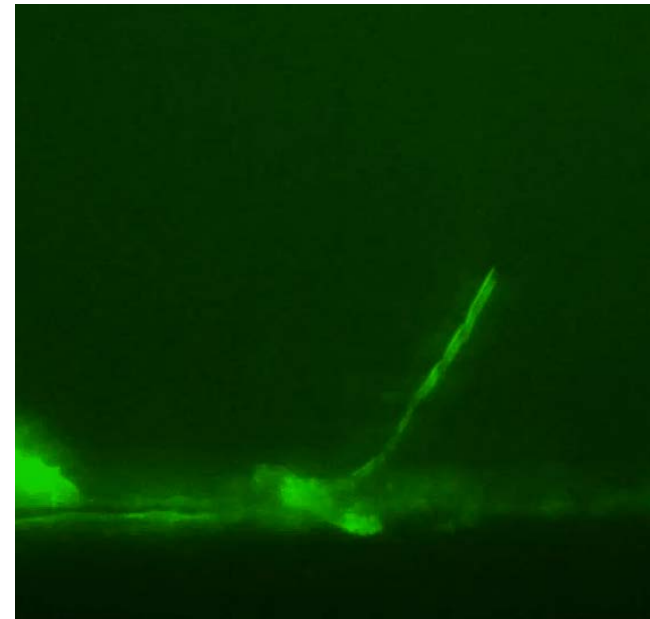
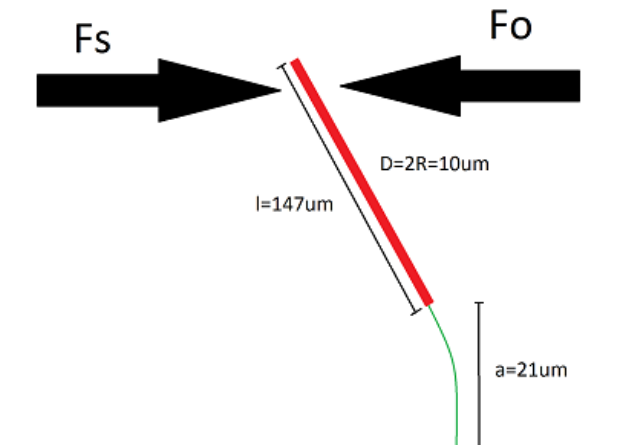
	L/D	D _a (m ²)	D _b (m ²)	D (rad ²)	L (m)	Motion	Shape
exper.	43.0	0.052	0.035	0.0006	21.5	Bending	
theor.	43.0	0.144	0.090	0.0019			
exper.	31.2	0.093	0.067	0.0025	15.6	Rotation	
theor.	31.2	0.182	0.116	0.0045			
exper.	29.8	0.059	0.140	0.0029	14.9	Rotation	
theor.	29.8	0.189	0.121	0.0051			
exper.	47.8	0.231	0.053	0.0005	23.9	Bending	
theor.	47.8	0.133	0.083	0.0014			
exper.	31.4	0.266	0.070	0.0023	15.6	Rotation	
theor.	31.4	0.182	0.116	0.0044			
exper.	48.4	0.112	0.105	0.0026	24.2	Bending	
theor.	48.4	0.132	0.082	0.0013			
exper.	104.8	0.054	0.070	0.0005	52.4	Bending	
theor.	104.8	0.072	0.044	0.0002			
exper.	171.0	0.039	0.150	0.00005	85.5	Bending	
theor.	171.0	0.049	0.029	0.00004			
exper.	105.6	0.029	0.087	0.0002	52.8	Bending	
theor.	105.6	0.072	0.043	0.0002			

Wyznaczenie parametrów mechanicznych

Hydrodynamic interactions

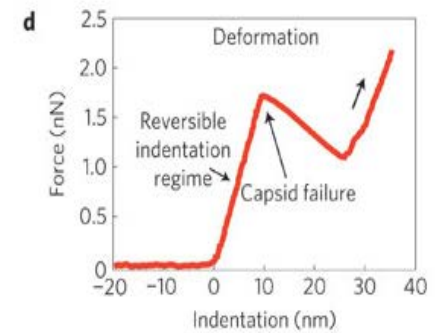
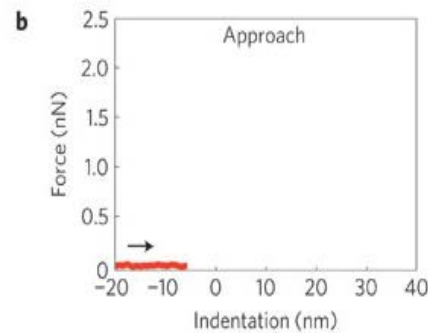
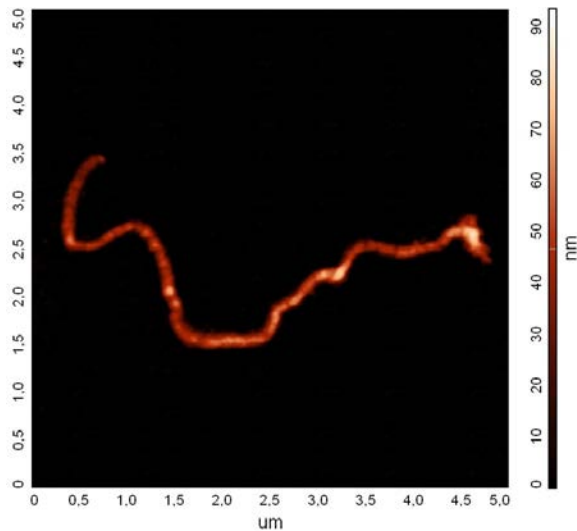
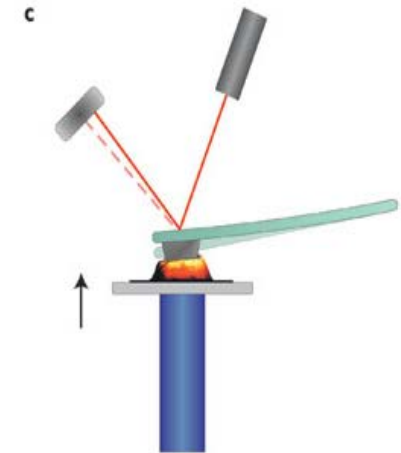
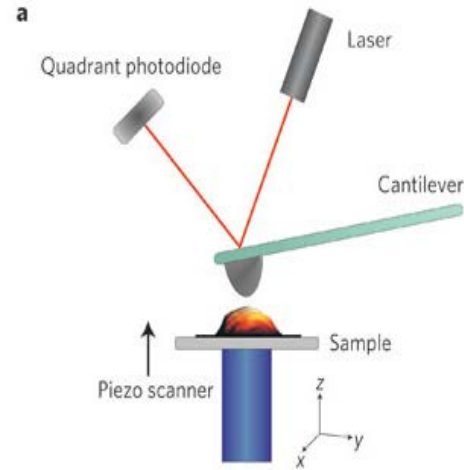
$$F_e - F_d = m \cdot a \quad F_e = k \cdot \Delta x \quad F_d = C_D \frac{\rho U^2}{2} A$$

$$C_D = \frac{5.97}{\sqrt{\frac{U(r) \cdot 2R}{\nu}}} + 1.17 \quad F_d = \int_0^l \left[\frac{5.97}{\sqrt{\frac{U(r) \cdot 2R}{\nu}}} + 1.17 \right] \cdot \frac{\rho U(r)^2}{2} \cdot R \cdot l \cdot dr$$



Wyznaczenie parametrów mechanicznych

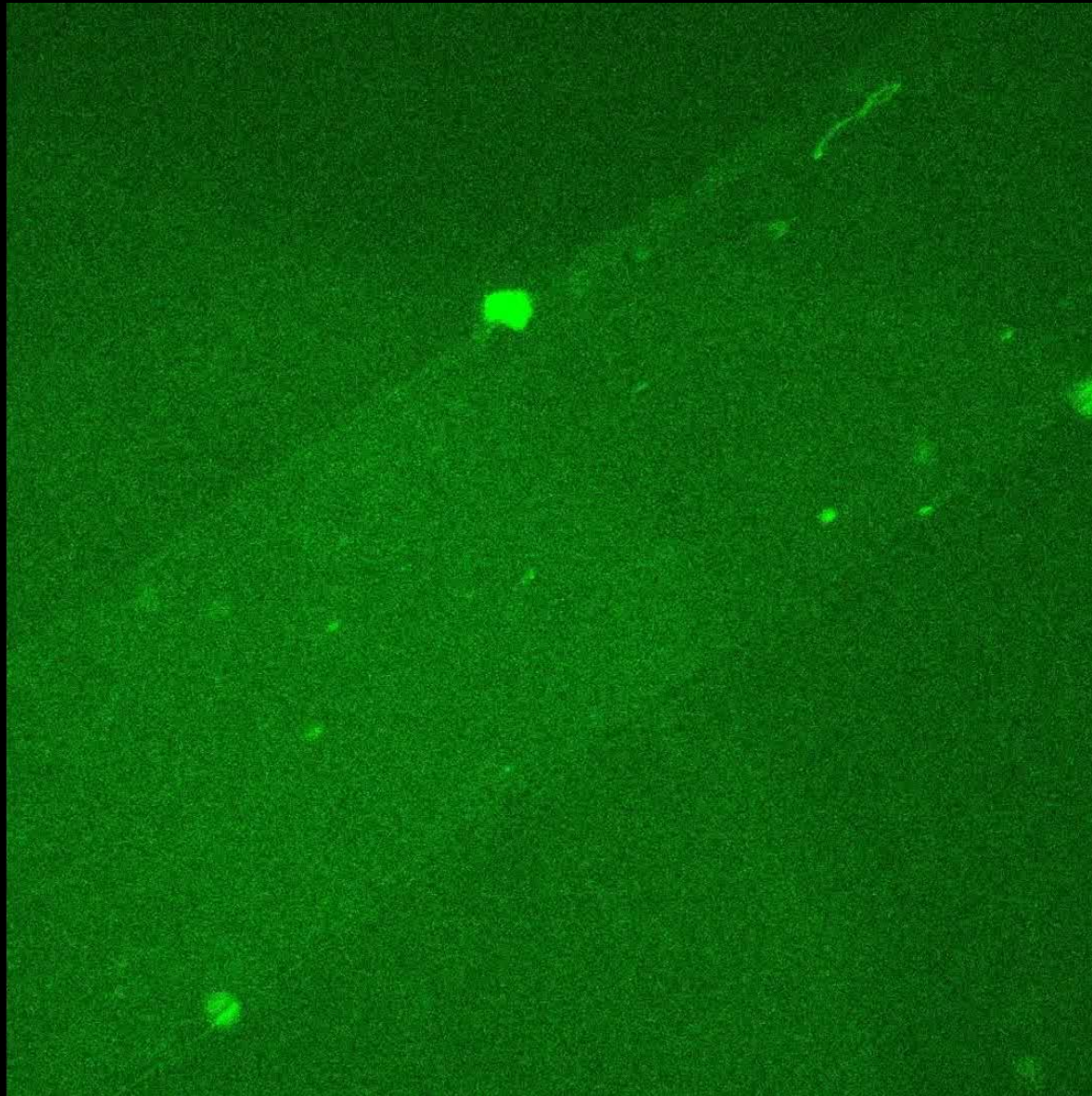
AFM nanoindentation



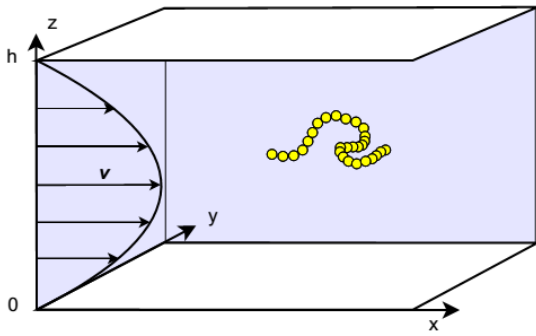
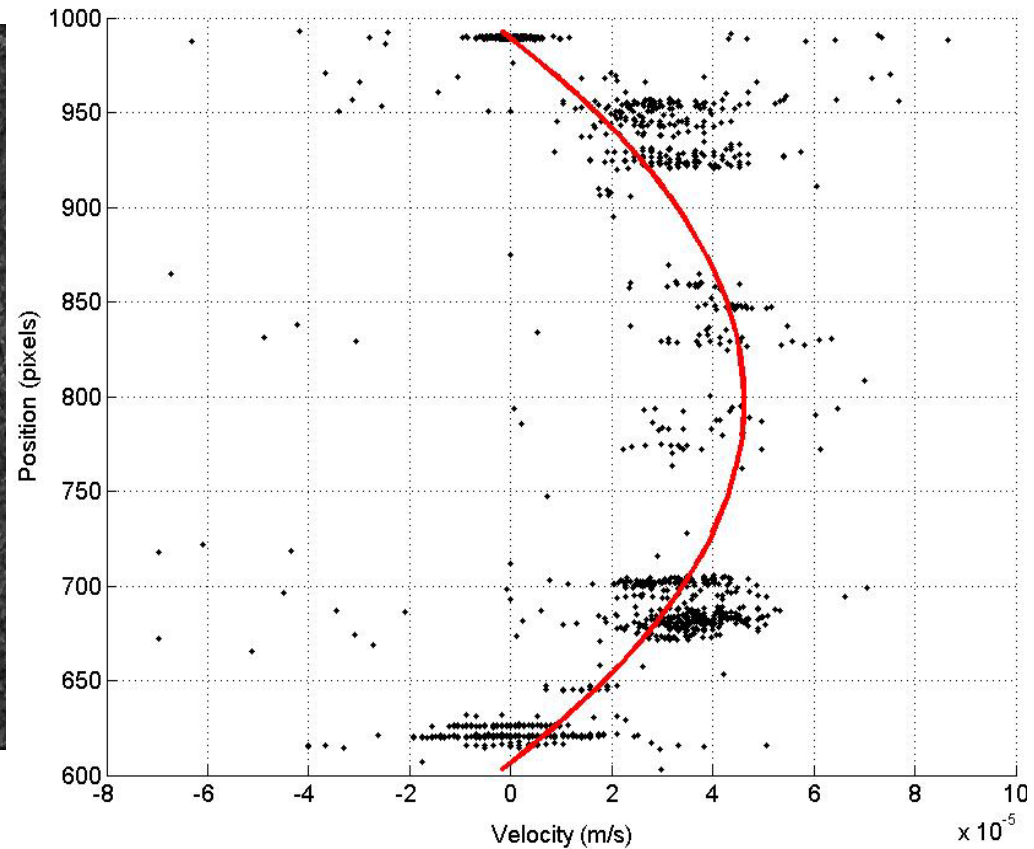
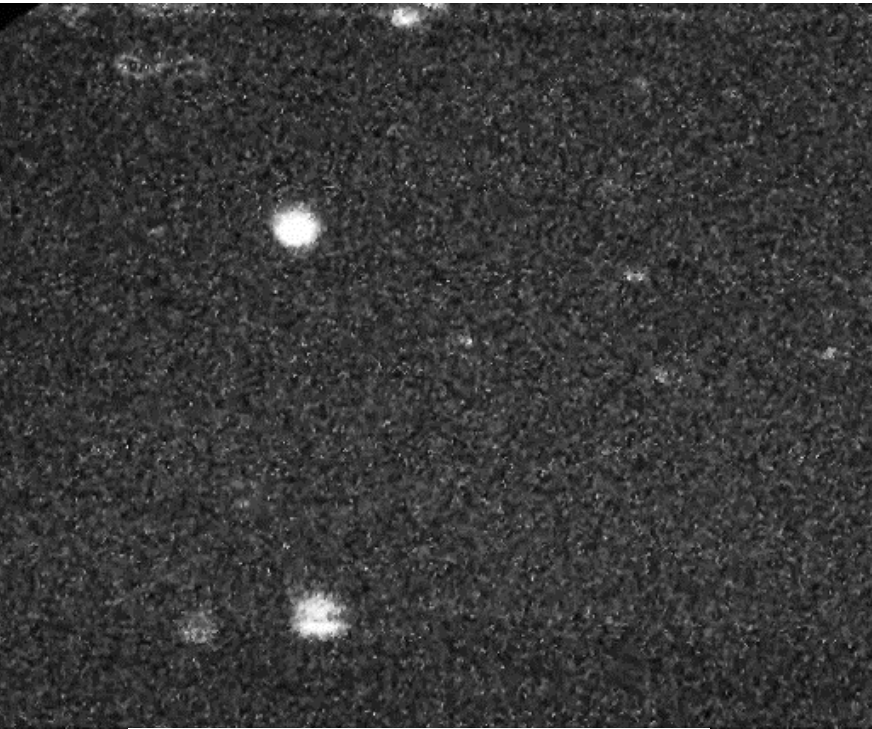
Właściwości mechaniczne włókienek hydrożelowych

Monomer mass ratio	Young modulus E (kPa)		
	AFM indentation	Cosine correlation	Flow
NIPAAm:BIS-AAm			
37.5:1	—	4.5±0.4	2.3
20:1	8.50±1.19	3.1±1.7	—
4:1	18.11±4.85	3.8±1.1	—
AAm:BIS-AAm			
37.5:1	4.06±1.18	6.1±2.6	—
20:1	15.80±2.77	5.0±1.1	—
4:1	55.82±5.64	5.8±0.8	—

Włókienka hydrożelowe w przepływie

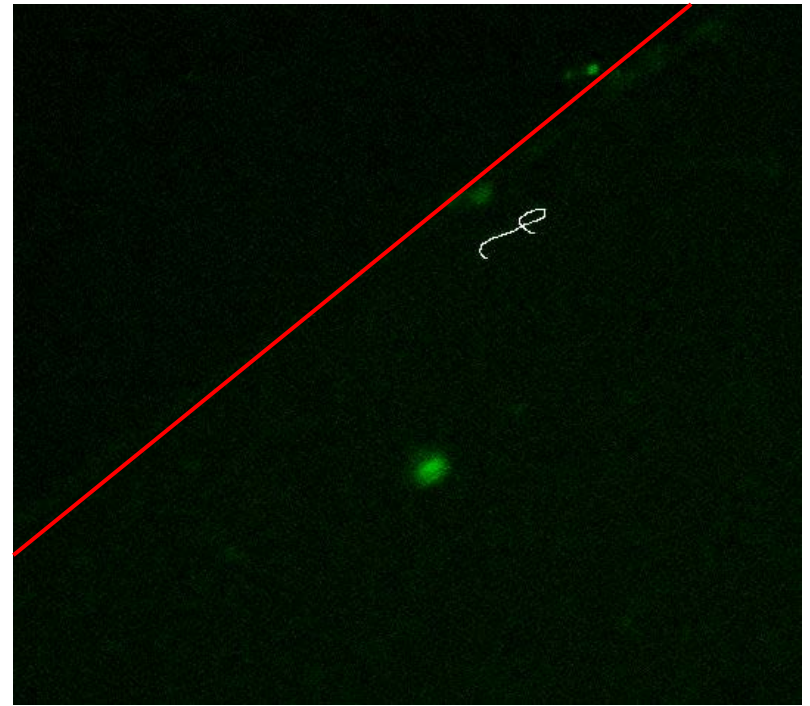
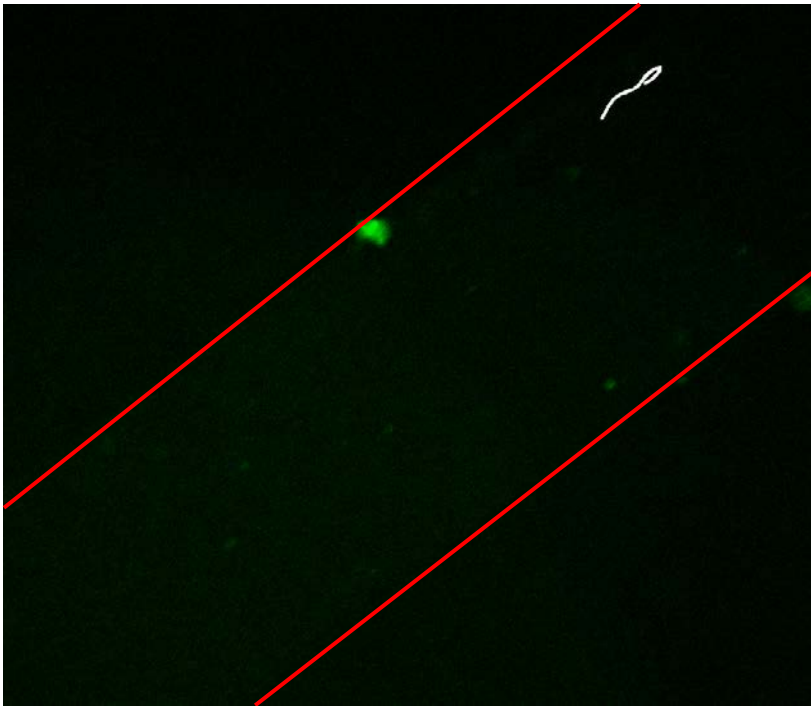


Włókienka hydrożelowe w przepływie ewaluacja



Zwijanie i rozwijanie włókienka hydrożelowego w periodycznym przepływie w kanale

Highly flexible PNIPAAm hydrogel nanofilament in flow



$$U = 45 \mu\text{m/s}, L_c = 25 \mu\text{m}, 2R = 100 \text{nm}, D = 100 \mu\text{m}, \text{Re}_D = 4 \cdot 10^{-3}$$



Dziękujemy za uwagę !

