



SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai Kar, Biológia Intézet
HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biofizikai Intézet

37. OTDK BIOLÓGIA SEKCIÓ

Mikrofluidikai eszköz tervezése baktérium mikrokolóniák vizsgálatához

Urbán Anna

Biológia BSc szakos hallgató, III. évfolyam

Témavezetők:

Dr. Nagy Krisztina, tudományos munkatárs

(HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biofizikai Intézet)

Dr. Ábrahám Ágnes, tudományos segédmunkatárs

(HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biofizikai Intézet)

Belső konzulens:

Dr. Perei Katalin, egyetemi adjunktus

(Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Kar,
Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszék)

Szeged

2025

Tartalomjegyzék

Tartalmi összefoglaló	3
Rövidítésjegyzék	4
1. Bevezetés.....	5
2.1 Baktériumok felépítése és növekedése	6
2.1.1 Az <i>Escherichia coli</i> mint modellorganizmus	6
2.1.2 Baktériumok osztódása	7
2.2 Antibiotikumok.....	9
2.2.1 Az antibiotikumok csoportosítása	9
2.2.2 Antibiotikum rezisztencia	10
2.3 Mikrofluidika	10
2.3.1 Mikrofluidika a mikrobiológiában.....	11
2.3.2 Mikrofluidikai eszközök egyes sejtek vizsgálatára	12
3. Célkitűzés	15
4. Anyagok és módszerek.....	16
4.1 Baktériumtörzsek és sejtenyésztés	16
4.4 Az eszköz készítése	18
4.5 Mikrofluidikai kísérlet indítása.....	20
4.6 Mikroszkópia, képkészítés és képanalízis	20
5. Eredmények és diszkusszió	21
5.1. A mikrofluidikai eszköz tervezése.....	21
5.2. <i>E. coli</i> baktériumok a mikrofluidikai eszközben	25
5.2.1. A használt baktériumtörzsek jellemzése folyadék kultúrában	25
5.2.2. <i>E. coli</i> baktérium populációk növekedésének vizsgálata a μ CM eszközben	26
5.2.3. Kevert <i>E. coli</i> baktérium populációk a μ CM eszközben	31
6. Összefoglalás	34
7. További terveim	35
Irodalomjegyzék	36
Köszönetnyilvánítás	38
Függelék.....	39

Tartalmi összefoglaló

A mikrofluidika és mikrotechnológia egyre elterjedtebb a mikrobiológiai kutatásokban. Segítségével olyan miniatürizált rendszerek alakíthatók ki, amelyekben akár egyedi sejteket is tanulmányozhatunk, manipulálhatunk, mindeközben mikrokörnyezetüket tetszés szerint változtathatjuk. Mikrofluidikai eszközök segítségével a mikrobák természetes élőhelyeinek specifikus tulajdonságait modellezhetjük, ezáltal fontos információkat nyerhetünk például növekedésükről, kommunikációjukról vagy akár evolúciójukról.

A munkám során egy olyan eszközt terveztem és készítettem el, mely kisméretű (pár száz sejtből álló) baktériumpopulációk hosszútávú mikroszkópos vizsgálatát teszi lehetővé. Az eszköz egy szélesebb és magasabb főcsatornából áll, amelyből kisebb tenyésztőkamrák nyílnak. A kamrák magassága összemérhető a baktériumsejtek méretével. A főcsatornában áramoltatott tápoldatból diffúzió útján jut be a tápanyag az oldalkamrákban lévő sejtekhez. A baktériumok nincsenek kitéve erős áramlásnak, a kamrákban folyamatosan osztódnak, a főcsatornába kerülő sejteket az áramlás kimossa.

Az eszközt megterveztem, majd modelleztem az áramlási teret és a koncentráció változását különböző méretű kamrák esetében. A szimulációk alapján kiválasztottuk az optimális kamraméretet ($60\text{ }\mu\text{m} \times 60\text{ }\mu\text{m}$), és elkészítettem magát a mikrofluidikai csipet. Az eszköz dimetil-polisziloxánból készült. Ez egy biokompatibilis, átlátszó elasztomer, amely kiválóan alkalmas élő sejtek mikroszkópos vizsgálatához is.

Az elkészített mikrofluidikai eszközt fluoreszcensen jelölt *Escherichia coli* baktériumokkal teszteltem. Két törzset használtam, egy vad típusút és annak egy ciprofloxacinnal rezisztenciát mutató mutánsát. Vizsgáltam a sejtek morfológiáját és osztódását tápanyagdús médiumban antibiotikum jelenlétében és anélkül. Ennek követéséhez fluoreszcens time-lapse mikroszkópiát használtam. A képkészítés öt percenként történt. A felvételek analízisének is a feladataim közé tartozott.

A kezdeti eredményeim azt mutatják, hogy az eszköz alkalmas kisebb baktériumkolóniák egysejt szinten történő mikroszkópos vizsgálatára: a sejtek morfológiája, osztódása és a leszármazási viszonyok jól követhetők.

Kulcsszavak: *Escherichia coli*, mikrofluidika, mikrofabrikáció, antibiotikum rezisztencia, egysejtanalízis, fenotípusos heterogenitás

Rövidítésjegyzék

CFU - colony forming unit - kolóniaképző egység

E. coli - *Escherichia coli*

FM - family machine

GFP - green fluorescent protein - zöld fluoreszcens fehérje

IPTG - izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranozid

LB - Luria-Bertani tápoldat

MIC - minimum inhibitory concentration - minimális gátló koncentráció

MM - mother machine

OD - optikai denzitás

PDMS - dimetil-polisziloxán

RFP - red fluorescent protein - piros fluoreszcens fehérje

μ CM - microconoly machine

1. Bevezetés

A mikrofluidika forradalmasította a természettudományi kutatásokat mind a fizika, kémia és biológia tekintetében. Ezen belül a mikrobiológiában új megközelítéseket is magával hozott. Segítségével olyan problémákra kapunk választ, amikre korábban nem. A mikrofluidika lehetőséget nyújt mikroszkópiával egybekötött időbeli (time-lapse) vizsgálatokra, és ezzel egyidőben a sejtek környezetének dinamikus változtatására. Ezáltal akár a természetes élőhelyek változatosságát (pl. fizikai és kémiai heterogenitás) is modellezhetjük. Ez a korábbi módszerekkel (pl. lombik tenyészetek) nem valósítható meg [1]. Egy másik fontos előrelépés az volt, hogy az eddig csupán populáció szinten megfigyelhető mikróbák, ettől fogva már egyedi sejtek szintjén is követhetővé váltak. Lehetőség van egyes sejtek csapdázására és azok tulajdonságainak hosszútávú megfigyelésére. Az egyes sejteket tanulmányozva olyan információkhoz juthatunk, melyeket a hagyományos mikrobiológiai kísérletek során sokszor „elfed” a populációátlag viselkedése. Ennek fontossága az utóbbi néhány évtizedben előtérbe került (pl. fenotípusos heterogenitás szerepe) [2], [3].

A fenotípusos heterogenitás kiemelt szerepet játszik a baktériumok számos alapvető életfolyamataiban. Ennek ellenére nem sok információ van arra vonatkozóan hogyan hatnak a genetikai és környezeti változások a fenotípusra. Egy adott populáción belül megmutatkozó diverzitás többek között szelektív előnyt jelenthet a folyamatosan változó környezetben történő túlélés során. Például antibiotikumokkal szembeni ellenállóképesség mértéke is változhat egyedi sejtek szintjén egy populáción belül. A fenotípusos heterogenitás egyik tipikus példája a perzisztens sejtek jelenléte [4]. Egyebek között a sejtek kommunikációjáról (pl. kemotaxis, quorum érzékelés [1], [5]) is közelebbi képet ad a heterogenitással kapcsolatos információk bővülése. Egyre több eszközt fejlesztenek egysejt-analízishez specifikusan az adott biológiai problémára.

Kutatómunkám során egy olyan mikrofluidikai eszköz fejlesztéséhez csatlakoztam, amellyel kisméretű (néhány száz sejtből álló) baktériumpopulációk vizsgálhatók. Az eszközön belül a baktériumok mikrokörnyezetét dinamikusan változtatva követhetjük a sejtek reakcióját time-lapse mikroszkópiával.

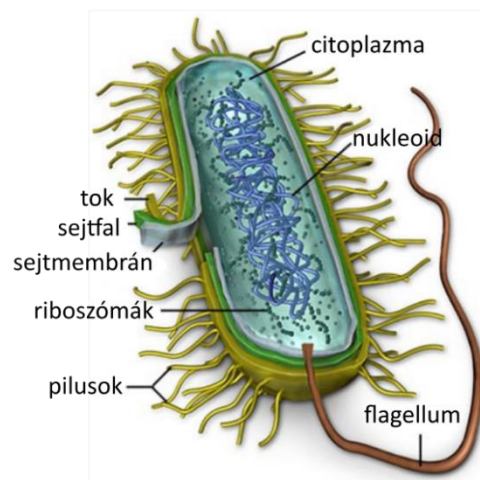
2. Irodalmi áttekintés

2.1 Baktériumok felépítése és növekedése

2.1.1 Az *Escherichia coli* mint modellorganizmus

A mikrobiológiai kutatások egyik népszerű modellorganizmusa az *E. coli*. Az *E. coli* egy pálcika alakú kb. 2-3 μm hosszú és 0,8 μm átmérőjű Gammaproteobacteria osztályba tartozó faj. Elnevezése utal arra, hogy a tápcsatorna alsó szakaszában található meg. Habár a normál flóra része, a bélrendszerből kikerülve komoly megbetegedéseket okozhat. Nem minden *E. coli* patogén, kb. 200 emberi megbetegedést okozó törzsét ismerjük [6].

Az 1. ábrán a prokarióta sejtek általános felépítése látható. Egy védelemért felelős külső tokkal rendelkeznek, ami alatt a sejtfal és a sejtmembrán található. Membránjuk kettős foszfolipid rétegből áll. Előfordulhatnak flagellumok, azaz csillók, amik a sejtmembránról erednek, és átnyúlnak a sejtfalon. Számos baktérium faj (köztük az *E. coli* is) rendelkezik flagellumokkal, amik biztosítják a baktériumok folyadékban történő mozgását. A sejtmembrán (másnéven citoplazmamembrán) belsejét kitölti a citoplazma.



1. ábra. Prokarióta sejt általános felépítése [7].

Egy eukarióta sejttől eltérően, a prokarióta sejteknél nincsenek kompartmentekbe rendezett sejszervecskék, a fehérjeszintézisért felelős riboszómák szabadon helyezkednek el a citoplazmában. A baktériumok belső membránjainak hiánya a sejtmagra is vonatkozik. A citoplazmában található örökítőanyag sincsen körülhatárolva. A feltekeredett DNS (*E. coli*-ban kb. $4,6 \times 10^6$ bázispár) egy kitüntetett nukleoid régióban található. A sejtek rendelkezhetnek bakteriális plazmidokkal is. Ezek kisebb cirkuláris DNS darabok a kromoszómán kívül. *E. coli*-ban a fertilitási-plazmidok (F-plazmidok) részt vesznek a

konjugációban, és kódolják az F-pilusok képződését. A pilusok olyan sejtfelszíni képletek, amik segítenek a sejt megtapadásában és két baktérium közti kromoszómális gének cseréjéhez (konjugációhoz) szolgáltatják a kapcsolatot [6].

Egy jellegzetes tulajdonsága a baktériumoknak a Gram-festésre adott válasz. Ez alapján két csoportba sorolhatók. Az *E. coli* festődése Gram-negatív, vagyis Gram festés hatására rózsaszínesen-pirosasan festődik meg a sejtfala. A Gram-pozitív baktériumok esetében a sejtfal vastagabb peptidoglikán rétegében felhalmozódó kristályibolya festék okozza a kékes festődést. A Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumok sejtfalszerkezetében mutatkozó eltéréseknek jelentős szerepe lehet a különböző fertőzések kezelésében. A Gram-negatív baktériumok a külső membrán megléte miatt hatékonyabban képesek védekezni az antibiotikumokkal szemben [6].

2.1.2 Baktériumok osztódása

Az *E. coli* sejtek szaporodása gyors léptékű. Több dolog is befolyásolja a sejtek osztódását, mint például az elérhető energiaforrás mennyisége és a hőmérséklet. Egyedi sejt szintjén általánosságban véve elmondható, hogy a sejt megfelelő körülmények közt (tápanyagdús környezetben, 37 °C-on) kb. 20 perc alatt osztódik. Populáció szintjén ezt az optikai denzitás (OD) értékének megduplázódása jelzi. Azt az időt, ami alatt a sejt ketté osztódik, generációs időnek nevezzük.

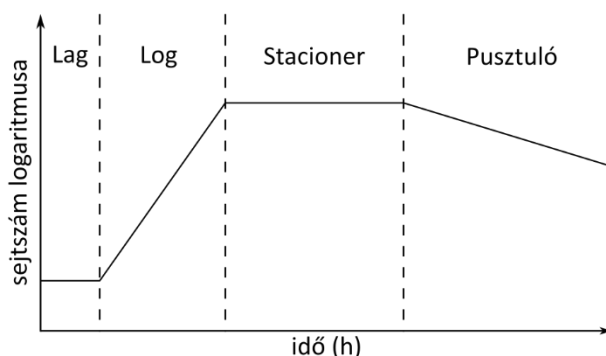
A prokarióta sejtek többségéhez hasonlóan az *E. coli* is hasadással szaporodik. A folyamat elején a pálcika alakú sejt megnyúlik, a DNS replikálódik. Ezt követően az osztódásban fontos szerepet játszó *Fts* (fonalas hőérzékeny) fehérjék polimerizációja kialakítja az úgynevezett diviszómát. Ezek a fehérjék részt vesznek a sejtmembrán és sejtfal szintézisben is, pl. *FtsI* peptidoglikánt szintetizál (ez egy penicillin-kötő fehérje, ami gátolható antibiotikummal, és így nem képes szintetizálódni a sejtfal). Van egy átmeneti állapot az osztódás előtt, amikor a két (még egybe tartozó sejt) közt kialakul egy vékonyabb szeptum. Amikor a sejt hossza megduplázódik az eredeti pálcika alakhoz képest, a sejtek a szeptum mentén lefűződnek, így két homogén *E. coli* keletkezik [6].

Az utóbbi évtizedben egyre nagyobb hangsúlyt kaptak azok a kutatások, melyek a baktériumpopulációkban kialakuló fenotípusos heterogenitás kialakulását vizsgálják. Bár a sejtek ketté osztódása során két azonos genetikai állománnyal rendelkező leánysejt jön létre, mégis előfordulhatnak apró különbségek, melyek megmutatkozhatnak pl. a sejtek

morfológiájában vagy génexpressziójában. Ez a megfigyelhető heterogenitás kialakulhat pl. stressz hatására, vagy az elérhető tápanyagforrás változása (glükóz helyett laktóz felhasználása) miatt [6], [8], de okozhatják sejtosztódáskor fellépő, illetve molekuláris folyamatokkal, génexpresszióval kapcsolatos sztochasztikus események is [2].

2.1.3 Baktériumpopulációk növekedése

A baktériumpopulációkra jellemző egy növekedési görbe. Ennek alakja függ attól, hogy mennyi tápanyag van a rendszerben, milyen hőmérsékleten inkubáljuk, és mekkora az adott organizmus növekedési rátája. A mikrobiológiai laborokban leggyakrabban batch (szakaszos) tenyésztéssel dolgoznak. Ez azt jelenti, hogy a táptalajban a komponensek nincsenek pótolva a folyamat során, limitált az energiaforrás. Emiatt a baktériumok szaporodása a kezdeti gyors sejtszámnövekedés után lelassul. Egy tipikus növekedési görbe négy fázisát szemlélteti a 2. ábra grafikonja.



2. ábra. Baktérium populációk növekedési görbéje sematikusán ábrázolva M. T. Madigan és társainak műve alapján [6].

A sejtek friss táptalajba kerülve adaptálódnak az új környezetükhöz, ezt hívjuk Lag fázisnak. A fázis hossza függhet a kolónia korábbi tárolási körülményeitől és korától. Ezt követi az úgynevezett Log, vagy más néven Exponenciális fázis, mely során a sejtek intenzíven osztódnak, ami a populáció exponenciális növekedését eredményezi. Ennek a szakasznak a hossza függ az elérhető tápanyagforrásoktól, illetve hőmérséklettől, de befolyásolja a baktérium törzsre jellemző generációs idő is. Ahogy a baktériumok felélik a tápoldatban található energiaforrásokat elkezd lassulni a sejtszám növekedése, a függvény platózik. Ez a Stationer fázis. Két oka is van annak, hogy véget ér a sejtszám exponenciális növekedése. Egyik a korábban is említett tápanyagforrás limitáltsága. A másik, hogy időközben káros melléktermékeket is termelnek, amik a sejtek szaporodásának gátlásához vezethetnek. A populáció elér egy egyensúlyi állapotot. Bizonyos idő után a sejtek elkezdnek elpusztulni,

bekövetkezik a Pusztuló fázis. Hasonlóan a Log fázishoz, itt is exponenciális a változás, de jóval lassabb ütemben csökken a sejtszám, mint ahogy korábban emelkedett [6]. A legújabb kutatások szerint a fent bemutatott növekedési görbe alakját nem csupán a baktériumok osztódása és a felhalmozódó toxinok miatt bekövetkező pusztulása befolyásolja. Ughy és munkatársainak kutatási eredményei arra engednek következtetni, hogy a stacionárius fázis kialakulása genetikailag kódolt [9].

2.2 Antibiotikumok

Az antibiotikumok olyan eredetileg baktériumok vagy gombák által termelt anyagok, amelyeknek a célja a mikroorganizmus védekezése másik mikroorganizmusokkal szemben. Először Fleming izolálta a penicillint 1929-ben a *Penicillium notatum* gombából. Ezzel rengeteg korábban halálos kimenetelű betegséget meg tudtak gyógyítani, mint például a tüdőgyulladást vagy mondjuk egy sebfertőzésből származó szepszist [6].

2.2.1 Az antibiotikumok csoportosítása

Az antibakteriális szereket csoportosíthatjuk hatásmechanizmusuk és szerkezetük alapján. Hatásmechanizmusukat tekintve gátolhatják a sejtosztódást, a sejtfal szintézisét vagy a fehérjeszintézist. Utóbbinál külön vehetőek azok, amelyek 50S vagy 30S inhibitorok, illetve amik a tRNS-en keresztül akadályozzák a fehérjék létrejöttét. A sejtosztódást gátló szerek befolyásolhatják a DNS girázt, az RNS elongációt vagy a DNS-függő RNS polimerázt. A sejtfal szerkezetét illetően célpont lehet a lipid bioszintézis, a sejtmembrán szerkezete vagy a folsav metabolizmusa [6].

Évente legnagyobb (kb. 50%-os) arányban β -laktám szereket alkalmaznak világszerte. Ide tartoznak többek közt a penicillinek (pl. ampicillin) és a cefalosporinok. Közös tulajdonságuk, hogy szerkezetükben β -laktám gyűrű van. A β -laktámok mellett egy másik fontos típusa az antibiotikumoknak az aminoglikozidok. Ezek népszerű képviselői a kanamicin és a gentamicin. Ez a két antibiotikum elég hasonló hatásmechanizmussal rendelkezik a szerkezetükből adódóan. Mindkettő a 30S alegységen keresztül akadályozza a fehérjeszintézist. A baktériumok riboszómáihoz csatlakozva gátolják a transzlációt. Ennek eredményeként az mRNS tévesen íródik át, és a létrejött hibás fehérjék végül a sejt halálát okozzák. Egy harmadik szerkezeti csoport a fluorokinolonok. Ebbe a csoportba tartozik a ciprofloxacin, ami a DNS-giráz, másnéven topoizomeráz gátlása révén fejt ki hatását. Ezáltal a DNS replikáció és

transzláció is akadályozott, ami a sejtosztódás elmaradását okozza. Ez a sejtek megnyúlásához, majd pusztulásához vezet [6].

2.2.2 Antibiotikum rezisztencia

A baktériumok képesek lehetnek alkalmazkodni az ellenük alkalmazott antibiotikumokhoz. Ez az ellenállóság véletlenszerűen is kialakulhat mutációval, de azt is kimutatták már, hogy stressz hatására a mutációs ráta megnő [10]. Egy olyan sejt, amely az R plazmidján hordozza a rezisztenciáért felelős gént, képes lehet konjugáció útján is egy másik sejtbe juttatni azt [6].

Többféle mechanizmusa is van a rezisztenciának. Vannak fajok, amik olyan enzimeket tudnak előállítani, amik képesek inaktíválni az antibiotikumot (pl. a β -laktamáz a penicillinek szerkezetének β -laktám gyűrűjét bontja). Nem feltétlen játszik szerepet enzim az inaktíválásban. Ciprofloxacin rezisztencia esetén a mutáció hatására DNS-giráz módosul, ezáltal az antibiotikum nem képes kötődni, nem történik sejtosztódás gátlás. A baktérium sejtfalában is történhet ellenállást kialakító változás. Ezek vagy akadályozzák a sejtbe jutást (permeabilitás csökkentésével), vagy a bejutást követően képesek eltávolítani az antibiotikum jelentős részét (efflux pumpák kifejeződésével). Mindezek mellett a baktériumok biokémiai útvonalait is átalakíthatják (pl. alternatív anyagcsere-útvonalak aktiválásával) [6].

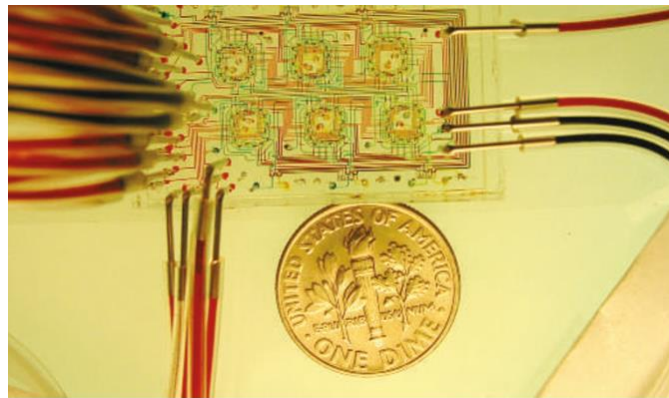
A baktériumok nem csak genetikailag képesek reagálni az antibiotikumokra rezisztencia kialakulásával, hanem perzisztenciával is túlélhetik a kezeléseket. Ekkor a sejtek lassabban vagy egyáltalán nem szaporodnak, hanem egy átmeneti nyugalmi állapotba kerülnek. Ezzel a védelmi mechanizmussal egy részük túlélheti a sejtosztódást befolyásoló antibakteriális szerek alkalmazását, miközben továbbra is érzékenyek maradnak. Az antibiotikumos kezelés elmúlása után az addig nyugvó sejtek újra osztódni kezdenek [4], [11].

2.3 Mikrofluidika

A mikrofluidika tudományterülete és a hozzákapcsolódó mikrotechnológia az elmúlt pár évtizedben indult fejlődésnek, és ez a fejlődés a mai napig tart. Eleinte négy fő alkalmazási területe volt: molekuláris analízis, biológiai fegyverekkel szembeni védekezés, molekuláris biológia, illetve mikroelektronika. Maga a mikrofluidika jelentése, hogy olyan eszközökben figyeljük meg a folyamatokat, amikben mindössze pár száz mikrométeres csatornák vannak, emiatt a folyadékokat mikrométerű skálán manipulálhatjuk. Ezzel lehetőség nyílik arra, hogy gyorsabban és költséghatékonyabban végezzünk el bizonyos kísérleteket. Egy mikrofluidikai eszközben jóval kevesebb minta is elegendő lehet a hagyományos módszerekkel szemben.

Másik előnye, hogy kevésbé szennyezzük vele a környezetet a kis méretének köszönhetően. Egy baktériumok sejtenyésztésére szolgáló miniatürizált rendszer látható a 3. ábrán [12].

Eleinte ezek az eszközök szilíciumból és üvegből készültek, ám manapság egyre elterjedtebb a műanyagok használata. Az évek alatt bővült a mikrofluidikai eszközök gyártására használt anyagok száma. Egyszerűen használható, és olcsóbban elérhető a papír alapú mikrofluidika, amit gyakran alkalmaznak diagnosztikai célokra a kromatográfiás eljárások alapjaként, mint például a Covid-19 antigén otthoni gyorseszteknél. Kutatás céljából azonban főként műanyagokat alkalmaznak. Ezek lehetnek elasztomerek, amelyek olyan speciális polimerek, amik rugalmasak. Vannak köztük hőre keményedőek, ezeket thermosetnek nevezzük, illetve vannak, amelyek a hő hatására lágyulnak, ezeket thermoplasticoknak hívjuk [12], [13].



3. ábra. Mikrofluidikai csip mérete egy pénzérméhez viszonyítva [12].

Az egyik legelterjedtebb anyag (melyet mi is használunk a kutatások során), a dimetil-polisziloxán (PDMS), ami egy szilícium alapú szerves polimer. A PDMS-ből készült mikrofluidikai eszközök egyik előnye, hogy átlátszóak, ezért alkalmasak mikroszkópos vizsgálatokra. Élő sejtekkel való kísérletek szempontjából fontos kiemelni, hogy biokompatibilis, és gázokra (pl. oxigén és szén-dioxid) permeábilis. Ezekben az eszközökben a sejtek akár napokon át is életben maradnak, megfelelő körülmények között (pl. tápanyag folyamatos pótlása mellett) osztódnak is. Másik előnyös tulajdonságai a PDMS-nek az anyagköltsége és kezelhetősége [12], [13].

2.3.1 Mikrofluidika a mikrobiológiában

A mikrofluidika egyre elterjedtebb a mikrobiológiai kutatásokban is. A mérettartománya ezeknek az eszközöknek alkalmassá teszi őket a mikroorganizmusok tanulmányozásához. Segítségével lehetőség nyílt a mikroorganizmusok természetes élőhelyeinek modellezésére.

Jól kontrollálható mikrokörnyezeteket alakíthatunk ki, melyekben megfigyelhetjük a baktériumok alapvető életfolyamatait, például mozgását, növekedését, kommunikációját vagy akár evolúcióját is. Ezeket az eszközöket rendszerint mikroszkópos vizsgálatokkal társítják. Time-lapse mikroszkópiával követhetjük a baktériumpopulációk, illetve egyedi baktériumsejtek viselkedését.

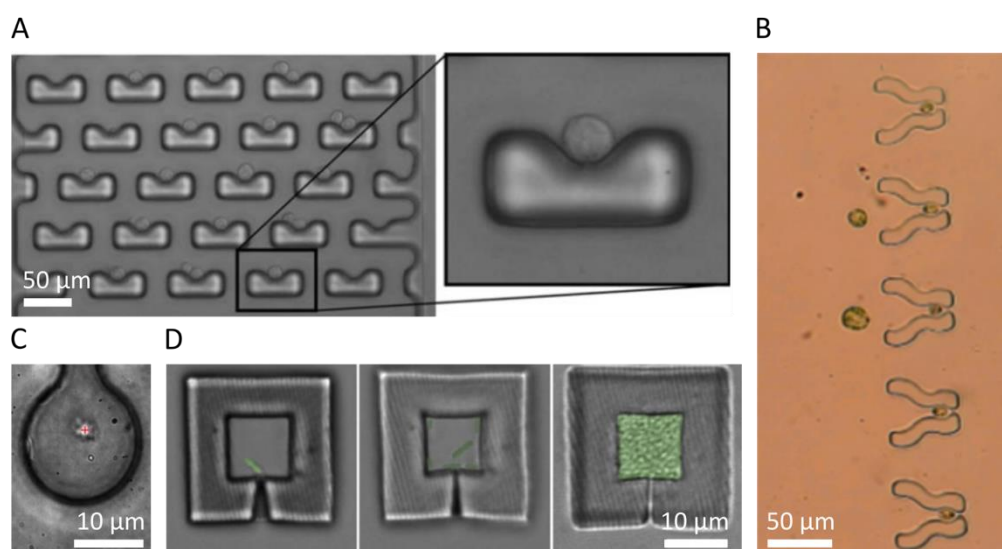
A baktériumok egy része (pl. az *E. coli* is) képes a folyadékokban való úszásra. Maga a mozgás módja is szolgálhat információval, de ezzel kapcsolatban a kemotaxis vizsgálatára is lehetőségünk nyílik. A mikrofluidika segítségével jól meghatározott, pontos kémiai koncentráció gradienseket lehet előállítani, ezért ezek az eszközök kitűnően alkalmasak kemotaxis vizsgálatokra [14]. A mesteregesen előállított kémiai gradiensek mellett olyan módszereket is találunk, ahol a baktériumok maguk állítják elő ezeket a koncentrációgradienseket. Ilyen vizsgálatokhoz például labirintusokat lehet kialakítani, melyekben a sejtek maguk alakítják ki az ingernek számító gradienst azáltal, hogy elfogyasztják az elől lévő sejtek a tápoldatban lévő anyagokat. Labirintuson kívül egyéb akadálypályákat is kialakítottak már baktériumok számára a motilitás és a sejtek közti kommunikáció megfigyeléséhez [1], [5], [15]. Ezeket a mikrofluidikai gradiens generátorokat nem csak kemotaxis vizsgálatokra használják. Az elmúlt évtizedben több kutatás is azt igazolta, hogy antibiotikumok heterogén eloszlása befolyásolhatja a baktériumok antibiotikum rezisztenciájának kialakulását [16], [17].

A baktérium közösségek összetettek, egymással kommunikálni képesek jelmolekulák szekretálásával és azok érzékelésével. Az egyik tipikus kommunikációs rendszer az ún. quorum érzékelés, melyen keresztül a baktériumok szinkronizálni tudják a viselkedésüket. Bár a quorum érzékelés alapvetően populáció szinten megfigyelhető jelenség, fontos molekuláris folyamatok zajlanak le az egyes sejtek szintjén. Mikrofluidika segítségével egyedi sejtek szintjén is tanulmányozhatjuk ennek a jelenségnek a dinamikáját [18].

2.3.2 Mikrofluidikai eszközök egysejt-szintű vizsgálatokra

A mikrofabrikáció és a mikrofluidika előnye, hogy mikroszkóppal kombinálva lehetőség nyílik egyes sejtek csapdázására és azok megfigyelésére (4. és 5. ábra). Az ilyen jellegű kísérletekben tanulmányozhatók a sejtek jellegzetes paraméterei (pl. morfológia, fluoreszcencia), illetve sok esetben a leszármazási viszonyok is követhetők [1], [19], [20]. A sejtek befogásának kétféle típusa van, attól függően, hogy a hidrodinamikát kihasználva rögzítjük az egyes sejteket, vagy

az áramlástól elszeparáltan csatornában/kamrában csapdáznak és gyűjtjük az utódsejteket is. Előbbit inkább nagyobb sejtek vizsgálatához használhatjuk pl. eukarióta sejtekre. Emlős sejt-ként gyakran a HeLa (Henrietta Lacks) sejt-vonallal vagy hasonló rákos sejtekkel (pl. HL-60) dolgoznak rákkutatásban [21], [22]. Mikrofluidikai csapdákkal ezek is egyesével tesztelhetők (4.A ábra) különféle gyógyszerekre, és azok koncentrációit változtatva kontrollálható a toxicitása a tumorellenes szereknek, követhető a szerek okozta apoptózis. Ezek a típusú csapdák algák befogására és megfigyelésére is alkalmasak lehetnek. Erre példa a 4.B ábrán bemutatott rendszer, ahol *Chlamydomonas reinhardtii* sejtek morfológiáját és fotoszintézisét vizsgálták klorofill a fluoreszcencia mérésével [23].



4. ábra. Mikrofluidikai egysejt csapdák. (A) HeLa humán karcinóma sejtek csapdázása [21]. (B) Tulipán csapda algákkal [23]. (C) Optikai csipesszel mozgatott és oldalkamrába elhelyezett *E. coli* sejtek [24]. (D) „Lobster trap” *P. aeruginosa* baktériumsejtek csapdázására BSA fehérjéből készült kamrában (baloldali kb. 20 °C-on, középső és jobboldali képek 37 °C-on készültek) [25].

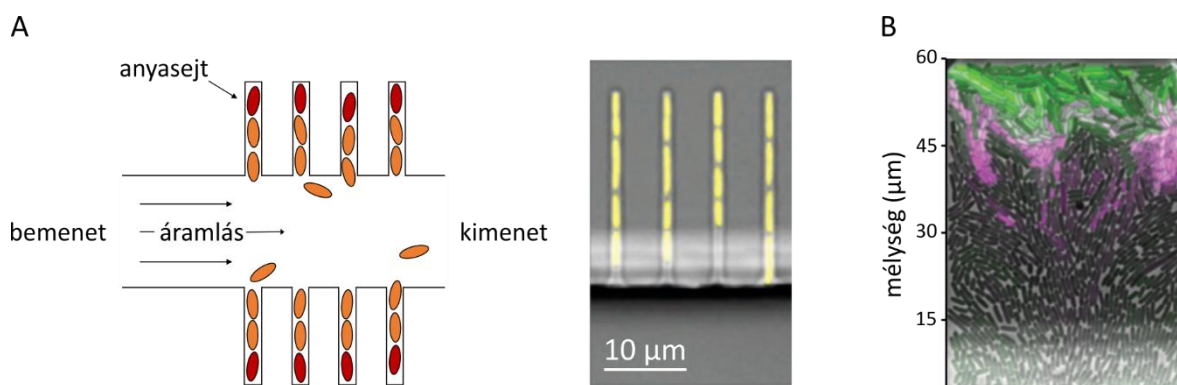
A mikrofluidikai csapdák jól kombinálhatóak egyéb technikákkal is, mint például optikai csipesszel, mely segítségével baktérium sejteket mozgathatunk a mikrofluidikai eszközön belül [24]. A 4.C ábrán egy kisebb, osztódó sejtek befogadására kialakított kamrába optikai csipesz segítségével elhelyezett sejtet látunk. A szerzők a kamrákba helyezett sejteken később Raman spektroszkópiát végeztek az eszközön belül. A 4.D ábra pedig egy olyan eszközt mutat be, ami szarvasmarha szérumalbumin fehérjéből készült és hőre képes záródni. Kiindulásként egy sejtet csapdázhatsz, mely osztódásnak indul, és leánysejteivel megtölti a kamrát. A szerzők a quorum érzékelés heterogenitását vizsgálták az eszköz segítségével [25].

Mikrofluidikában gyakran találkozhatunk olyan eszközökkel, amelyeknél oldalkamrákat alkalmaznak. Ilyen például az úgynevezett „mother machine” (rövidítve MM). Ennek célja

egyedi baktériumsejtek csapdázása és osztódásuk követése több generáción keresztül, amiket szűk oldalcsatornák kialakításával érnek el. Sematikus ábrázolását láthatjuk az 5.A ábrán, ahol a piros sejtek jelölik az anyasejteket, a narancssárgák pedig az osztódással az oldalkamrában felszaporodó utódsejteket. Az utódsejtek idővel a főcsatornába kerülnek, ahonnan az áramlás elviszi őket. Az MM kitűnő a sejtosztódás és az anyasejt (az oldalcsatornában található folyamatosan osztódó legbelső sejt) külső jellegzetességeinek vizsgálatára. Az *E. coli* viszonylag gyorsan szaporodik, így több generációt és azok változását is követhetjük [3], [19].

Mikroszkóppal követhető a sejtek alkalmazkodása különböző stressz hatásokhoz (pl. tápanyaghiány, antibiotikum). Azt is megfigyelték, hogy még ha a sejt átmérőjének felével is rendelkezik az oldalcsatorna mérete, akkor is képes az *E. coli* az osztódásra. Habár átmenetileg az utódsejtek tulajdonságai megváltoznak morfológiailag és mozgás tekintetében, azok mind visszatérnek eredeti jellemzőihez pár nap elteltével [15], [26], [27].

Vannak olyan eszközök is, amik nagyobb kamrákkal rendelkeznek, így kisebb populációk befogadására is képesek, ezért ezek sokszor „family machine” (rövidítve FM) nevet kaptak az irodalomban. Ezeket gyakran használják például tápanyaghiányra adott evolúciós válasz, antibiotikum rezisztencia öröklődésének megfigyeléséhez, perzisztencia kísérletekhez. Megfelelő körülmények között a főcsatornából a kamrákban osztódó sejtekhez csak diffúzió útján jut el a tápanyag (pl. glükóz). Ez okozhat a populációban egy fajta heterogenitást attól függően, hogy hol helyezkednek el a sejtek. Kialakulnak különböző csoportok a tápanyagellátottságnak megfelelően, ilyen génexpresszióbeli különbségeket láthatunk (5.B ábra) [8], [11], [28].



5. ábra. Mikrofluidikai eszközök oldalkamrákkal. (A) A mother machine sematikus ábrázolása (balra), és mikroszkópos képe baktériumokkal feltöltve (jobbra) [19]. (B) Family machine kisebb baktérium populációk egyedi sejteinek fenotípusos változásának követésére kialakított tenyésztőkamra. A zölddel jelölt sejtekben megnövekedett az *acs* gén expressziója (ecetsav az energiaforrásuk), míg a lilával jelöltekben a *ptsdG* gén expressziója (glükózt használnak energiaforrásként, de korlátozott annak mennyisége) [28].

3. Célkitűzés

A kutatómunkámat a Biofotonika és Biomikrofluidika Kutatócsoportnál végeztem a HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpont Biofizikai Intézetében. A csoport egy korábbi kutatás során tanulmányozta térbeli antibiotikum koncentráció gradiensek hatását *E. coli* baktériumpopulációk evolúciójára. Kimutatták, hogy ciprofloxacin gradiens jelenlétében meglehetősen gyorsan (egy napon belül) megjelennek ellenálló alpopulációk [16]. A jövőben a csoport szeretné időben változó (folyamatosan emelkedő, ill. periodikusan alkalmazott) antibiotikumkoncentráció hatását is vizsgálni *E. coli* baktériumokra. A kezelések hatását pedig az egyedi sejtek szintjén szeretnék követni.

Egy mikrofluidikai eszköz fejlesztésén dolgoztam. Egy olyan eszköz létrehozása volt a cél, amiben egysejt rétegben elhelyezkedő kisebb baktérium populációkat lehet egysejt szinten vizsgálni. Ezek a populációk néhány száz sejtből állnak. Az eszköz kialakításánál fontos szempont, hogy a sejtek mikrokörnyezete dinamikusan változtatható legyen. A fejlesztés előrehaladtával a tápoldat nem csupán tápanyagforrást biztosítana, hanem különböző antibiotikumok hozzáadásával szeretnénk vizsgálni azok hatását vad típusú és rezisztens mutáns törzseken is. Ahhoz, hogy ez megvalósulhasson, a következő feladatok elvégzése szükséges:

- tervezés: az eszköz számítógépes programmal való megrajzolása,
- modellezés: a tervrajz háromdimenziós modelljének tesztelése áramlástan szimulációk készítésével és a paraméterek optimalizálása,
- az eszköz elkészítése standard fotolitográfiás, lézerírási és lágy litográfiás módszerekkel,
- az eszköz kísérletes tesztelése különböző *E. coli* sejtekkel és az ehhez szükséges technikák megismerése, elsajátítása,
- képanalízis: sejtparaméterek vizsgálata (alak, fluoreszcencia), ezeken felül a leszármazási viszonyok nyomon követése is cél.

4. Anyagok és módszerek

4.1 Baktériumtörzsek és sejtenyésztés

A munkám során a JEK 1036 és JEK 1037 *E. coli* törzseket használtam. Ezek a W3110-es törzs módosított változatai, melyek zöld, illetve piros fluoreszcens fehérjével (GFP, illetve RFP) jelöltek. A fluoreszcens fehérje termelése izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranozid (IPTG) hozzáadásával indukálható. Ez egy laktóz analóg, melyet a tenyésztéshez használt Luria-Bertani (LB) tápoldathoz adunk. Ezek mellett a vad típusúnak tekinthető *E. coli* törzsek mellett a JEK 1036-os törzs egy mutánsával is dolgoztam, amit a kutatócsoport izolált egy korábbi munkája során [16]. Ez a mutáns ciprofloxacinra nagy mértékű rezisztenciát mutat, ami feltehetően a *gyrA*, *dsbA* és *rfaQ* génekben talált mutációknak köszönhető.

A baktériumsejteket -80 °C-on tárolják fagyasztócsövekben. Ezekből a mintákból tenyésztőcsövekben neveltem fel a kultúrákat, 3 ml LB és 30 μ l IPTG törzsoldat (-20 °C-on tárolt 100 mM törzsoldat) felhasználásával. Ezeket rázóinkubátorba helyezve 30 °C-on 200 rpm-en nőni hagytam éjszakára, majd 1,5 %-os agarlemezre szélesztettem azokat. A kísérletek indítása előtt a lemezokről egy-egy önálló kolóniát vettem fel és növesztettem folyadékkultúrában (3 ml LB, 1 mM IPTG, 30 °C, 200 rpm). A mikrofluidikai kísérleteket az éjszakai kultúrákkal indítottam el.

4.2 Növekedési görbék mérése és a minimális gátló koncentráció meghatározása

Megmértem az általam használt törzsek növekedési görbéjét különböző antibiotikumok hozzáadása mellett és antibiotikummentes tápoldatban. Meghatároztam a minimális gátló koncentráció (MIC = Minimal Inhibitory Concentration) értékét négy különböző antibiotikumnak: ciprofloxacin, ampicillin, gentamicin és kanamicin.

Az MIC méréséhez egy az irodalomban is használt protokollt alkalmaztam [29]. Ennek első lépése annak meghatározása, hogy adott optikai denzitás milyen sejtszámnak felel meg a használt törzsek esetében. A vad típusú törzsekre vonatkozóan CFU (Colony Forming Unit) mérést végeztem a tenyésztőcsőben mért $OD_{600\text{ nm}}=0,6$ -os értékre vonatkozóan. A mérés a következőképpen történt. 1000-szer visszahígítottam az éjszakai kultúrákat (3 ml LB, 30 °C, 200 rpm), és megvártam, hogy a 600 nm-en mért optikai denzitás ($OD_{600\text{ nm}}$) 0,6 körüli értéket vegyen fel. Ekkor két hígítást alkalmaztam: $10^3\times$ és $10^4\times$, majd a hígított mintákból 3-3 db 1,5 %-os agarlemezre szélesztettem. Lemezenként 50 μ l-t cseppentettem a folyadékkultúrákból. Szélesztést követően a lemezek 30 °C-os inkubátorba kerültek éjszakára.

Másnap a következő eredményeket kaptam a telepszámlálások során: 1 ml-re vonatkozóan az JEK 1036 törzsnél átlagosan $1,211 \times 10^6$ db sejt/ml, a JEK 1037 törzsnél pedig $1,609 \times 10^6$ db sejt/ml lett az átlagos CFU érték.

Az MIC méréshez a 0,6-os optikai denzitású kultúrából 100-szoros hígítást készítettem, és abból 50 μ l-t használtam fel. Tehát nagyságrendileg 10^4 baktériumból indult ki a mérés. Egy 96 lyukú sejtenyésző lemezben mértem össze a megfelelő hígítási sorokat, minden lyukban 100 μ l végtérfogattal dolgoztam. A lemez 12 oszlopa a következőképpen került feltöltésre: a 11. oszlop a növekedési kontroll, ahol a baktériumpopuláció növekedését antibiotikummentes tápoldatban vizsgáltam, a 12. oszlop az úgynevezett sterilitási kontroll, ami tisztán a tápoldatot tartalmazza. Ezeket a lyukakat használhatjuk referenciaként is. A ciprofloxacin maximum koncentrációja (10. oszlop) 1000 ng/ml volt. (Ehhez először 1 mg/ml szűrt vízben oldott törzsoldatot készítettem el, melyet -20 °C-on tároltam a továbbiakban.) A másik három felhasznált antibiotikum esetén, ampicillin, kanamicin és gentamicin, a maximum koncentráció 250 μ g/ml volt. (Ezekből az antibiotikumokból szintén készítettem törzsoldatokat 50 mg/ml koncentrációban, melyeket szintén -20 °C-on tároltam.) Az 1. oszloptól a 10. oszlopig a koncentráció folyamatosan a duplájára nőtt.

Miután a lemezt összemértem, lefedtem azt lélegző fóliával, majd betettem a lemezolvasóba (BioTek Synergy 2 plate reader), mely 24 órán át 5 percenként mérte az OD_{600 nm} értékeket. Az optikai denzitás mellett a fluoreszcenciát is mértük, de ezeket az adatokat nem használtam fel a dolgozatomban. A lemez a mérés teljes időtartama alatt 30 °C-on és folyamatos rázás alatt volt.

4.3 Az eszköz tervezése, modellezése

A mikrofluidikai csip kétdimenziós terveinek elkészítéséhez a Klayout nyílt forráskódú programot (verziószám: 0.29.2) használtam. A tervrajzomon különböző kamrákat alakítottam ki, hogy mindegyikre letesztelhessem, hogyan viselkedik benne a folyadék. Ezek a méretek a következők voltak (szélesség x mélység): 1,2 μ m $\times$ 25 μ m (ez az irodalomban sokat használt mother machine [3] mérete), 60 μ m $\times$ 40 μ m, 60 μ m $\times$ 60 μ m, 60 μ m $\times$ 90 μ m, 60 μ m $\times$ 120 μ m, 25 μ m $\times$ 25 μ m, 25 μ m $\times$ 50 μ m és végül 25 μ m $\times$ 75 μ m. A főcsatorna hossza és szélessége rendre 2500 μ m és 200 μ m voltak.

Az áramlás és a diffúzió modellezése a Comsol Multiphysics 4.3a szoftverrel történt. Ehhez a „Laminar Flow”, valamint „Transport of Diluted Species” modellekkel (Physics) dolgoztam és

időfüggő („Time-dependent”) study-t használtam. A tervrajzot beolvastva ki tudtam azt terjeszteni három dimenzióban. A magasság minden kamra esetén 0,8 μm volt, ami összemérhető egy *E. coli* sejt méretével. A főcsatorna magassága 15 μm volt. A folyadékáramlás szimulálásához az eszközt vízzel töltöttük fel, a bemenetre „fully developed flow” érkezett. A térfogatáram 200 $\mu\text{l/h}$ volt (ezt használtuk a kísérletek során is). A diffúzió modellezéséhez a koncentráció változását a bemeneten lépcsőfüggvénnyel határoztuk meg: 0 s-tól 7,5 s-ig a koncentráció 0 M volt, ezt követően pedig 1 M. Összesen 20 s-ig vizsgáltuk 0,1 s-os időbeli felbontással, hogy hogyan változik az eszközben a glükóz koncentrációja. A glükóz diffúziós állandójaként $6,7 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ -t használtam [30].

„Physics-controlled” térhálózattal (mesh) dolgoztam, „Normal” felbontással. Az első study-t lefuttatva modelleztem a folyadékáramlást (áramvonalak elhelyezkedését) a csipben, az alkalmazott időintervallum 1 s volt, 0,1 s-os felbontással. Az utolsó időpillanat eredményét felhasználva futtattam le a második study-t, ami a diffúziót (a koncentráció változását) szimulálta a mikrofluidikai csipben.

4.4 Az eszköz készítése

Ahhoz, hogy ezt az eszközt elkészíthessem, szükség volt egy öntőformára, ami a végső elrendezés negatívja. Ezt PDMS-sel kiöntve készíthetjük el magát a mikrofluidikai csipet. A folyamatot a 6. ábra szemlélteti. Elsőként a króm jelölőket készítettük el (6.A ábra), amiket a lemezen való tájékozódáshoz használtunk a lézerírás ($\mu\text{PG 101}$, Heidelberg Instruments Mikrotechnik GmbH) során. A krómréteget egy porlasztógéppel (Quorum Q150T sputter coater, Quorum Technologies Ltd.) egy szilícium lemezre vittük fel, majd ezt S1818 pozitív fotorezisztrel vontuk be (6.A ábra 1. és 2. lépés). A jelölők mintázatát a lézeríróval világítottuk bele a fényérzékeny rétegbe (3. lépés). Az előhívást követően a krómréteget már csak a jelölők kívánt helyeinél fedte S1818 (4. lépés). A krómáras során a fedetlen helyekről eltávolítottuk a krómot (5. lépés), majd acetonos mosással a maradék, fedésként használt S1818-at is (6. lépés), hogy végül csak a króm jelölők maradjanak a lemezen. Miután ezzel elkészültünk, következhetett magának az öntőformának a készítése (6.B ábra). A króm jelölőket tartalmazó lemezre felvittünk egy alacsony SU-8 negatív fotoreziszt réteget (1. lépés). Ennek célja, hogy jobb tapadást biztosítson a kis méretű struktúráinknak. A 0,8 μm -es réteg felvételét követően lézeríróval elkészítettük az oldalkamrákat (3. lépés). Erre felvittük a 15 μm magas SU-8 réteget,

melybe lézeríróval bevilágítottuk a főcsatorna mintázatát (4. és 5. lépések). Ezt a 6. lépésben bemutatott előhívási folyamat követte, melynek eredménye a kész öntőforma.

A

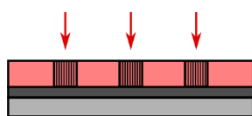
1. lépés: pár 10 nm vastag krómréteg felvitele



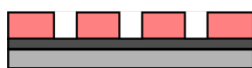
2. lépés: S1818 pozitív fotoreziszt réteg felvitele



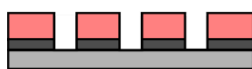
3. lépés: jelölők készítése lézeríróval



4. lépés: S1818 előhívása MF-319 előhívóval



5. lépés: krómáras



6. lépés: acetonos mosás



B

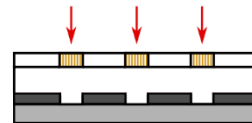
1. lépés: 5 μm vastag alapréteg felvitele



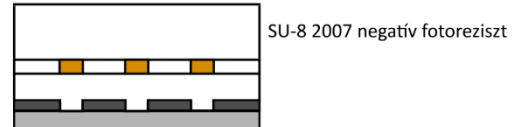
2. lépés: 0,8 μm vékony SU-8 réteg felvitele
SU-8 2001 negatív fotoreziszt
(SU-8 2002 + 2002 thinner)



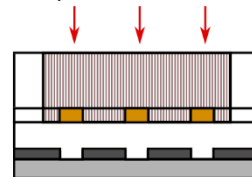
3. lépés: oldalkamrák készítése lézeríróval



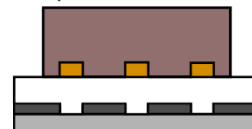
4. lépés: 15 μm vastag SU-8 réteg felvitele



5. lépés: főcsatorna készítése lézeríróval



6. lépés: előhívás Mr-DEV-600 SU-8 előhívóval



6. ábra. Az eszköz negatívjának elkészítése szilícium lemezre. (A) Króm jelölők elkészítésének lépései. (B) Negatív öntőforma elkészítésének lépései [31].

Minden kísérlet előtt az elkészített öntőformákat PDMS-sel öntöttem ki (Sylgard 184, Dow Inc.) a két komponens 10:1 arányú (bázis:iniciátor) összekeverésével. Ezt aztán 40 °C fokos sütőben hőkezelttem, másnapra megkeményedett. Ezután óvatosan leválasztottam a PDMS-t az öntőformáról, majd kisebb darabokra vágtam.

A PDMS eszköz méreteit pásztázó elektronmikroszkóppal (JSM-7100F, JEOL Ltd.) ellenőriztük. Ehhez 15 nm vastag arannyal vontuk be (Quorum Q150T sputter coater, Quorum Technologies Ltd.), az alkalmazott gyorsítófeszültség 5 kV volt.

4.5 Mikrofluidikai kísérlet indítása

Az egyes kísérletek indítása előtt a következő lépéseket kellett elvégezni. Szükség van be- és kimeneti nyílásokra a folyadék eszközbe való juttatásához, amikhez egy 1,5 mm átmérőjű lyukasztót használtam a főcsatorna elején, illetve a végénél. Ezután oxigénplazmás kezeléssel (29.6 W, 400 mTorr, 45 s, egy Harrick PDC-002 plazma tisztítóban) a PDMS csipet fedőlemezre ragasztottam. Közvetlenül a plazmázás után az elkészült eszközt feltöltöttem a bemeneti nyíláson keresztül az éjszakai baktériumkultúrával. Az eszközöket behelyeztem a mikroszkópba, ekkor óvatosan beledugtam a be- és kivezető nyílásokba az áramoltatáshoz használt csöveket. A bemeneti csöveket rákötöttem LB-t és IPTG-t tartalmazó fecskendőkre, és azokat fecskendőpumpába helyeztem. Esetenként 100 ng/ml ciprofloxacin-t is adtam a tápoldathoz. Az áramlást minden alkalommal 200 µl/h sebességre állítottam. A kísérleteket 30 °C-on végeztem.

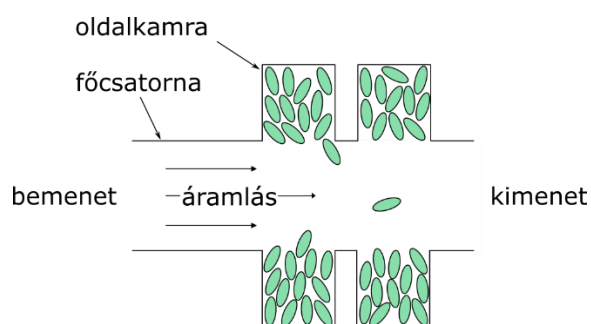
4.6 Mikroszkópia, képkészítés és képanalízis

A sejtek megfigyeléséhez fluoreszcencia time-lapse mikroszkópiát alkalmaztunk. A kísérletekhez Nikon Eclipse Ti-E inverz mikroszkópot (Nikon Corp.) használtam. A köré épített inkubátor (Okolab S.r.l.) biztosította a sejtek számára megfelelő 30 °C hőmérsékletet. A képkészítéshez 40X Nikon Plan Fluor objektívet, GFP és mCherry fluoreszcens szűrőket és Prior Lumen 200 Pro lámpát (Prior Scientific Instruments Ltd.) használtam. A minta mozgatása Prior Proscan II motorizált asztallal (Prior Scientific Instruments Ltd.) történt. A képfelvételhez Andor Zyla sCMOS kamerát (Andor Technology) használtam. A kamera és a mikroszkóp vezérlését a NIS Elements Ar szoftver (Nikon Corp.) végezte. Öt percenként készültek a képek. Az elkészült felvételek analízisekor az Ilastik és az ImageJ programot használtam a baktériumok szegmentálásához és az ehhez kapcsolható TrackMate bővítményt a sejtosztódások követéséhez. Az eredményekben található képeket, illetve a dolgozat többi ábrájához is az Inkscape programot használtam.

5. Eredmények és diszkusszió

5.1. A mikrofluidikai eszköz tervezése

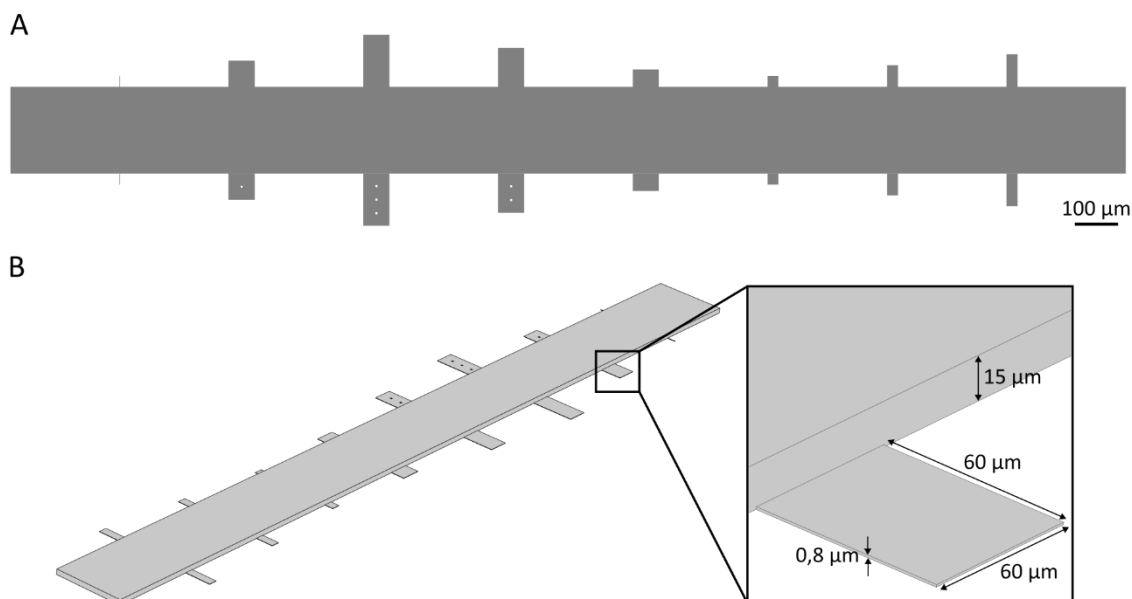
Kutatómunkám során a 2.3 fejezetben bemutatott MM [3] és FM [8], [11] eszközökhöz hasonló elrendezés tervezése és optimalizálása volt a feladatom. Egy olyan eszközt szeretnénk készíteni, mellyel kisméretű (néhány száz sejtből álló) baktériumpopulációk vizsgálhatók. Az általunk microcolony machine-nak (rövidítve μ CM) elnevezett eszköz sematikus ábrázolása és működési elve a 7. ábrán látható. Egy magasabb főcsatornából és a belőle nyíló alacsonyabb ($<1\ \mu\text{m}$) oldalkamrákból épül fel. A főcsatornában áramló tápoldat biztosítja a megfelelő körülményeket az oldalkamrákban található baktériumsejtek folyamatos osztódásához. Azokat a sejteket, amik már belelőgnak a főcsatornába az áramlás kiviszi, és a kimeneten át távoznak. Ahhoz, hogy egyes sejtek szintjén tudjuk tanulmányozni a baktériumokat az eszközben elengedhetetlen, hogy a csapdázott sejtek egy rétegben nőjék csak be a kamrákat. Túl alacsony oldalkamra esetén a sejtek nagyon beszorulnának, és a stressz hatására alakváltozás történhet. Magas kamra esetén pedig a mozgásra képes baktériumok kiúszhatnak a kamrából, illetve a túl nagy elmozdulások zavarhatják a mérést. Mi $0,8\ \mu\text{m}$ magas oldalkamrákat készítettünk, mely hasonló az FM eszköz méreteihez [28]. A kezdeti kísérleteink alapján ez a méret megfelelőnek bizonyult a laborban vizsgálni kívánt *E. coli* sejtek számára.



7. ábra. A microcolony machine sematikus ábrázolása és működési elve.

Az eszköz elkészítéséhez az első lépés a tervezés volt. A 8. ábra bemutatja az általam készített méretarányos tervrajzot. Különböző méretű oldalkamrákat rajzoltam. A 8.A ábrán balról jobbra látható egy mother machine, majd kétféle szélességű ($60\ \mu\text{m}$ -es és $25\ \mu\text{m}$ -es bejárattal rendelkező) tenyésztőkamrák sorozata. A pontos méreteket a 4.3 fejezet tartalmazza. A főcsatorna szélessége $200\ \mu\text{m}$. A kamrák közti távolságok $250\ \mu\text{m}$ -esek. A csatornának mindkét oldalán elhelyezkednek kamrák, amik közül a szemköztiek azonos méretűek. A $60\ \mu\text{m}$ -es bemeneti nyílással rendelkező karmákból két típus készült, a főcsatorna

alsó oldalára elhelyezett kamrák belsejébe $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$ területű tartóoszlopokat is terveztem. Ezek célja, hogy megóvja a kamrákat attól, hogy az alsó és felső fala összeérjen és beszakadjon.



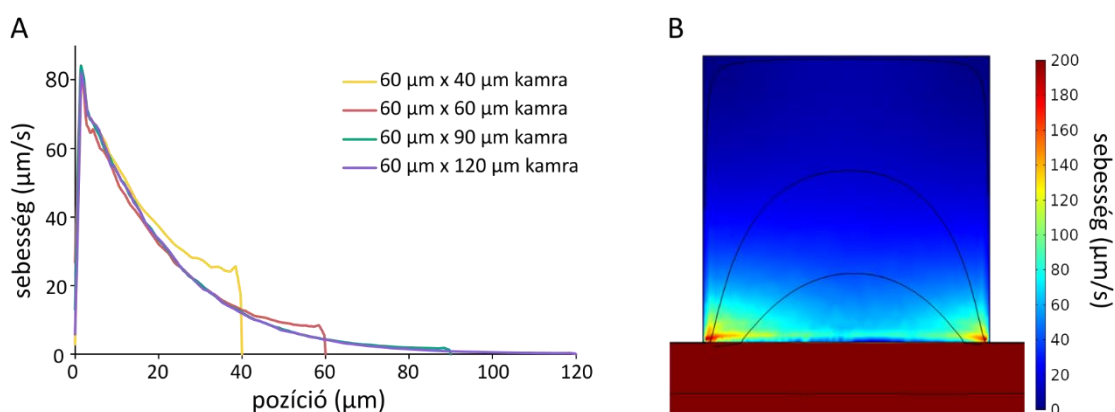
8. ábra. A mikrofluidikai eszköz tervezése. (A) A μCM felülnézeti képe a KLayout programban. (B) A μCM 3D-s képe Comsolban, belenagyítva a $60\ \mu\text{m} \times 60\ \mu\text{m}$ kamra és méretei láthatók.

Miután elkészítettem a μCM 2D-s tervét, azt a Comsol szimulációs programban felhasználtam. Ebben már nem csak egy 2D-s modell képe látható, hanem 3D-ben is tesztelhető az eszköz. A munkám ezen pontján dőlt el, hogy milyen magas legyen a főcsatorna ($15\ \mu\text{m}$) és az oldalkamrák ($0,8\ \mu\text{m}$), mekkora sebességgel és mit áramoltassak. Modelleztem az áramlási teret és a tápanyag bejutását a kamrák belsejébe. A 8.B ábrán látható a terv 3D-s ábrázolása, ezen belül is kiemelve a $60\ \mu\text{m} \times 60\ \mu\text{m}$ kamra, amellyel a legtöbbet dolgoztam. A kutatócsoportom a korábbi, MM eszközzel végzett kísérleteik során $200\ \mu\text{l/h}$ térfogatáramot használt [18]. Így én is ezt az értéket állítottam be a főcsatornába a bemenethez úgy, hogy az már egy kialakult, állandósult lamináris áramlásként jelenjen meg a nulladik pillanattól.

Annak érdekében, hogy kiválaszthassam a megfelelő kamraméreteket fontos tudni, hogy mennyire jut energiaforrás a sejteknek úgy, hogy közben azok ne mosódjanak ki, és zavartalanul mehessen végbe a sejtosztódás. A cél az, hogy a folyadék a kamrákba csak minimálisan áramoljon be, így a tápanyag legfőképp diffúzióval jut a sejtekhez. A tápoldat szimulálásához vízben oldott glükózt alkalmaztunk.

A 9.A ábrán a $60\ \mu\text{m}$ bemeneti nyílású, különböző hosszúságú kamrákban mutatom be a folyadék áramlási sebességét. A 9.A ábrán az egyes görbék a kamrák közepén, azok nyitott oldalától a zárt oldaláig húzott egyenes mentén mutatják az áramlási sebességet egyre

mélyebben a kamrákban. Jól látható, hogy az áramlási sebesség nagymértékben lecsökken a kamrákban a főcsatornához képest, és folyamatosan csökken, ahogy egyre mélyebben járunk a kamrákban. A 40 μm mély kamra esetén az áramlási sebesség kb. 30 $\mu\text{m}/\text{s}$ -ig csökken a kamra belső falához érve. Ez nem jelent problémát a sejtek számára, a mélyebb kamrák esetében pedig még tovább csökken a sebesség hosszanti irányban. A sebességhez tartozóan az áramvonalakat is megfigyeltem mennyire haladnak be a különböző méretű kamrákba (9.B ábrán a 60 $\mu\text{m} \times 60 \mu\text{m}$ kamra áramvonalas képe szerepel).

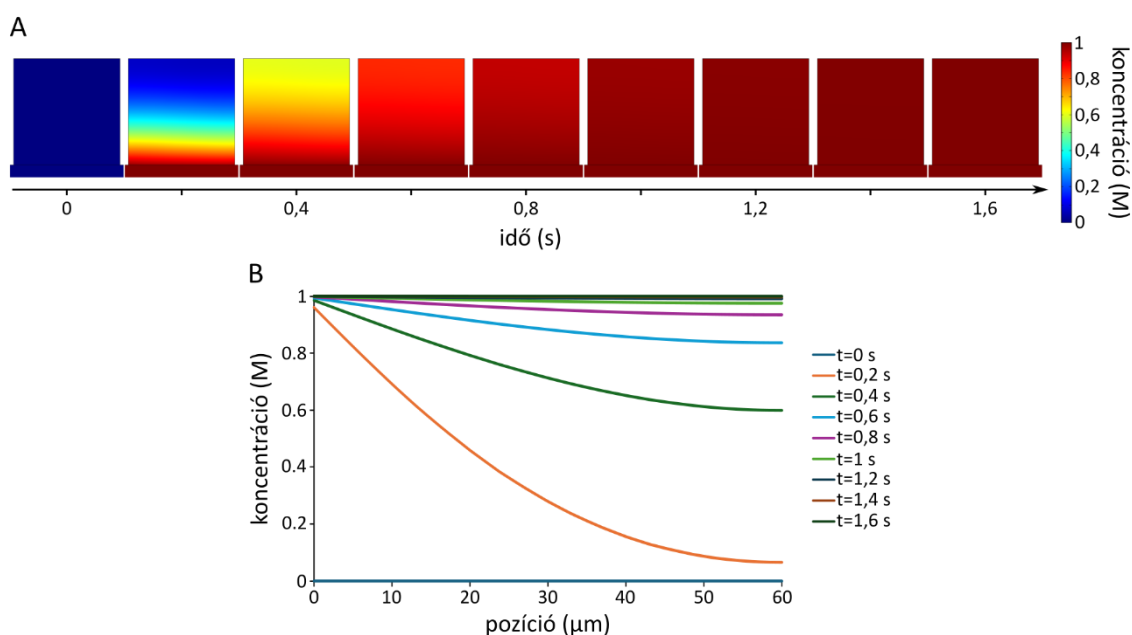


9. ábra. Áramlási sebességek modellezése a mikrofluidikai eszközben. (A) Sebességváltozások grafikonja a 60 μm széles bemeneti nyílással, de eltérő mélységgel rendelkező kamrákban. (B) 60 $\mu\text{m} \times 60 \mu\text{m}$ kamra képe áramvonalakkal. A kamrán belül az áramlási sebességet a színskála jelzi.

Mint fentebb említettem a nagy alapterületű és alacsony struktúrák könnyen beszakadhatnak a PDMS eszköz 1:10 (iniciátor:bázis) arányú elkészítésekor. Modellem során ezért teszteltem, hogy tartóoszlopok használata befolyásolja-e az áramvonalak elhelyezkedését az oldalkamrákban. Nagymértékű eltérést nem tapasztaltam. Ugyanakkor a kutatócsoport korábbi tapasztalati alapján, az oszlopok használata helyett az iniciátort 1,5-szeres mennyiségben történő alkalmazása mellett döntöttünk inkább. Emiatt a továbbiakban az oszlopokkal rendelkező kamrák eredményeit nem mutatom be részletesen.

Következő lépésben megvizsgáltam, hogyha a főcsatornában 1 M-os glükóz oldat áramlik, akkor mennyi idő alatt cserélődik le a kamrákban található tiszta víz, azaz mennyi idő alatt éri el a glükóz koncentrációja a kamrák mélyén a csatornában található koncentrációt. Ehhez egy lépcsőfüggvényt használtam (részletek a 4.3 fejezetben). A koncentráció időbeni változását a 10. ábrán található képsorozaton és grafikonon mutatom be. Ide enyhe áramlással és főként diffúzió útján jut be a tápanyag, amihez pár tized másodperc szükséges. A 10.B ábrán a kamrán belüli pozíció függvényében (a bevezető nyílástól a zárt végéig a kamra közepén) látható a koncentráció 0,2 másodpercenként ábrázolva. Ezen is látható az, ami a képsorozaton

(10.A ábra) is, hogy kb. 0,8-1 s alatt jut be a tápanyag a kamrák belsejéhez és éri el az 1 M koncentrációt a glükóz. A többi kamramérettel is elkészítettem ezeket a grafikonokat, amik a Függelékben találhatóak (Függelék 1. ábra). 40 μm (A panel) mély kamrában már 0,4 s körül eléri az 1 M koncentrációt a glükóz, míg a hosszabb, 90 μm (B panel) és 120 μm (C panel) kamrákban teljesen el se éri a vizsgált 1,6 s alatt a kamrák belsejét. Előbbinél 1,6 s-nál megközelíti, utóbbinál azonban ennyi idő nem elég, hogy teljesen bediffundáljon a glükóz, csupán 0,8 M koncentráció jut be 1,6 s során.



10. ábra. Glükóz koncentrációjának változása a 60 $\mu\text{m} \times 60 \mu\text{m}$ kamra esetében 1M-os glükózoldat lépcsőfüggvényben történő alkalmazásakor. (A) Glükóz koncentrációjának időbeni változása a kamra teljes területén. A koncentrációt színskála mutatja. (B) Koncentráció 0,2 másodpercenként vizsgálva a kamra közepén a bemeneti nyílásától a zárt végéig húzott egyenes mentén.

Az általam elvégzett áramlástanai modell alapján a tervezett eszköz ígéretesnek mutatkozik arra, hogy baktériumsejteket csapdázzunk, és vizsgáljuk azt, hogyan reagálnak a dinamikusán változó környezeti feltételekre. Ugyanakkor vannak olyan paraméterek, melyeket az általam készített szimulációk nem tartalmaznak. A szimulációkat (a tartóoszlopoktól eltekintve) üres, baktériummentes kamrákon végeztem, és a kísérleti eredményeket már önmagában a sejtek fizikai jelenléte is befolyásolhatja. Emellett a tápanyagokat is folyamatosan felhasználják, ettől gradiensek alakulhatnak ki az eszközön belül, amiket maguk a baktériumok alakítanak ki. Ennek megfelelően, az eszköz elkészítése után annak megfelelő működését ellenőrizni kell baktériumokon végzett kísérletekkel.

A kísérletekhez a 60 μm $\times$ 60 μm alapterülettel rendelkező kamrákat választottuk ki. Elkészítettem egy olyan eszközt, melyben a főcsatorna mentén ilyen méretű kamrák sorozata volt található. Az eszköz elkészítéséhez szükséges mikrofabrikációs technikákat elsajátítottam, a részletes lépéseket az Anyagok és módszerek fejezetben foglaltam össze (4.4 fejezet).

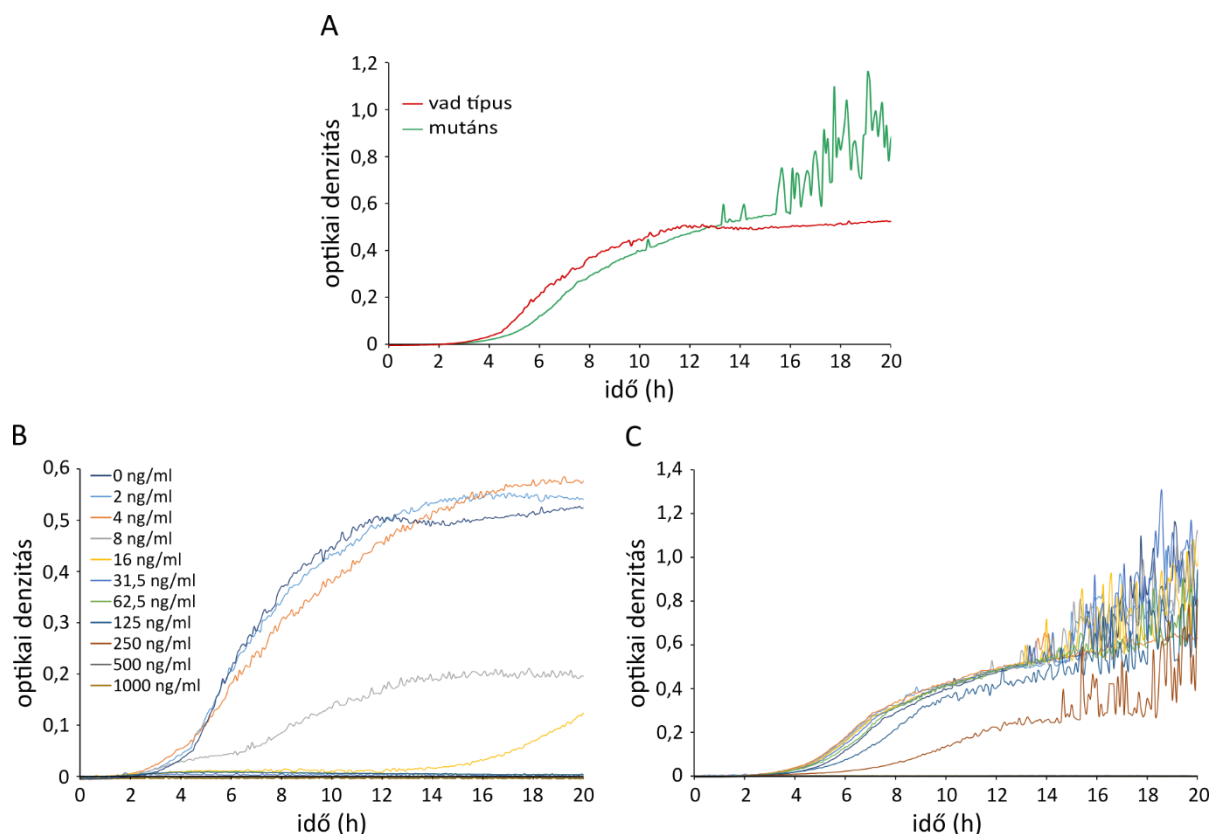
5.2. *E. coli* baktériumok a mikrofluidikai eszközben

Az általam tervezett és elkészített eszközt a laborban található *E. coli* baktériumtörzseken teszteltem. Két törzset választottunk. Az egyik egy vad típusúnak tekinthető *E. coli* törzs, a másik pedig egy mutáns, melyet a kutatócsoport egy korábbi kísérletsorozata során izolált [16].

5.2.1. A használt baktériumtörzsek jellemzése folyadék kultúrában

Mielőtt az eszközben vizsgáltam volna a törzseket, megmértem a növekedési görbéiket antibiotikum jelenléte nélkül, illetve antibiotikum mellett. A 11.A ábrán hasonlítom össze a két törzs növekedését LB tápoldatban. Mindkét törzsnél megfigyelhető, hogy a sejtszám növekedése 10-12 óra után ér el egy platót (stacionárius fázis). Ugyanakkor az is megfigyelhető, hogy a mutáns törzs valamivel lassabban nő az exponenciális szakaszban, illetve a stacionárius szakaszban a görbe zajossá válik. Ennek a „tüskézettségnek” az oka, hogy ezek a mutáns sejtek hajlamosabbak az aggregációra, ami zavarja az optikai denzitás mérését.

Meghatároztam az MIC értéket 4 különböző antibiotikumra (ciprofloxacin, ampicillin, gentamicin, kanamicin) vonatkozóan a két törzs esetén. A vad típus vizsgálatánál 31,5 ng/ml ciprofloxacin már gátolta a baktériumok osztódását. 16 ng/ml koncentrációnál is már sokkal lassabb ütemben szaporodtak a sejtek (11.B ábra). A mutáns törzsnél 250 ng/ml esetén már kb. felére csökkent az osztódás mértéke, de csak 500 ng/ml-nél érte el teljesen a sejtosztódás gátló hatást, ami a vad típusnál mért MIC kb. 16-szorosa (11.C ábra). Korábban a kutatócsoportom tagjai egy finomabb hígítási sort alkalmazva 25-szörös MIC változást mértek a mutáns törzs esetén az eredeti törzshöz képest [16]. Ez a törzs az általam vad típusúnak kezelt törzsből (a fluoreszcens jelölést leszámítva megegyezik a W31110-es törzsszel) evolválta. A törzs három napig volt kitéve egy antibiotikum gradiens kezelésnek. Ennek során olyan mutációk alakultak ki, amelyek hozzájárulnak a megfigyelt emelkedett ellenállóképességhez. Ezek a mutációk a következő géneket érintik: *gyrA*, *dsbA*, *rfaQ* [16].



11. ábra. Növekedési görbe és MIC mérés eredményei. (A) *E. coli* vad típusának és mutánsának növekedési görbéje. (B) Ciprofloxacin MIC mérés eredménye a vad típusú *E. coli* törzsre. (C) Ciprofloxacin MIC mérés eredménye a mutáns törzsre.

A ciprofloxacin mellett másik három antibiotikummal is megtörtént az MIC mérés. Mivel a kísérletek során csak a ciprofloxacinnal dolgoztam, ezért csak arról készült részletes ábra. A kiértékelést azonban elvégeztem és a következő eredményeket kaptam: vad típus esetében ampicillinnél 4 $\mu\text{g/ml}$ már gátló hatást fejtett ki, kanamicinnél 16 $\mu\text{g/ml}$, míg gentamicinnél 8 $\mu\text{g/ml}$ volt ez a határ. A mutáns az ampicillinre is enyhe rezisztenciát mutatott, ugyanis az MIC értéke 31,5 $\mu\text{g/ml}$ -re emelkedett, ami közel 8-szorosa a vad típus MIC értékének. A másik két antibiotikum esetében nem tapasztaltam jelentős MIC változást. Kanamicinnél 4 $\mu\text{g/ml}$, gentamicinnél pedig 2 $\mu\text{g/ml}$ akadályozta meg a mutáns törzs osztódását.

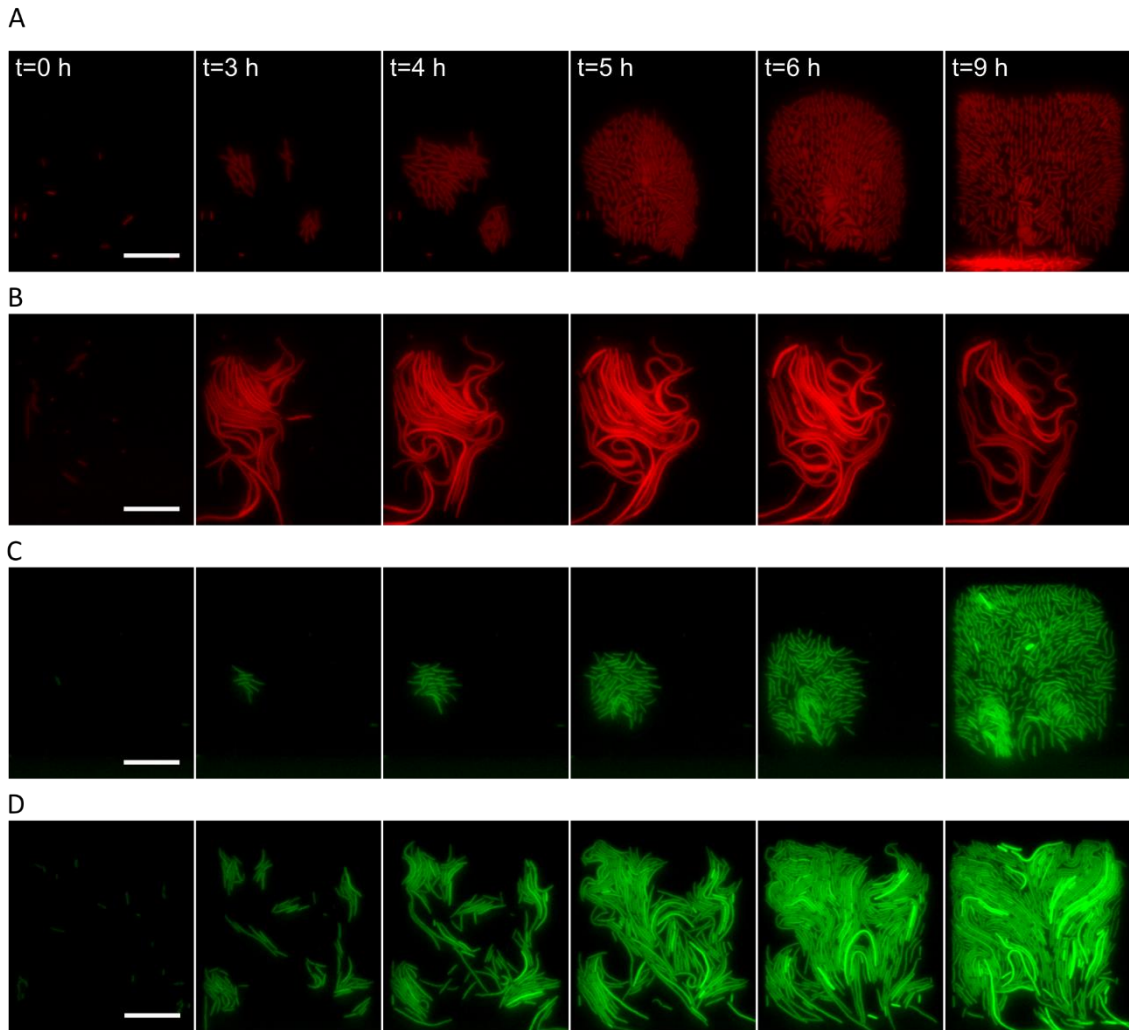
5.2.2. *E. coli* baktérium populációk növekedésének vizsgálata a μCM eszközben

Különböző kísérleteket végeztem a 60 $\mu\text{m} \times 60 \mu\text{m}$ oldalkamrákat tartalmazó μCM eszközzel. Vizsgáltam a vad típust és a ciprofloxacin rezisztens mutánst LB és ciprofloxacin mellett. A nulladik időpontban csak pár sejt volt a kamrákban. A sejtosztódásról készült képeket 9 óráig ábrázoltam. Ekkor még nem teljesen nőttek be a baktériumok a kamrákat, de már néhol az áramlás elmoshatja az utódsejteket a kamrabemenet közeléből. A 12. ábrán látható az

A, B panelen az RFP jelöléstől pirosan fluoreszkáló vad törzs (JEK 1037) és C, D panelen a GFP jelöléstől zölden fluoreszkáló mutáns törzs (JEK 1036/D1).

Az első képsorozat (12.A ábra) a vad típus kolóniájának növekedését mutatja be antibiotikummentes LB tápoldat áramoltatásakor. A sejtek morfológiája normális, és folyamatos osztódást mutatnak. Kb. 6 óra elteltével nőnek be a kamrát. Ezt követően már vannak olyan utódsejtek, amik kitolódnak a főcsatornába, és azokat az áramlás elviszi. Ezután megvizsgáltam, hogyan reagálnak a sejtek 100 ng/ml ciprofloxacin jelenlétére. Ez a koncentráció a mért MIC érték felett van. A ciprofloxacin gátolja a DNS girázt, ami a DNS szintézis gátlását eredményezi a replikáció és transzláció megszüntetésével. Ennek következtében a sejtosztódás elmarad. Az eszköz sejtekkel való feltöltését követő rövid adaptációs idő (kb. fél óra) elteltével az IPTG és LB tartalmú fecskendőt lecseréltem 100 ng/ml ciprofloxacin is tartalmazó LB-re. (A fecskendőcserét követően kb. egy óra volt szükséges ahhoz, hogy az eszközbe érjen a bemeneti csövön keresztül az antibiotikumos tápoldat.) A 12.B ábrán jól látható, hogy a vad típusú sejtek esetében már a 3. órában megjelenik az említett sejtosztódást gátló hatás. A sejtek megnyúlnak, nem tudnak kettéválni. Egy idő után elpusztulnak, ekkor a fluoreszcenciájuk még rövid ideig kitarthat, de nem sokkal a sejthalált követően elhalványulnak. Ez a halványulás a 9. órában már megfigyelhető.

A mutáns törzs mikroszkópos felvételei a 12. ábra C és D paneljein láthatók. Ebben az esetben az eszköz feltöltésekor a kamrákba kevesebb sejt került. A 12. C ábrán egyetlen sejtől alakul ki a mikropopuláció. Emiatt valamivel lassabban tölti fel a kamrát az amúgy is egy kicsivel lassabban osztódó mutáns törzs (11.A ábra). Lényegében a vad és a mutáns sejtek LB-ben nagy hasonlóságot mutatnak. A 12.D ábrán látható a mutáns törzs ciprofloxacinra adott válasza. A vad típushoz hasonlóan itt is megfigyelhető a sejtek megnyúlása, azonban ez a hatás kevésbé erőteljes. Normál méretű sejteket is találunk nagyobb számban. Illetve itt a kissé megnyúlt sejtek folyamatos osztódást mutatnak, feltöltik a kamrát, és utána is osztódnak. Ez arra utal, hogy az MIC mérés önmagában nem ad teljes képet a rezisztenciáról. Mindkét módszer (MIC mérés és mikrofluidikai eszközben indított mikroszkópos time-lapse kísérlet) kimutatta, hogy a mutáns törzs ciprofloxacinra kevésbé érzékeny, és a 100 ng/ml antibiotikum koncentráció mellett is képes a sejtosztódásra. Ugyanakkor a μ CM eszközzel végzett kísérlet kiegészítő információt szolgáltat a mutáns sejtek fenotípusát illetően.

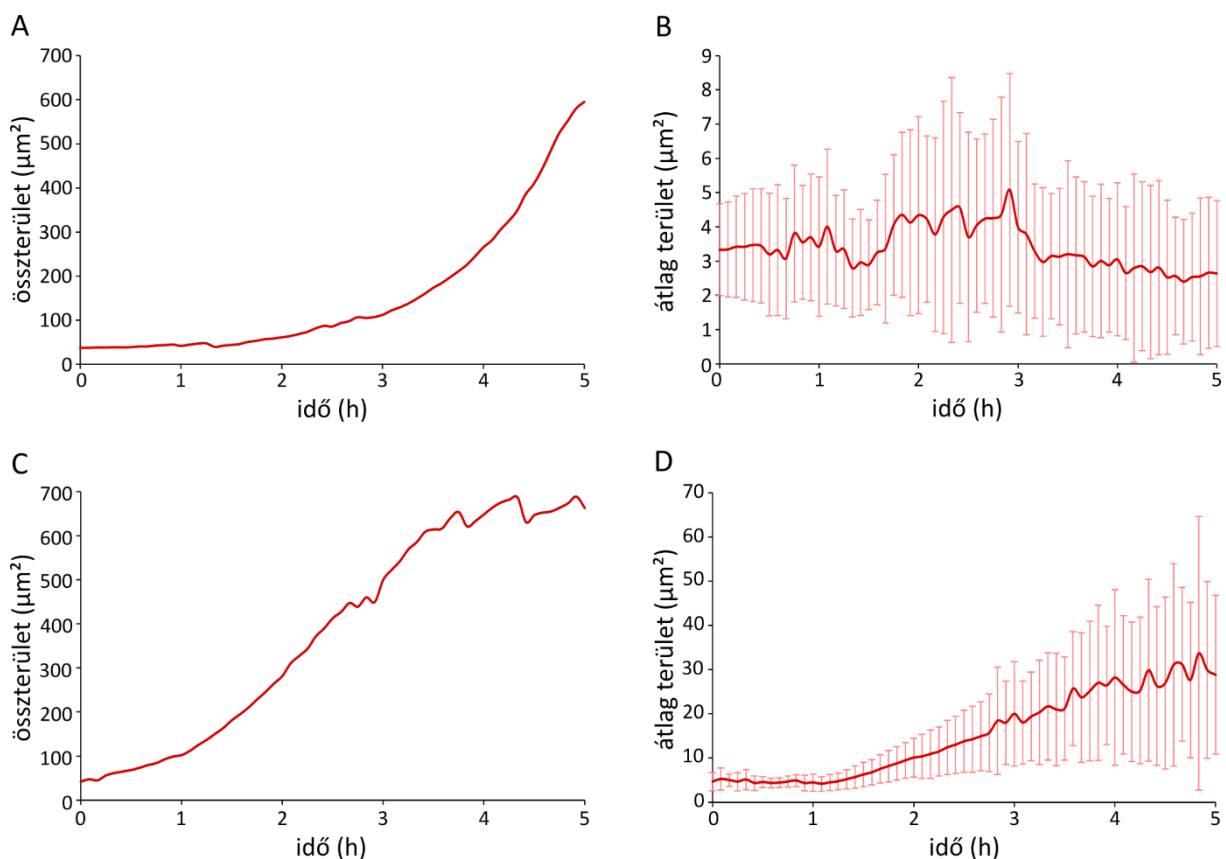


12. ábra. Fluoreszcens mikroszkóp felvételek meghatározott időpontokban a μ CM-ban osztódó *E. coli* mikrokolóniákról. (A) A vad típus mikroszkópos felvételei LB áramoltatásakor. (B) A vad típus mikroszkópos felvételei ciprofloxacint tartalmazó LB áramoltatása során. (C) A mutáns törzs mikroszkópos felvételei LB áramoltatásakor. (D) A mutáns törzs mikroszkópos felvételei ciprofloxacint tartalmazó LB áramoltatása során. A skála 20 μ m-nek felel meg.

Megfelelő képanalízissel követhetjük a baktériumpopuláció növekedését, illetve az egyes sejtek területének és fluoreszcenciájának változását. A 12. ábrán bemutatott kísérletsorozat kvantitatív kiértékelését mutatom be a továbbiakban (13., 14. ábrák és a Függelék 2. ábrái). A kiértékelés során csak az első 5 órától készítettem grafikonokat, mert ezt követően a főcsatornába kerülő utódsejteket, elsodorta az áramlás, és ez rontotta volna a mért görbét.

A 13. ábrán a vad típusú törzs kamrában történő viselkedését hasonlítom össze LB-ben antibiotikum nélkül (13.A, B ábrák), illetve ciprofloxacinn jelenlétében (13.C, D ábrák). Jól kivehető, hogy normál körülmény mellett a populáció növekedése exponenciális (13.A ábra). Antibiotikum hatására (13.C ábra) a sejtek összterülete 3 óránál elkezdi platózni, ami annak köszönhető, hogy a sejtek megnyúlnak, és egy idő után már nem változik a méretük,

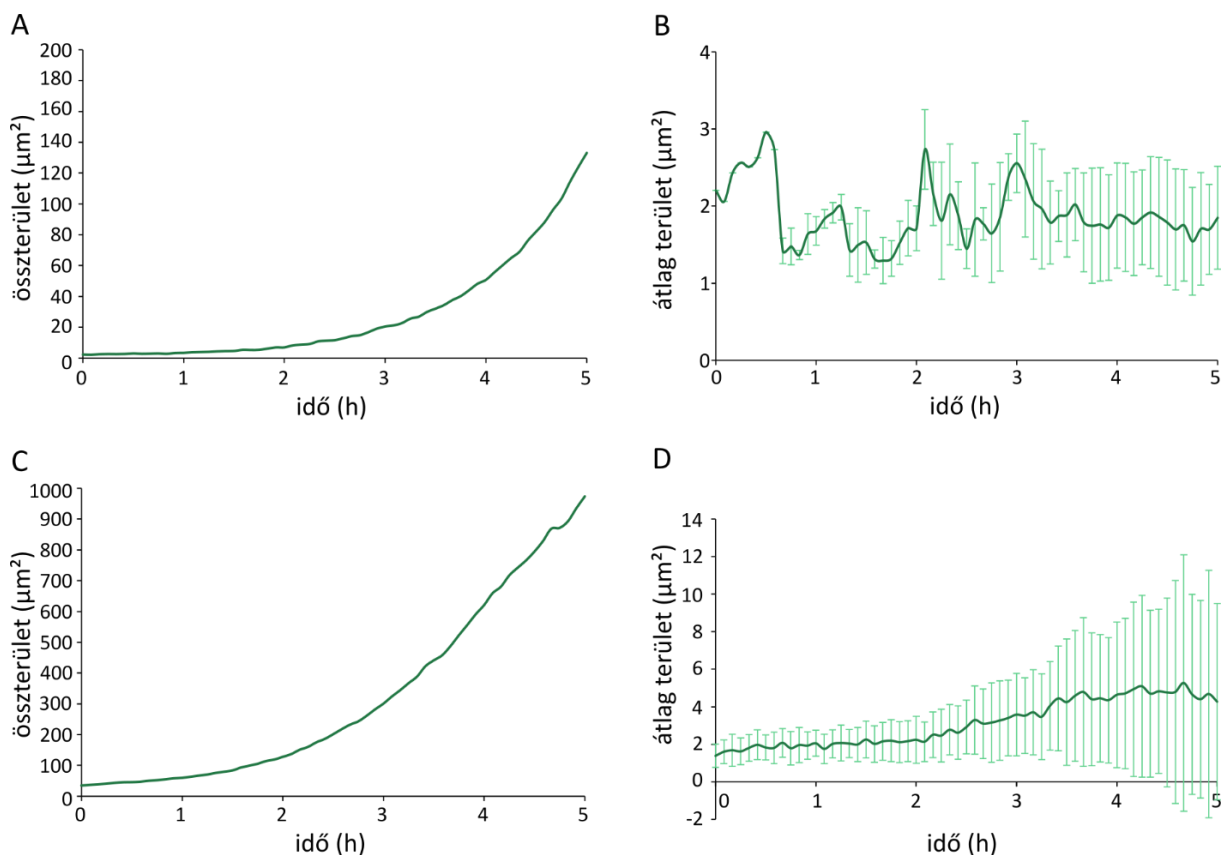
majd elkezdenek elpusztulni. A populáció területének növekedése mellett az egyes sejtek átlagos területét is meghatároztam (13.B, D ábrák). Mivel a sejtek szélessége kb. állandó ($0,8\ \mu\text{m}$), így a terület változásának követésével közvetve a sejtek hosszára vonatkozóan is kaphatunk információt. A 13. B ábrán látható vad típus sejtjeinek átlagterülete az idő függvényében LB tápoldatban: a kísérlet során végig $3,5\ \mu\text{m}^2$ körül mozog ez az érték. A 13.D ábrán a sejtek ciprofloxacinra adott megnyúlása látható: pár μm^2 -es kezdeti szakaszból kiindulva két óra elteltével folyamatos növekedés mutatkozik az átlagos sejt méretben. A sok megnyúlt sejt mellett elenyésző számban néha előfordulnak normál méretű sejtek is, melyek mérete nem változik a kezelés során. Ezek lehetnek akár perzisztens sejtek is. Ez további kísérletekkel lenne bizonyítható. Ha újra antibiotikummentes LB-re cserélném a fecskendőt és ezek a normál méretű sejtek osztódásnak indulnának, akkor valóban perzisztenciát figyelhetünk meg.



13. ábra. Vad típusú sejtek területeinek grafikonjai. (A) Sejtek összterülete a kamrában LB áramoltatásakor. (B) Egyes sejtek átlag területe LB áramoltatásakor. (C) Kamrában található sejtek összterülete ciprofloxacin mellett. (D) Egyes sejtek átlag területe ciprofloxacin mellett.

Ugyanezt az analízist elvégeztem a mutáns törzsszel is (14. ábra). Megfigyelhető a különbség a vad típushoz képest: ciprofloxacin hatására se csökken a populáció exponenciális növekedése (14.C ábra). Az egyes sejtek átlagos területe LB tápoldatban kicsivel kisebb a vad

típushoz képest, kb. $2 \mu\text{m}^2$ -esek. Ciprofloxacin tartalmazó LB mellett, a vad típushoz hasonlóan, itt is tapasztaltunk valamilyen mértékben emelkedést az átlagos sejterületben. Ez jelzi, hogy bár osztódnak a sejtek, még nem teljesen hatástalan a ciprofloxacin.

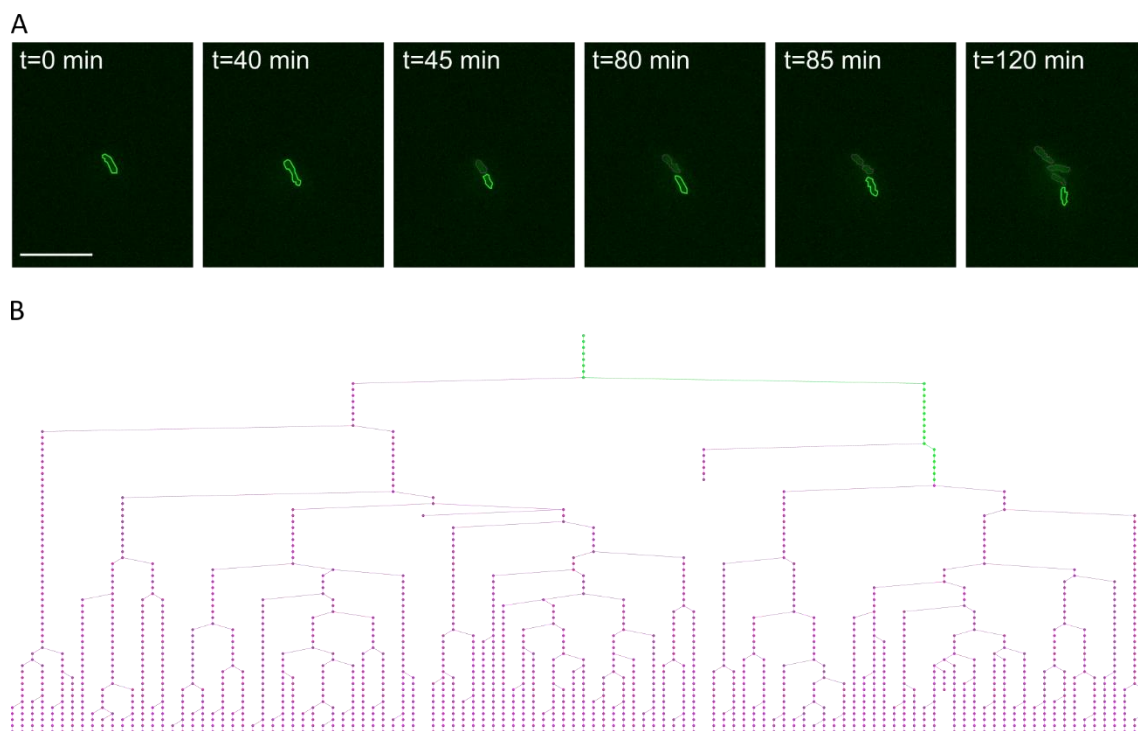


14. ábra. Mutáns sejtek területeinek grafikonjai. (A) Sejtek összterülete a kamrában LB áramoltatásakor. (B) Egyes sejtek átlag területe LB áramoltatásakor. (C) Kamrában található sejtek összterülete ciprofloxacin mellett. (D) Egyes sejtek átlag területe ciprofloxacin mellett.

A terület mérése mellett a fluoreszcencia intenzitás is mérhető a szegmentált sejteken. A Függelékben található intenzitás görbék esetén érdekesség, hogy mindkét törzs esetében az antibiotikum hatására kicsit emelkedik a fluoreszcencia intenzitás (Függelék 2.B ábra, Függelék 2.D ábra). Ennek az okát egyelőre nem tudjuk. A vad típus esetében a kísérlet előrehaladtával antibiotikum jelenlétében ez az intenzitás később csökkent, de ez nem látszik az első 5 órában, amit a grafikonon ábrázoltam.

A képanalízis során 4.6 fejezetben említett programok segítségével szegmentáltam a mikroszkóppal készített képeket. Betanítást követően a program algoritmus alapján elválasztja az egyedi sejteket. A 15.A ábrán látható, ahogy felismeri a sejtet (zöld) és annak utódait (rózsaszín). Megfelelően sűrűn készített felvételekből a leszármazási kapcsolatok is követhetők. A 15.B ábrán egy osztódási fát láthatunk. Ezzel az analízissel a generációs idő is meghatározható. Az analízis alapján az általunk használt *E. coli* törzs Kb. 45 percenként

osztódik 30 °C-on a mikrofluidikai eszközben. Ez a generációs idő megfelel a tenyésztőcsőben tapasztaltakkal. Előfordulhat, hogy a szegmentáló algoritmus nehezen választja el azokat az egyedeket, amelyek kisebb göcökbe tömörülnek, ezért kisebb hibával lehet csak kiértékelni a felvételeket. A munkám képanalízis része még fejlesztést igényel, de az eddigi eredmények is már elég szépen mutatják a várt populáció növekedési sémát.



15. ábra. *E. coli* sejtek követése Ilastik szoftver és a Fiji program TrackMate bővítményének alkalmazásával. (A) A mutáns sejtek LB-ben történő osztódásának követése szegmentálás után. A skála 10 μm -nek felel meg. (B) Leszármazási fa, ahol a zölden jelölt képkockák (5 perc telt el a képkockák közt) sejtje megegyezik az A panelen zölddel jelölt sejtrel.

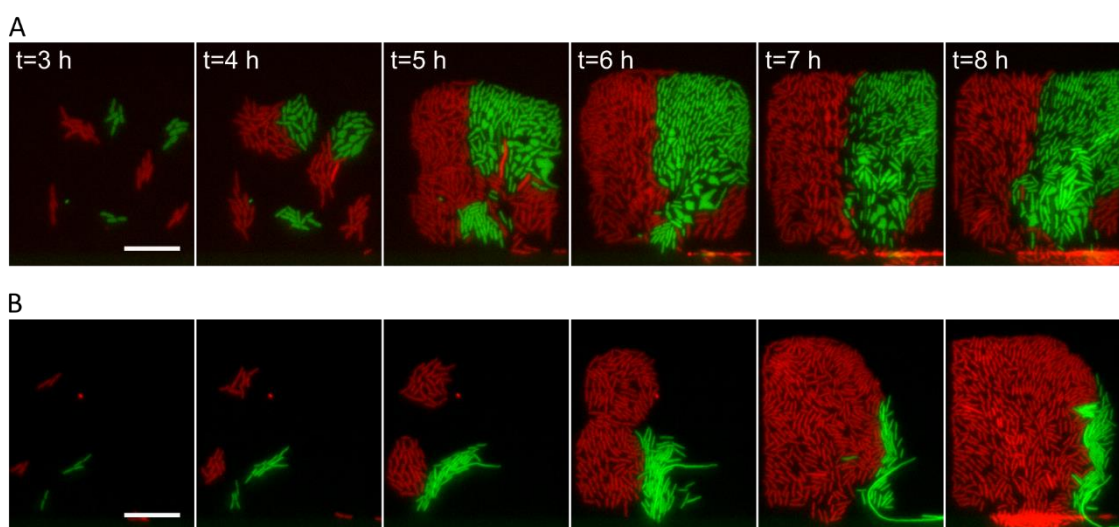
A kísérletek kapcsán problémát jelenthet a kamra bemeneténél időnként megjelenő biofilm réteg (12.A ábrán 9 óra). A lamináris áramlás parabolikus sebesség profilja miatt a fal mentén minimális az áramlás, ezért a sejtek le tudnak tapadni. Az általam használt baktériumtörzsek közül a vad típus hajlamosabb erre. Ez a biofilm gátolhatja a képanalízist, illetve a tápanyagok diffúzióját is. A későbbiekben a biofilmképződés kiküszöbölése érdekében nagyobb térfogatáramot tervezünk használni, illetve szóba került az eszköz felületkezelése is.

5.2.3. Kevert *E. coli* baktérium populációk a μCM eszközben

A különböző fluoreszcens jelölésnek köszönhetően lehetőség volt arra is, hogy a két törzssel vegyesen is feltöltssem az eszközt. Ennél a kísérletnél, csak LB-t áramoltattam a főcsatornán, mert itt egyelőre csak azt szeretnénk volna megfigyelni, hogy mennyire használható vegyes populációk vizsgálatára az eszköz. Bár nehéz azonos számú sejtekből kiindulni, megegyező

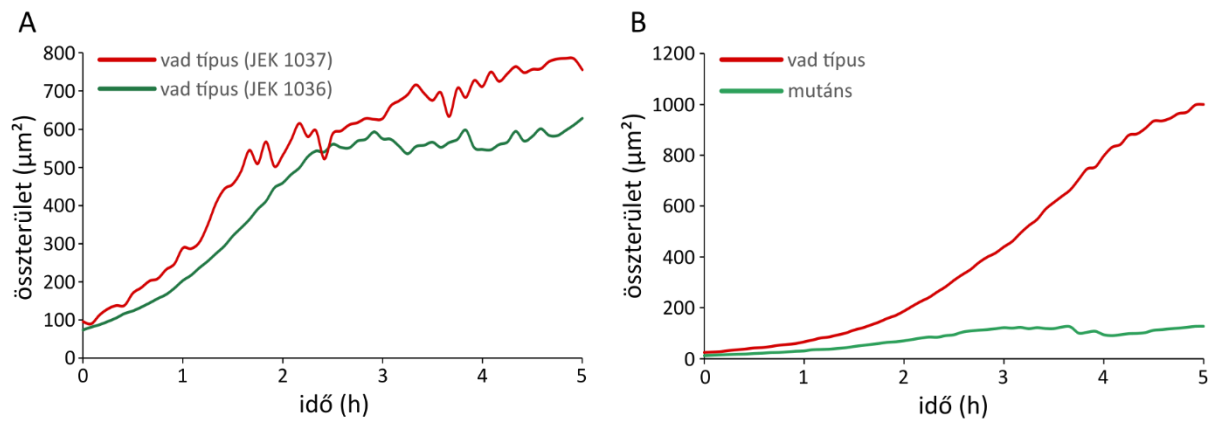
optikai denzitású kultúrákkal való feltöltéskor sikerült közel azonos sejtszámmal elindítani a kísérleteket. A különböző fluoreszcencia jelölésnek köszönhetően követhető a különböző törzsek sejtszámának növekedése.

Összekevertem a GFP- és RFP-jelölt vad típusú törzseket, majd feltöltöttem velük az eszközt. A két törzs a kamrát fele-fele arányban népesítette be. Ez látható a mikroszkópos felvételeken és a populációk növekedését mutató összterületek időbeni változását mutató görbékről is (16.A és 17.A ábrák). Egy másik kísérletben az RFP-jelölt vad típust összekevertem a zöld fluoreszcenciát mutató mutáns sejtekkel. Az eredményeimből az látszik, hogy a piros (vad típus) populáció elnyomta a zöld populációt (mutáns) (16.B és 17. B ábrák).



16. ábra. Vegyes populációk egy kamrán belül time-lapse mikroszkópos képeken. (A) Két vad típus egy kamrán belül. (B) Egy vad és egy mutáns törzs keveréke egy kamrán belül. A skála 20 μm -nek felel meg.

A 16. ábrához tartozó növekedési görbéket láthatjuk a 17. ábrán. A két vad típussal végzett kísérlet esetén, közel azonos sejtszámmal indult a kísérlet, és nagyjából egyformán emelkedett a két populáció területe. Ahogy a sejtek benőtték a kamrát, platóznak a terület változását mutató görbék (17.A ábra). A mutáns és vad típus összekeverésekor sokkal kisebb mértékben emelkedik a mutáns populáció mérete (17.B ábra). Itt további kísérletek szükségesek annak megállapítására, hogy mekkora a fitness előnye a vad típusnak ebben az antibiotikummentes közegben, mivel a két törzs kezdeti eloszlása a kamrán belül nem teljesen egyforma. Több kamrán is hasonló effektust (a mutáns sejtek visszaszorulását) láttunk az eszközön belül, de egyelőre ennek az egy kamrának a kiértékelésével foglalkoztam.



17. ábra. Populáció növekedési görbék összehasonlítása az összterületek alapján egy adott mikrofluidikai kamrán belül. (A) Két vad típus növekedési görbéje LB tápoldatban. (B) Egy vad és egy mutáns törzs növekedési görbéi LB tápoldatban.

A kevert populációkon végzett kezdeti kísérleteim arra utalnak, hogy az általam tervezett eszköz ígéretes kevert populációk tanulmányozására is. Ugyanakkor, ezekhez a kísérletekhez feltétlenül szükséges kidolgozni a sejtek betöltését illetően azt a módszert, amellyel közel azonos kiindulási sejtszámmal és eloszlással rendelkező populációkból tudunk kiindulni. Az általam vizsgált két baktériumtörzs egymás melletti növekedését és eloszlását ciprofloxacín gradiens jelenlétében a kutatócsoport már vizsgálta. Azt tapasztalták, hogy a két törzs megosztotta az életteret: alacsony (MIC alatti) ciprofloxacín koncentrációk esetén a vad típus populációja nagyobb léptékben növekedett, míg az MIC feletti koncentrációjú területeket a mutáns törzs hódította meg [16].

6. Összefoglalás

Tudományos Diákköri Kutatómunkám során terveztem, modelleztem és elkészítettem egy olyan mikrofluidikai eszközt, amivel kisméretű baktériumpopulációk vizsgálhatók egysejt szinten. Ez a microcolony machine elnevezést kapta. Az eszköz oldalkamráiban a sejtek zavartalanul osztódhatnak, és környezetük tetszőlegesen változtatható a főcsatornában áramló folyadék lecserélésével.

Munkám során a tervezéstől egészen az eszköz baktériumokkal történő teszteléséig, a kísérletek lehetséges kvantitatív kiértékeléséig eljutottam. Első lépésként az eszköztervezéssel és a szimulációval foglalkoztam. Ekkor állt össze a μ CM elképzelése. Sikerült optimalizálni az eszköz paramétereit. Modelleztem az áramlástani viszonyokat és a folyadék cseréjét az eszközön belül. A tesztek követően elkészítettem az eszköz öntőformáját, majd magát az eszközt is PDMS-ből. Ehhez elsajátítottam olyan alapvető mikrofabrikációs technikákat, mint a standard fotolitográfia, lézerírás és lágy litográfia.

A kísérleteim során a $60\text{ }\mu\text{m} \times 60\text{ }\mu\text{m}$ méretű oldalkamrákkal dolgoztam, amelyek $0,8\text{ }\mu\text{m}$ magasak voltak. Az egysejtrétegnek köszönhetően hatékonyan tudtam mikroszkóppal követni a kamrákban a baktériumpopulációt. Vad típusú és mutáns törzsekkel is végeztem kísérleteket antibiotikummentes és antibiotikum tartalmú LB oldattal. Megfigyelhettem a sejtek morfológiáját populáció és egyedi sejtek szintjén is. Információt kaptam a törzsek generációs idejéről, ami alátámasztotta a hagyományos OD mérés módszerével is megfigyelt osztódási időt. A képanalízis során alkalmazott szegmentálási algoritmusnak köszönhetően kvantitatív információt nyertem a sejtek méreteiről is, valamint leszármazási fát is kihozhattam a kísérletek eredményeiből. A ciprofloxacinra ellenálló mutáns törzs esetében az MIC mérést kiegészítően megfigyeltem, hogy bár az antibiotikum jelenléte csak kis mértékben befolyásolja a populáció növekedését, a sejtek morfológiája megváltozik. Az eszköz segítségével jól látható a morfológiai és sejtosztódásbeli különbség a vad és a mutáns sejtek között. Mindezek mellett az eszköz kevert baktériumpopulációk kölcsönhatásának vizsgálatára is alkalmas lehet.

Összességében ígéretesnek tűnik a megtervezett eszközöm, de még a jövőben szeretném tovább folytatni a fejlesztését. Remélhetőleg a későbbiekben mélyebben is foglalkozhatok majd az *E. coli* sejtek fenotípusos heterogenitásának vizsgálatával.

7. További terveim

A későbbiekben is szeretném a Biofotonika és Biomikrofluidika Kutatócsoportnál folytatni a munkámat, ahol a microcolony machine továbbfejlesztése lenne a fő célom.

Az egyik lehetséges irány az lenne, hogy több bemenettel rendelkező csipet terveznék, hogy ne kelljen cserélgetni a fecskendőpumpában a fecskendőket a környezet változtatásához. Ebben az esetben két pumpát használnánk, azok programozása is hozzátartozna ehhez a feladathoz.

Az MIC mérések során többféle antibiotikum gátlási koncentrációját megvizsgáltam, azonban a kísérleteknél csak a ciprofloxacinnal dolgoztam, és azzal is csak 100 ng/ml koncentrációval. Mind az ampicillint, kanamicint és gentamicint is lehetne mikroszkóp alatt vizsgálni. A csoport tervezi, hogy időben folyamatosan (lineárisan) emelkedő antibiotikum koncentráció hatását, illetve periodikusan változó antibiotikum koncentrációk hatását teszteli egyes sejtek szintjén. Erre az általam tervezett rendszer alkalmas lehet.

Ezek mellett szeretném a továbbiakban az áramlással kapcsolatosan is kitapasztalni azt az optimális sebességet, aminél már kevésbé tapadnának le a sejtek. A lamináris áramlás parabolikus sebességprofilja miatt a falak mentén kevésbé viszi el a sejteket a folyadék. Ez biofilmképződéshez vezet, amire a vad típusú sejtek hajlamosabbak is. Hátránya a biofilmnek, hogy akadályozza a diffúziót a kamrákban lévő sejtek felé, így nehezíti az antibiotikumos teszteket. Valószínűleg segítene ennek a tényezőnek a csökkentésében, ha magasabb áramlási sebességgel dolgoznánk. Akár használhatnánk felületkezelő anyagokat is, ezek azonban szintén befolyással lehetnek a sejtekre is. Mindezen kérdések megoldására szeretnék választ találni majd a jövőben.

Irodalomjegyzék

- [1] F. Wu és C. Dekker, „Nanofabricated structures and microfluidic devices for bacteria: from techniques to biology”, *Chem. Soc. Rev.*, köt. 45, sz. 2, o. 268–280, jan. 2016, doi: 10.1039/C5CS00514K.
- [2] M. Ackermann, „A functional perspective on phenotypic heterogeneity in microorganisms”, *Nat. Rev. Microbiol.*, köt. 13, sz. 8, o. 497–508, aug. 2015, doi: 10.1038/nrmicro3491.
- [3] P. Wang és mtsai., „Robust Growth of Escherichia coli”, *Curr. Biol.*, köt. 20, sz. 12, o. 1099–1103, jún. 2010, doi: 10.1016/j.cub.2010.04.045.
- [4] N. Q. Balaban, J. Merrin, R. Chait, L. Kowalik, és S. Leibler, „Bacterial Persistence as a Phenotypic Switch”, *Science*, köt. 305, sz. 5690, o. 1622–1625, szept. 2004, doi: 10.1126/science.1099390.
- [5] R. Rusconi, M. Garren, és R. Stocker, „Microfluidics expanding the frontiers of microbial ecology”, *Annu. Rev. Biophys.*, köt. 43, o. 65–91, 2014, doi: 10.1146/annurev-biophys-051013-022916.
- [6] M. T. Madigan, *Brock Biology of Microorganisms*. Pearson/Benjamin Cummings, 2009.
- [7] „Molecular Expressions Cell Biology: Bacteria Cell Structure”. Elérés: 2024. november 6. [Online]. Elérhető: <https://micro.magnet.fsu.edu/cells/bacteriacell.html>
- [8] A. Dal Co, M. Ackermann, és S. van Vliet, „Metabolic activity affects the response of single cells to a nutrient switch in structured populations”, *J. R. Soc. Interface*, köt. 16, sz. 156, o. 20190182, júl. 2019, doi: 10.1098/rsif.2019.0182.
- [9] B. Ughy és mtsai., „Reconsidering Dogmas about the Growth of Bacterial Populations”, *Cells*, köt. 12, sz. 10, Art. sz. 10, jan. 2023, doi: 10.3390/cells12101430.
- [10] J. L. Martinez és F. Baquero, „Mutation Frequencies and Antibiotic Resistance”, *Antimicrob. Agents Chemother.*, köt. 44, sz. 7, o. 1771–1777, júl. 2000, doi: 10.1128/aac.44.7.1771-1777.2000.
- [11] S. Moreno-Gámez, A. Dal Co, S. van Vliet, és M. Ackermann, „Microfluidics for Single-Cell Study of Antibiotic Tolerance and Persistence Induced by Nutrient Limitation”, in *Bacterial Persistence: Methods and Protocols*, N. Verstraeten és J. Michiels, Szerk., New York, NY: Springer US, 2021, o. 107–124. doi: 10.1007/978-1-0716-1621-5_8.
- [12] G. M. Whitesides, „The origins and the future of microfluidics”, *Nature*, köt. 442, sz. 7101, o. 368–373, júl. 2006, doi: 10.1038/nature05058.
- [13] K. Ren, J. Zhou, és H. Wu, „Materials for Microfluidic Chip Fabrication”, *Acc. Chem. Res.*, köt. 46, sz. 11, o. 2396–2406, nov. 2013, doi: 10.1021/ar300314s.
- [14] X. Wang, Z. Liu, és Y. Pang, „Concentration gradient generation methods based on microfluidic systems”, *RSC Adv.*, köt. 7, sz. 48, o. 29966–29984, 2017, doi: 10.1039/C7RA04494A.
- [15] F. J. H. Hol és C. Dekker, „Zooming in to see the bigger picture: Microfluidic and nanofabrication tools to study bacteria”, *Science*, köt. 346, sz. 6208, o. 1251821, okt. 2014, doi: 10.1126/science.1251821.
- [16] K. Nagy és mtsai., „Emergence of Resistant Escherichia coli Mutants in Microfluidic On-Chip Antibiotic Gradients”, *Front. Microbiol.*, köt. 13, márc. 2022, doi: 10.3389/fmicb.2022.820738.
- [17] Q. Zhang és mtsai., „Acceleration of emergence of bacterial antibiotic resistance in connected microenvironments”, *Science*, köt. 333, sz. 6050, o. 1764–1767, szept. 2011, doi: 10.1126/science.1208747.

- [18] Á. Ábrahám és mtsai., „Single-cell level LasR-mediated quorum sensing response of *Pseudomonas aeruginosa* to pulses of signal molecules”, *Sci. Rep.*, köt. 14, sz. 1, o. 16181, júl. 2024, doi: 10.1038/s41598-024-66706-6.
- [19] P. Allard, F. Papazotos, és L. Potvin-Trottier, „Microfluidics for long-term single-cell time-lapse microscopy: Advances and applications”, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, köt. 10, okt. 2022, doi: 10.3389/fbioe.2022.968342.
- [20] G. Stefano Ugolini, M. Wang, E. Secchi, R. Pioli, M. Ackermann, és R. Stocker, „Microfluidic approaches in microbial ecology”, *Lab. Chip*, köt. 24, sz. 5, o. 1394–1418, 2024, doi: 10.1039/D3LC00784G.
- [21] D. D. Carlo, L. Y. Wu, és L. P. Lee, „Dynamic single cell culture array”, *Lab. Chip*, köt. 6, sz. 11, o. 1445–1449, okt. 2006, doi: 10.1039/B605937F.
- [22] D. Wlodkowic, S. Faley, M. Zagnoni, J. P. Wikswo, és J. M. Cooper, „Microfluidic Single-Cell Array Cytometry for the Analysis of Tumor Apoptosis”, *Anal. Chem.*, köt. 81, sz. 13, o. 5517–5523, júl. 2009, doi: 10.1021/ac9008463.
- [23] E. Széles és mtsai., „Microfluidic Platforms Designed for Morphological and Photosynthetic Investigations of *Chlamydomonas reinhardtii* on a Single-Cell Level”, *Cells*, köt. 11, sz. 2, Art. sz. 2, jan. 2022, doi: 10.3390/cells11020285.
- [24] Z. Pilát és mtsai., „Microfluidic Cultivation and Laser Tweezers Raman Spectroscopy of *E. coli* under Antibiotic Stress”, *Sensors*, köt. 18, sz. 5, Art. sz. 5, máj. 2018, doi: 10.3390/s18051623.
- [25] J. L. Connell, A. K. Wessel, M. R. Parsek, A. D. Ellington, M. Whiteley, és J. B. Shear, „Probing Prokaryotic Social Behaviors with Bacterial “Lobster Traps””, *mBio*, köt. 1, sz. 4, o. 10.1128/mbio.00202-10, okt. 2010, doi: 10.1128/mbio.00202-10.
- [26] J. Männik, R. Driessen, P. Galajda, J. E. Keymer, és C. Dekker, „Bacterial growth and motility in sub-micron constrictions”, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, köt. 106, sz. 35, o. 14861–14866, szept. 2009, doi: 10.1073/pnas.0907542106.
- [27] D. Yang, A. D. Jennings, E. Borrego, S. T. Retterer, és J. Männik, „Analysis of Factors Limiting Bacterial Growth in PDMS Mother Machine Devices”, *Front. Microbiol.*, köt. 9, máj. 2018, doi: 10.3389/fmicb.2018.00871.
- [28] A. Dal Co, S. van Vliet, és M. Ackermann, „Emergent microscale gradients give rise to metabolic cross-feeding and antibiotic tolerance in clonal bacterial populations”, *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, köt. 374, sz. 1786, o. 20190080, okt. 2019, doi: 10.1098/rstb.2019.0080.
- [29] I. Wiegand, K. Hilpert, és R. E. W. Hancock, „Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances”, *Nat. Protoc.*, köt. 3, sz. 2, o. 163–175, febr. 2008, doi: 10.1038/nprot.2007.521.
- [30] M. Kreft, M. Lukšič, T. M. Zorec, M. Prebil, és R. Zorec, „Diffusion of D-glucose measured in the cytosol of a single astrocyte”, *Cell. Mol. Life Sci. CMLS*, köt. 70, sz. 8, o. 1483–1492, ápr. 2013, doi: 10.1007/s00018-012-1219-7.
- [31] D. Qin, Y. Xia, és G. M. Whitesides, „Soft lithography for micro- and nanoscale patterning”, *Nat. Protoc.*, köt. 5, sz. 3, o. 491–502, márc. 2010, doi: 10.1038/nprot.2009.234.

Köszönetnyilvánítás

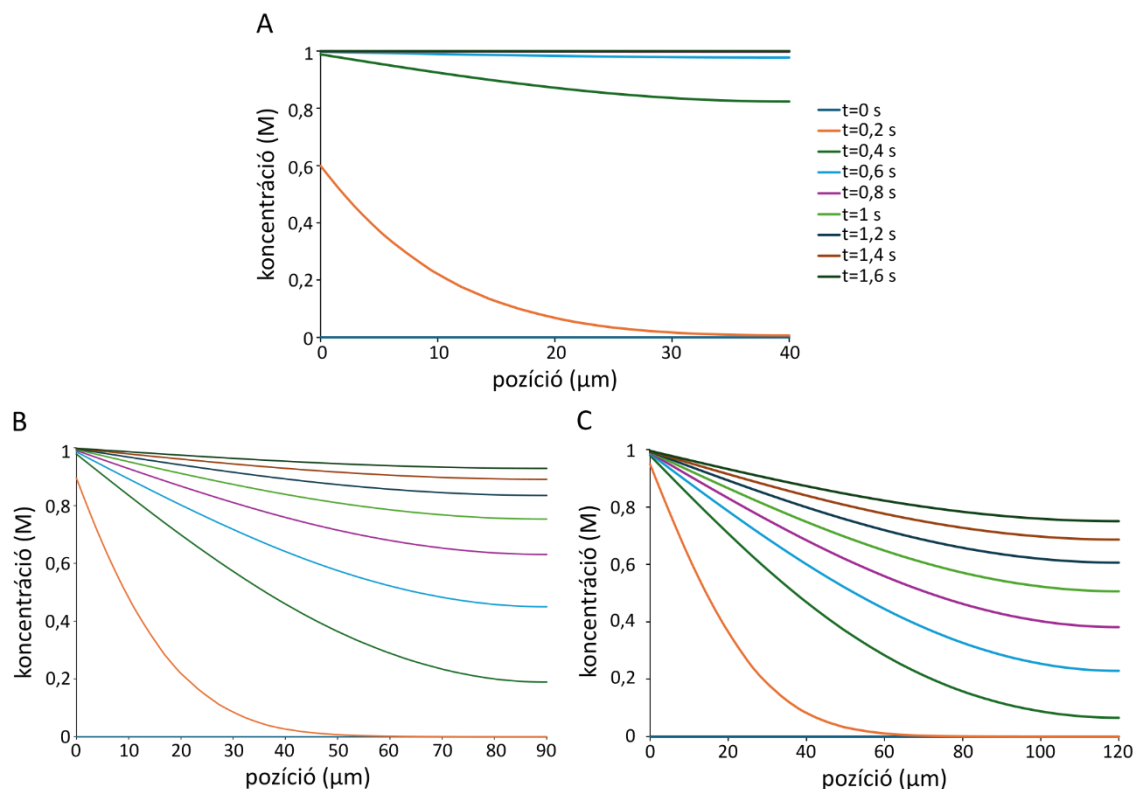
Ezúton szeretném megköszönni a dolgozatom elkészítésében nyújtott rengeteg segítséget és támogatást Dr. Galajda Péter tudományos főmunkatársnak és kutatócsoportja minden tagjának.

Legfőképpen témavezetőimnek, Dr. Nagy Krisztinának, aki a csoport tudományos munkatársa és Dr. Ábrahám Ágnes tudományos segédmunkatársnak. Hálával tartozom, hogy csatlakozhattam a csoporthoz és olyan sokat tanulhattam a laboratóriumi munkavégzésről. Egy új oldaláról is bemutatattok nekem a biológia tudományát, és hogy miként dolgozhat együtt más-más területen végzett kutató. Nektek köszönhetően rengeteget fejlődtem és bátorságot kaptam az önálló munkavégzéshez.

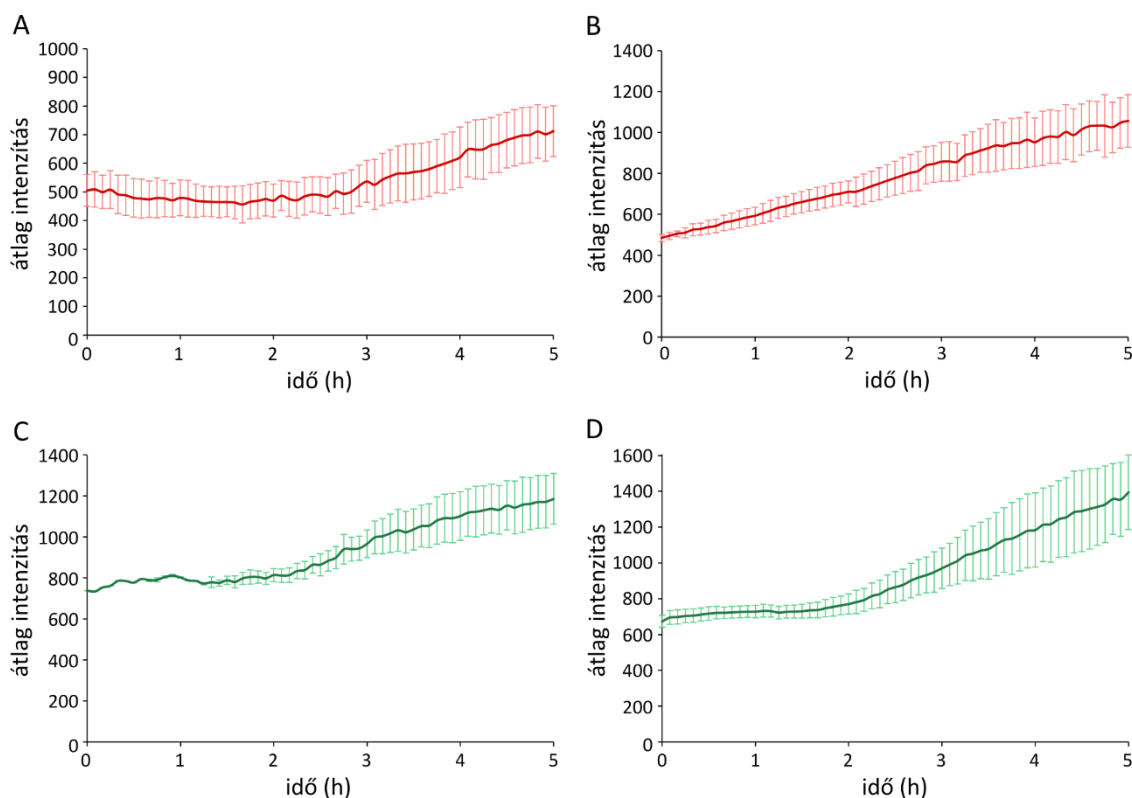
Külön köszönettel tartozom Dér Lászlónak a kiértékeléshez és a számítógépes programok használatához nyújtott segítségéért.

Hálás vagyok, hogy szakmai tapasztalatuknak és a belém fektetett bizalmuknak köszönhetően lehetőségem nyílt részt venni alapszakos hallgatóként egy TDK konferencián.

Függelék



1. ábra. Glükóz koncentrációjának változása a 60 μm bemeneti nyílású oldalkamrákban 1M-os glükózoldat lépcsőfüggvényben történő alkalmazásakor. A görbék 0,2 másodpercenkénti változásokat jelölnek 0-1,6 s közt a kamrák közepén a bemeneti nyílásától a zárt végükig húzott egyenes mentén. (A) 60 μm $\times$ 40 μm kamra; (B) 90 μm $\times$ 60 μm kamra; (C) 120 μm $\times$ 60 μm kamra.



2. ábra. Sejtek átlagintenzitásának követése a kamrában. (A) Vad típusú törzs LB-ben. (B) Vad típusú törzs ciprofloxacint tartalmazó LB-ben. (C) Mutáns törzs LB-ben. (D) Mutáns törzs ciprofloxacint tartalmazó LB-ben.

Nyilatkozat

Alulírott, Urbán Anna biológia BSc szakos hallgató, kijelentem, hogy a OTDK dolgozatban ismertettek saját munkám eredményei, és minden felhasznált nem saját munkából származó eredmény esetén hivatkozással jelöltem annak forrását.

Szeged, 2025. 01. 10.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Urbán Anna', is positioned above a horizontal line.

aláírás