

TDK DOLGOZAT

Mikropipettás cseppentés kritikus görbületi nyomásának vizsgálata

Gerecsei Tamás

Fizika Bsc., Biofizika szakirány

2. évfolyam



Témavezető:

Szabó Bálint

ELTE Biológiai Fizika Tanszék

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	2
1.1. Mikrofluidika	2
1.1.1. A tintasugaras nyomtató	3
1.1.2. Lab-on-a-chip	4
1.2. Single-cell technológiák	4
1.2.1. A fluoreszcensen aktivált sejtválogatás	5
1.2.2. Egyedi sejtek válogatása mikroszkóppal	7
1.3. Kapillárisok	8
1.4. Az illeszkedési szög	8
2. Eszközök és módszerek	10
3. Eredmények	10
3.1. A kísérleti elrendezés	10
3.2. A görbületi sugár és a hidrosztatikai nyomás számolása	11
3.3. A hidrosztatikus nyomás és a cseppek görbületének összevetése	12
3.4. A mért adatok	13
3.4.1. Mérés vízzel	13
3.4.2. Mérés etanollal	14
3.4.3. Mérés szilikonolajjal	15
3.4.4. Kísérlet az automatizált mikropipettával	16
3.5. Diskusszió	17
3.5.1. Eltérés a kísérleti eredmények és a Laplace törvény között	17
3.5.2. Az üveg és a víz közötti érintkezési szög hatása	18
3.5.3. Nem statikus körülmények	20
3.5.4. Párolgás hatása a mért nyomásra	22
3.5.5. A cseppátmérő hatása a felületi feszültségre	23
3.6. Összefoglalás	23
4. Köszönetnyilvánítás	25

1. Bevezetés

1.1. Mikrofluidika

Az elmúlt 30 évben a mikrofluidika területe hatalmas fejlődésen ment keresztül. Eleinte a tintasugaras nyomtatók elterjedése és az űrtechnológia ösztönözte a haladást, mára azonban főleg a biotechnológia a meghatározó alkalmazás. A mikrofluidika alkalmazása sok tekintetben kézenfekvő a biológiai kutatások tekintetében. Főképpen azért, mert a vizsgálandó minták folyékony állapotúak, a sejtek vizes alapú közegben élnek. További előnyként elmondható, hogy a szükségszerűen kis térfogatok miatt, a vizsgálatok reagensigénye alacsony, és sohasem szükséges nagy mennyiségű természetkárosító anyaggal dolgozni.(1)

Az alapvető koncepció az, hogy a vizsgálandó anyagokat kis térfogatban ($\mu\text{l} - \text{fl}$) juttatják a mikrofluidikai eszközökbe, ahol az csövekben áramolva halad, keveredik össze reagensekkel, illetve megy át a kívánt változtatásokon. Ezen rendszerekkel elérhető a mérések párhuzamosítása, azaz az egyszerre sok mintával való munka, illetve ezen minták több különböző tulajdonságának szimultán mérése. A cél a „single-cell, single-molecule” szintű manipuláció és analízis. Lehetővé válnak az ún. high-throughput kísérletek, amelyek nagy szerepet játszanak a szervezetre kedvező hatást kifejtő molekulák (gyógyszerek) azonosításában is.

A mikrofluidika legelterjedtebb változata az ún. „Continuous-flow microfluidics” (folyamatos-áramlás). Az ilyen rendszerben folyamatos áramlás áll fent, ezzel szemben a „Droplet-based microfluidics” technológiák esetében a folyadékot diszkrét cseppekként kezelik. Az utóbbi években feltörekvő alternatíva az ún. „Digital microfluidics”, ahol a folyadékkal érintkező felületek nedvesítési tulajdonságait elektromos térrel befolyásolják(2).

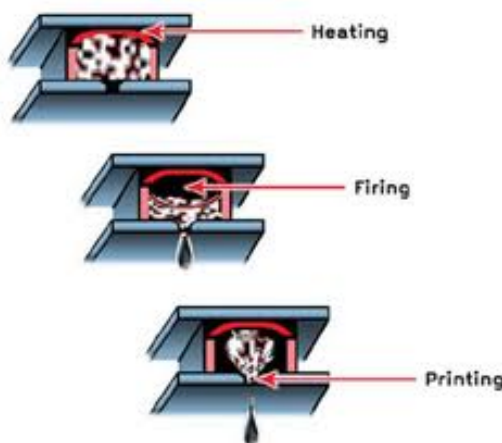
Mindezek mellett a mikrofluidika területe is tele van kihívásokkal. A legfőbb probléma, hogy a hagyományosan nagyméretű eszközöket mint például pumpákat, nyomásszabályozókat, szelepeket, mikrométeres méretekben kell megépíteni, egymáshoz kapcsolni, és egy eszközre integrálni. Számolni kell továbbá a folyadék és a rendszer között fellépő adhézión erőkkel is, amik nagy mértékben befolyásolják a mozgást ilyen kis méretek mellett. A térfogati erők elhanyagolhatóvá válnak a felületi erők mellett. Éppen ezen problémát kezeli (bár nem oldja meg teljesen) a csepp alapú technológia. Ha ugyanis a folyadék folytonos áramlás helyett cseppekben megy végig az eszköz csöveiben, lecsökken a szilárd fal és a folyadék érintkezési felülete. További előnye, hogy ilyenkor kisebb mértékben abszorbeálódnak a reagáló molekulák az eszköz falára. A cseppek közötti teret ilyenkor más folyadékkal vagy gázzal töltik ki.

1.1.1. A tintasugaras nyomtató

A mikrofluidika a tintasugaras nyomtatók tökéletesítése során hatalmas fejlődésen ment keresztül, ezért érdemes közelebbről is megvizsgálni a működé-

süket. Ezen a területen számos kutatás, és még annál is több szabadalom született, hiszen a nyomdai és irodatechnikai alkalmazások komoly piaci jelenléttel bírnak.

A legrégebbi technológia az ún. continuous inkjet (folytonos tintasugár), amelynél a tintát a tárolórekeszből egy mikroszkopikus, nagy sebességű sugárban lövellik ki, majd ezt egy piezoelektromos kristály által keltett ultrahang cseppekre bontja. Ezen cseppeket egy elektróda még képződésük közben elektromosan feltölti azért, hogy a következő lépésben a sugarat elektromos térrel tudják eltéríteni, így létrehozva a kívánt mintázatot a papíron. Ugyanez a működési elve a később tárgyalandó FACS-berendezésnek is.



1. ábra. A termális nyomtatófej működése(3)

Manapság azonban, a legtöbb irodai nyomtató termális vagy piezoelektromos technikát használ. Az előbbi esetén a tinta egymás mellé helyezett kis tárolókban van elhelyezve. Nyomtatáskor egy elektromos jel fut végig a tárolókhoz kapcsolt melegítő egységeken. A hirtelen hőmérséklet-növekedés miatt a tinta elpárolog, és egy buborékot alkot, aminek köszönhetően a tárolóban megnő a nyomás, és egy csepp tinta kilövellődik a papírra. Ezzel szemben a piezoelektromos technológiában (melyet főleg az ipari nyomtatókban használnak) a melegítő egységek helyét piezoelektromos kristályok veszik át. Amikor az elektromos jel végigfut a kristályokon, azoknak megváltozik az alakja, és így megnövekszik a nyomás a tárolóban.

Mindegyik típusú nyomtatófejben tehát központi szerepet játszik a kapillárisokból kibocsájtott kis cseppek viselkedése.

1.1.2. Lab-on-a-chip

A mikrofluidika biológiai alkalmazásai közül talán a legizgalmasabb, az ún. lab-on-a-chip. Ezen, kissé futurisztikus technológia célja az, hogy olyan vizsgálatokat, amelyekhez hagyományosan egy jól felszerelt laboratóriumra, és hozzáértő személyzetre van szükség, egy bankkártya méretű vagy annál kisebb chipen végezzék el. Ezen koncepciónak számos nyilvánvaló előnye



2. ábra. Egy tipikus lab-on-a-chip(4)

van, és új távlatokat nyit a humán diagnosztikában(5). Ma már lehetséges olyan specifikus eszközök építése, amelyek néhány csepp vérből, vagy egyéb emberi váladékból képesek az AIDS (6), a malária (7) illetve más, bakteriális fertőzés kimutatására. Mindez percek alatt olcsón és biztonságosan elvégezhető. Egyes esetekben semmiféle labortechnikai végzettség sem szükséges. További előnyként említhető, hogy az ilyen készülékek energiaigénye minimális, képesek akkumulátorral üzemelni ott is, ahol a körülmények nem teszik lehetővé más elektromos energiaforrás alkalmazását.

A fejlődő országokban, illetve más, infrastruktúrával nem vagy alig rendelkező közösségekben nagy szükség van az ilyen vizsgálatokra. További alkalmazási terület lehet a hadiipar, hiszen a hadszíntéren állomásozó katonák egészségi állapotát is praktikusán lehet monitorozni ily módon.

1.2. Single-cell technológiák

A sejt az élő organizmusok alapvető egysége. Tanulmányozásának természetes eszköze a mikrofluidika, hiszen az emlős sejtek szokásos mérete $10 - 20\mu m$,

amely éppen a mikrofluidikai rendszerek szokásos karakterisztikus mérete. A legutóbbi időkig sejtek RNS és DNS szekvenciáját csak nagy, sok sejtet tartalmazó mintákban tanulmányozták, mára azonban a technológia fejlődése elérte azt a szintet, amikor a pontos DNS, RNS mintázat egyedi sejtekből is kimutatható. Akár egyetlen sejtől egyszerre meg lehet mérni a DNS, többféle RNS és egyes fehérjék mennyiségét(8). Továbbá vizsgálható a teljes RNS expresszió, amely megadja a sejt fenotípusát. Egy fejlődő embriót vagy egy tumort sokféle sejt komplex struktúrákba rendeződve alkot. Lehetséges, hogy az egész szövet egyes tulajdonságait a sejtek egy alig észrevehető hányada határozza meg. Annak érdekében, hogy megértsük a szövetek fejlődését és a sejtek közötti kapcsolatokat, a sokféle sejtet egyenként is érdemes megvizsgálni és csoportosítani(9).

Hasonló igényeket a mikrobiológiában is találhatunk: a legtöbb, környezetből begyűjtött mintában, a jelenlévő fajok kb 1%-a tenyészthető in vitro. Ezért fontos, hogy egyesével lehessen kiválogatni a mikrobákat, és így tanulmányozni az úgynevezett "biológiai sötét anyagot".

Az egyedi sejtek vizsgálata a genetikában is fontos szerepet játszik(10). Napjainkban már világos, hogy a gének átírása RNS-sé meglehetősen zajos az egyedi sejtek szintjén. Ennek oka, hogy az RNS transzkripció nem folyamatosan, hanem "burst"-ökben (ugrásokban) játszódik le. Ezen sztochasztikus folyamat megértésében is lényeges szerepet kap az egyedi sejtek vizsgálata. Napjainkban az egyedi sejtek vizsgálata a biofizika egyik legnagyobb kihívásai közé tartozik. A problémakör aktualitását mi sem jelzi jobban, mint hogy a Nature Methods a 2013-as év kísérleti módszerének választotta a single-cell technológiát.

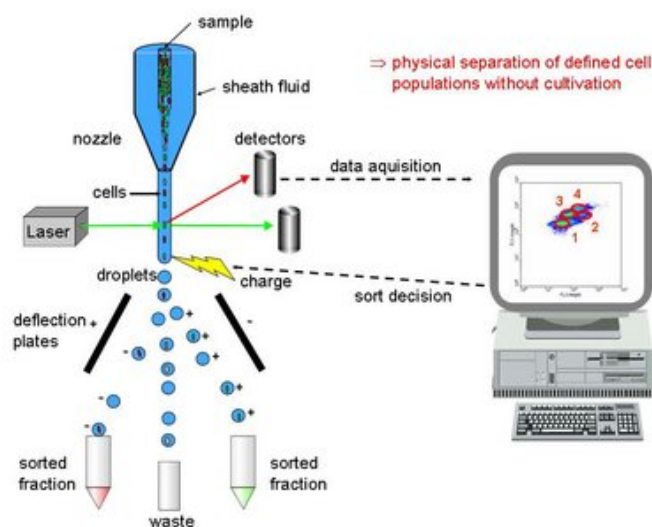
A sejtek manipulációjára, válogatására számos módszert feltaláltak már, ezek közül a legelterjedtebb a FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting)

1.2.1. A fluoreszcensen aktivált sejtválogatás

A FACS módszert az 1960-as évek végén találták fel. A célja, hogy fluoreszcensen megjelölt sejteket lehessen kiválogatni egy sejtet tartalmazó szuszpenzióból úgy, hogy azok túl is éljék a folyamatot. Elterjedtségét mutatja, hogy 2002-ben 30000-re becsülték a világon használt FACS készülékek számát(11). Azóta ez a szám tovább nőtt.

A működési elvük a következő: egy kis átmérőjű ($50-100\mu m$) mikropipettából egyedi sejteket tartalmazó szuszpenziót bocsátanak ki sugárban. A sugarat vibráció segítségével cseppekre bontják, méghozzá úgy, hogy nagy valószínűséggel minden egyes cseppben egy sejt legyen. Mielőtt azonban ez megtörténne, a sugarat lézerrel világítják meg. Ez a lézer egyrészt szóródik a sejteken, másrészt gerjeszti a sejtekben jelen lévő fluoreszcens markereket, melyek így

(más hullámhosszú) fényt bocsátanak ki. Ezeket a jeleket detektorok fogják fel, és egy szoftver értékeli ki. Ezután a cseppek egy gyűrűn haladnak át, ami képes elektromosan feltölteni őket, amiket így a lejjebb található eltérítő lemezek között kialakuló elektromos tér térít el az egyes tárolókba. A detektor által szolgáltatott információ alapján a kiválogatandó sejteket tartalmazó cseppeknek más töltést adnak, így más tárolóba kerülnek.



3. ábra. A FACS vázlatos működése(12)

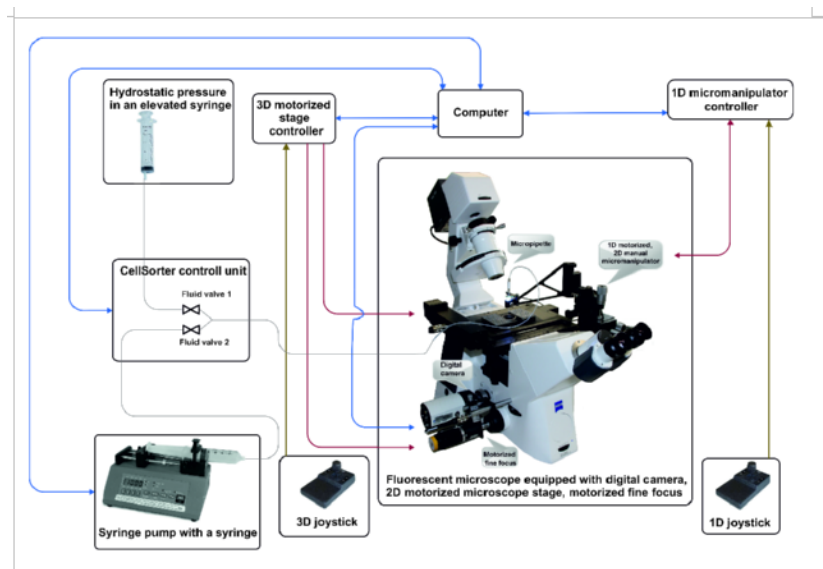
Hamar felmerült azonban az igény arra, hogy egyszerre több markert is detektálni lehessen egyazon sejtben. A legújabb FACS már 12 fluoreszcens festéket képes érzékelni. A sejteket 3 féle színű lézerrel világítják meg. Az egyes festékek gerjesztési spektruma átfedéseket mutat, így ugyanaz a szín akár hatféle festéket is gerjeszthet, azonban minden molekula emisszióját más hullámhosszon detektálják.

1999-ben megszületett az első μ FACS, ami a FACS technológia miniaturizálása(13). Itt a sejteket tartalmazó folyadék egy 'T' alakú kereszteződésben áramlik a bemenet felől, a "hulladék" kimenetre. A bemenő oldatot egy inverz optikai mikroszkóp figyeli, és amint fluoreszcens jelet érzékel, a sejt átvezetődik a tároló kimenetre. Ha nagyon kis koncentrációban van jelen a keresett sejt, akkor a szuszpenziót jóval nagyobb sebességgel áramoltatják, majd amikor a sejtet érzékeli a detektor, az áramlás megáll. Ekkorra a sejt már a hulladék felé vezető csatornában van, ezért fordított irányú áramlás indul meg, és a sejt útja a tárolóban végződik. Ezzel a technológiával a FACS

sok hátránya megkerülhető, és létrehozható annak lab-on-a-chipre integrált változata(14).

1.2.2. Egyedi sejtek válogatása mikroszkóppal

A hagyományos FACS-módszerekkel akár 10000 sejt/másodperces válogatási sebesség is elérhető. Azonban nem használható a technológia, ha nagyon kevés sejtet (1-100) kell válogatni, illetve képtelen az egyes sejtek egyedi manipulációjára. Ezen célokra készült az ELTE Biológiai Fizika Tanszéken is működő magyar fejlesztésű berendezés(15), amellyel a jelen dolgozatban szereplő kísérletek egy részét végeztem. Az eszköz felépítése a következő: Egy inverz fluoreszcens mikroszkóphoz egy mikromanipulátorra szerelt mikropipetta csatlakozik. Ez szolgál arra, hogy a sejteket egy Petri csészéből felszívja, és egy üveglemezre vagy műanyag PCR csövekbe helyezze. Az ehhez szükséges nyomáskülönbséget két nyomásszabályozó szelep biztosítja (egy szívó, és egy nyomóág). A mikroszkóp képét digitális kamera rögzíti, és szoftver dolgozza fel. A berendezés képes a Petri csészében lévő sejtek automatikus felismerésére, és válogatására. Emellett azonban nagy szabadságot is biztosít, hiszen a sejteket egyesével, manuálisan is kezelhetjük, szemben az eddig ismertetett FACS, vagy μ FACS módszerekkel. További előnye, hogy a komplex információt tartalmazó kép alapján történik a válogatás. Azért, hogy a



4. ábra. Az automatizált sejtválogató mikropipetta vázlatos felépítése

sejteket minél kisebb térfogatú cseppekben tehessük le, fontos megérteni,

hogyan képződik a csepp és milyen alakú a víz felülete a csepp lerakása előtt. Mindezeket a mikropipetta mérete, a víz tulajdonságai, és a kísérletileg szabályozható paraméterek beállítása határozza meg. Ezek a paraméterek a víz nyomása, illetve a szívó- és nyomószelepek nyitási ideje.

1.3. Kapillárisok

Kapilláris jelenségekről akkor beszélünk, amikor a vizsgált rendszer viselkedését inkább a folyadék kohéziós, illetve adhéziós erői határozzák meg, semmint a gravitáció. Ennek számszerűsítését a kapilláris állandó bevezetése teszi lehetővé. Definíció szerint:

$$a = \sqrt{\frac{2\alpha}{\rho g}} \quad (1)$$

ahol α a folyadék felületi feszültsége, ρ pedig a sűrűsége. Ha ez az érték sokkal nagyobb, mint a vizsgált rendszer tipikus méretei, akkor a gravitációt elhanyagolhatjuk. A víz esetére $\alpha = 0,072 J/m^2$, illetve $\rho = 997 \frac{kg}{m^3}$. Ebből:

$$a = \sqrt{\frac{2 \cdot 0,072}{997 \cdot 10}} = 0,003800438m \quad (2)$$

Az itt tárgyalt kísérletekben a karakterisztikus méret $70\mu m$. Ez láthatóan 2 nagyságrenddel kisebb a kapillárisállandónál, így a gravitációt elhanyagolhatjuk a jelenségek értelmezésekor.

Belátható, hogy egy folyadék szabad felszíne és a külső légnyomás közötti görbületi nyomás

$$P = \alpha \cdot \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) \quad (3)$$

Itt R_1 és R_2 a felület fő görbületi sugarai. A

$$H = \frac{1}{2} \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) \quad (4)$$

mennyiség, a felület átlagos görbülete.

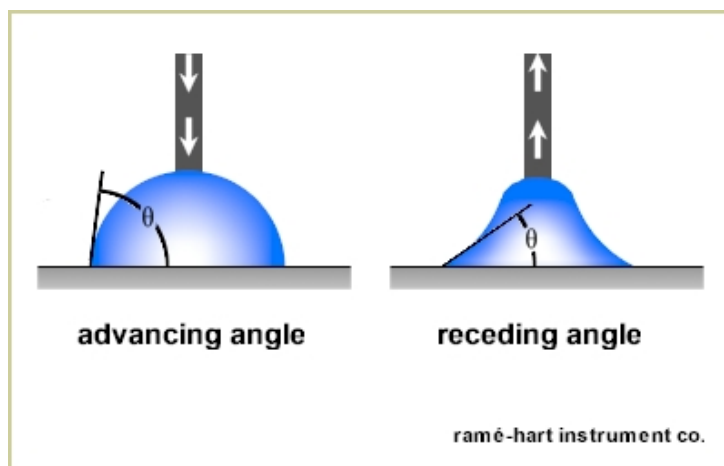
1.4. Az illeszkedési szög

A kísérleteinkben releváns mennyiség még az illeszkedési szög (θ) is, amelyet két közeg érintkezésekor értelmezünk. Ez az a szög, amit a folyadék felületének érintője és a szilárd felület érintője az érintkezési pontban bezár. Ha ez a szög kisebb, mint 90 fok, akkor nedvesítésről beszélhetünk. Ha egy folyadék egy szilárd testtel érintkezik valamilyen gáz (általában levegő)

állapotú közegben, akkor az illeszkedési szög mind a három résztvevő anyag tulajdonságaitól függeni fog. Ezt az összefüggést a Young-egyenlet írja le. Eszerint:

$$\gamma_{fg} \cdot \cos(\Theta) = \gamma_{sg} - \gamma_{sf} \quad (5)$$

Ahol f a folyadék, g a gáz és s index a szilárd közeget jelenti. Ennek az egyenletnek minden esetben egy megoldása van. A kísérletileg megfigyelt illeszkedési szögek azonban nem feltétlenül egyeznek meg ezzel a megoldással. Egy cseppnek több metastabil állapota lehet, amelyek nem az így megkapott szöget mutatják. Hatványozottan igaz ez akkor, amikor a vízfelület mozog. Ha a víz felülete előrefelé mozog egy sima (legalábbis annak tűnő), szilárd lapon, az illeszkedési szöge megnő, ha a felület visszafele mozog, akkor pedig lecsökken. Ezt a jelenséget nevezik illeszkedési szög hiszterézisnek.



5. ábra. Haladó és visszahúzódó cseppalakok(16)

Oka az, hogy még a látszólag homogén, sima felületek is mikroszkopikus inhomogenitásokat tartalmaznak. Például egy hidrofób terület akadályozza a vízfelület mozgását, amennyiben az halad, de visszatartja azt, visszahúzódó mozgás esetén. Belátható, hogy a nedvesítés jelensége jóval bonyolultabb, mint azt a Young-egyenlet alapján várnánk.(17) Mindez szerepet fog játszani a következőkben prezentált kísérletek értelmezésében. Nem lehetünk ugyanis biztosak abban, hogy a látszólag sima üvegfelületen milyen mikroszkopikus inhomogenitások befolyásolják a vízzel való kölcsönhatást.

2. Eszközök és módszerek

A kísérletekkel az volt a célunk, hogy megfigyeljük a $10 - 100\mu m$ -es cseppek alakját, a mikropipettában mérhető nyomás függvényében. A kvalitatív megfigyelésen túl, kvantitatíve is elemeztem a cseppeket úgy, hogy számítógépes program segítségével egy kört illesztettem a csepp körvonalára. A cseppek alakját tehát az oldalról felvett fényképekre illesztett kör sugarával jellemeztem. Ehhez az ImageJ nevű képfeldolgozó programot használtam. Ezt az open-source szoftvert széles körben használják biológusok és bioinformatikusok, könnyű kezelhetősége és a mikroszkópos képekre optimalizált volta miatt. Az illesztés során pontokat jelöltem ki a folyadékfelület peremén, amire a szoftver egy kört illesztett. Ezen köröket az ún. ROI (Region of interest) manager segítségével összegyűjtöttem, majd a program automatikusan lemérte azok minden tulajdonságát. A számomra releváns átmérőt egy fájlba mentettem, majd egy *octave* függvénnyel konvertáltam tényleges, mikrométer mértékegységű adattá.

A mikropipettával végzett kísérletben a mikromanipulátorokat és a kamerát a CellSorter programmal kezeltem, melyet specifikusan ezen készülék irányítására fejlesztettek ki.

3. Eredmények

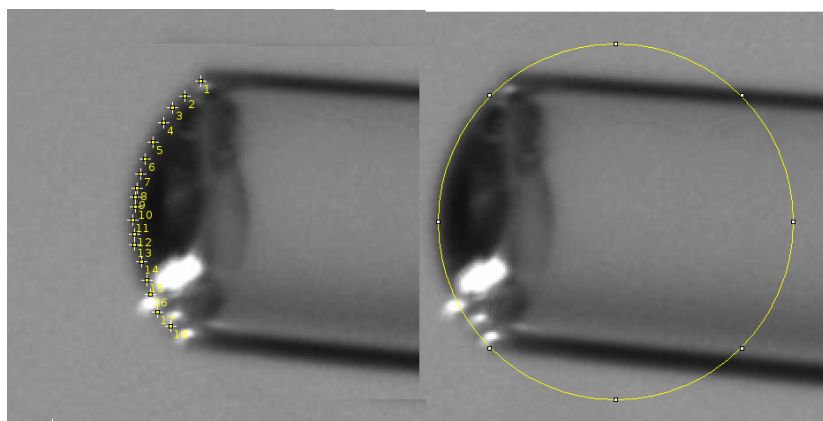
3.1. A kísérleti elrendezés

Ahhoz, hogy a csepp alakját lássuk, oldalról kellett a megfigyelést végezni. Ezért egy üveg mikropipettát (éppen olyat amelyet a sejtek válogatásakor használnak) egy nyomástartályhoz kapcsoltam, és egy oldalára döntött sztereo mikroszkóppal figyeltem meg (Olympus SZX9). A nyomástartály 1 literes mérőhenger volt. A benne lévő víz felszíne és a pipetta hegye közötti távolságból (h) a $p = \rho \cdot g \cdot h$ összefüggés alapján a hidrosztatikai nyomást meghatároztam. A mérőhengert és a mikropipettát 1mm belső átmérőjű, 1m hosszú Teflon cső kötötte össze. A mikroszkóp képét digitális kamera rögzítette (Olympus U-CMAD3). A megfelelő fényviszonyokról optikai szálalás fényforrás gondoskodott (Olympus Europe Highlight 2100). A mérésekhez használt vizet ioncserélő berendezéssel (Seralpur AP 30) állítottam elő.

Elsőként feltöltöttem a hengert annyira, hogy a létrehozott nyomástól a felület már láthatóan kidudorodjon. Ezután a víz mennyiségét meghatározott lépésenként növeltem, és minden lépésnél felvételt készítettem a csepről. A lépések között 3-5 másodpercet vártam, hogy a mérőhenger vízfelületének rezgései megszűnjenek. Mindez addig tartott, amíg a nyomás már akkora

volt, hogy a víz lecseppent. Minden felvételnél feljegyeztem, hogy hol állt a víz, azaz mekkora nyomás hozza létre az adott felületet. A felületek megfigyelése tehát mindig statikus körülmények között történt. Teljesen hasonló kísérletet végeztem szilikon olajjal is. Az előző elrendezésben mikropipetta hegyét közelítőleg 5 mm magassáig alulról feltöltöttem olajjal így a hidrosztatikai nyomás számolásakor az ebből származó pontatlanság elhanyagolható volt. (A két folyadék közötti sűrűségkülönbség $\Delta\rho \approx 40 \frac{kg}{m^3}$).

3.2. A görbületi sugár és a hidrosztatikai nyomás számolása

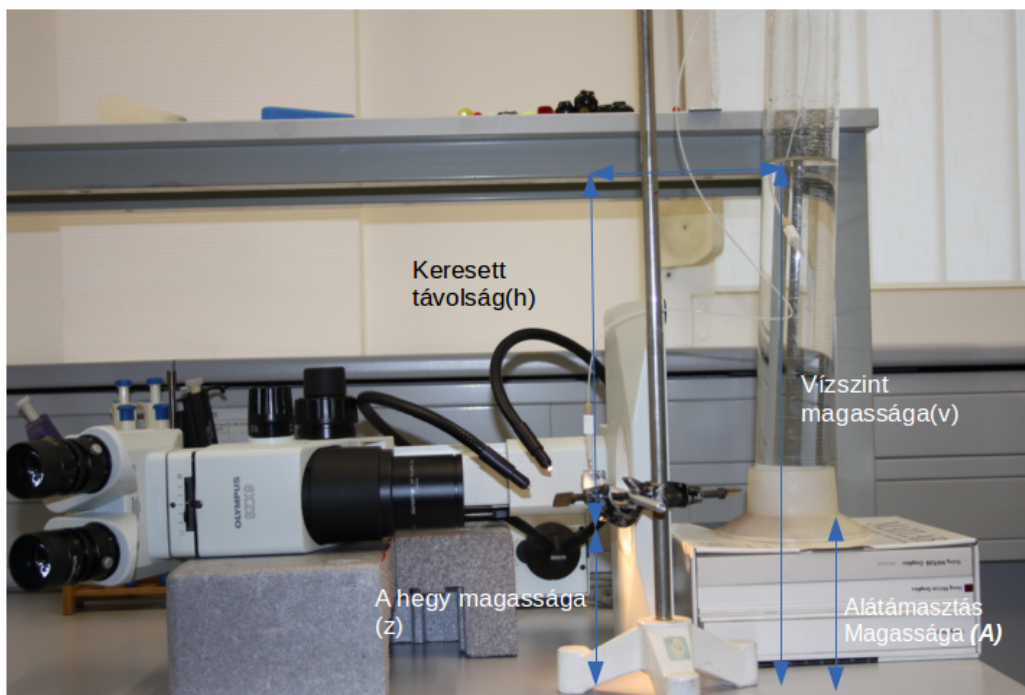


6. ábra. Az illesztés módszere

A mikropipetta természetesen függőlegesen állt, a képek azért vannak vízszintes állásban, mert a kamera így volt rögzítve a mikroszkóp tetejére. Az illesztett kör átmérőjét a program pixelben megadja, ezt még át kell számolni méterre. Egy kalibrált mikroszkóppal történt mérés alapján a pipetta külső átmérője $120 \mu m$. Azért nem az ismert belső átmérőt használtam kalibrációra, mert a felvételek alapján nem dönthető el egyértelműen, hogy hol van a mikropipetta belső fala. Ez alapján minden egyes képsorozatra meghatározható egy konvertáló állandó, ami megmondja, hogy egy μm hány pixelnek felel meg a képen. Így megkapható a cseppekre illesztett kör sugara releváns mértékegységekben.

Minden képsorozatból kivágtam a pipetta hegyét tartalmazó részt, és egy képre rendeztem őket mátrix alakban.

A másik kísérleti paraméter a víz által kifejtett hidrosztatikai nyomás, amit a mérőhengerben lévő víz magasságából számoltam ki. A (7)-es ábrán látható a kísérleti összeállítás fényképe. A hidrosztatikai nyomás meghatározásához szükséges h magasságot a $h = v - z$ egyenletből határoztam meg (az



7. ábra. A kísérleti elrendezés

ábrán lévő jelöléseket használva). Igaz továbbá, hogy $v = A + V \cdot k$, ahol V a hengerben lévő folyadék térfogata (ml-ben), k pedig konvertálási tényező, értéke megmondja, hogy egy ml folyadék mekkora magasságnövekedést eredményez.

A nyomást tehát a

$$p = \rho \cdot g \cdot (A + V \cdot k - z) \quad (6)$$

egyenlet határozza meg.

3.3. A hidrosztatikus nyomás és a cseppek görbületének összevetése

Minden egyes felvételhez tehát meghatározhatjuk a nyomásra és a görbületi sugárra vonatkozó adatokat. Ha a két fő görbületi sugár megegyezik, mint például gömb esetén, akkor a (3)-as egyenlet a következőképpen módosul:

$$p = \frac{2\alpha}{R} \quad (7)$$

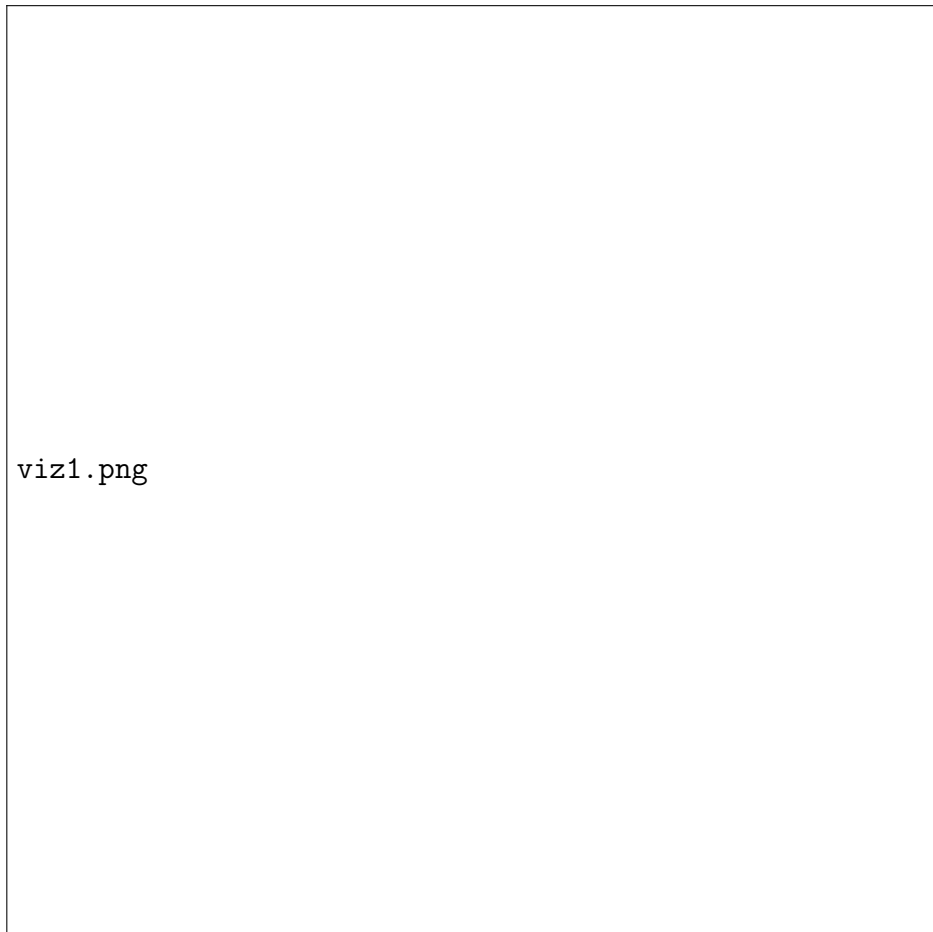
$$p \cdot R = 2\alpha \quad (8)$$

Tehát minden esetben a $p \cdot R$ értéknek konstansnak kell maradnia, méghez­zá ezen konstans éppen a víz felületi feszültségének duplája. Ezért minden mérésnél ábrázoltam a $p \cdot R$ értéknek megfelelő egyenest.

3.4. A mért adatok

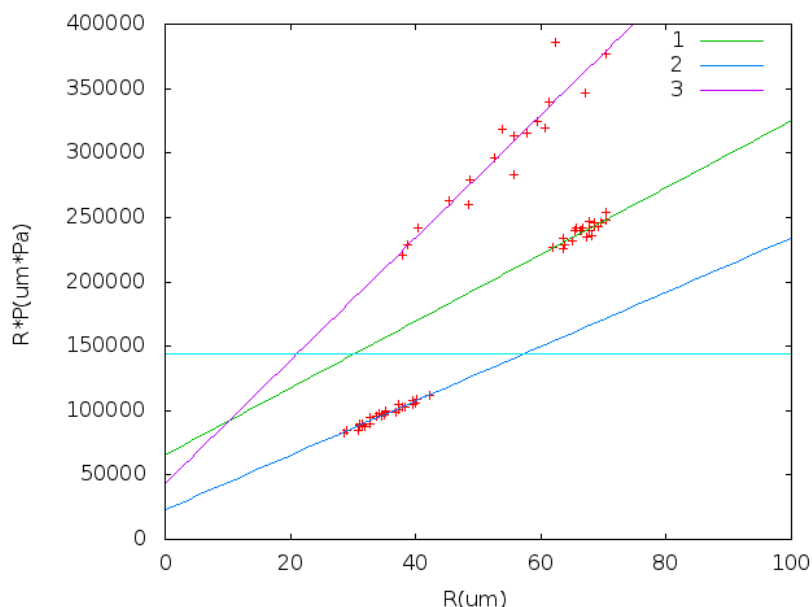
3.4.1. Mérés vízzel

Az első képsorozatnál a hidrosztatikai nyomás értékei 3470 Pa és 3688 Pa között mozogtak. Az egyes képek között 3 ml-nek, megfelelő 11 Pa nyomáskülönbség van. A hegyeket ábrázoló fényképek alább láthatóak:



8. ábra.

A képeket a leírt eljárással elemeztem, és kinyertem belőlük a cseppekre vonatkozó adatokat. A leírt eljárást alkalmaztam három, részleteiben azonos méréssorozatra. A kapott eredményeket a 9. ábra foglalja össze:



9. ábra.

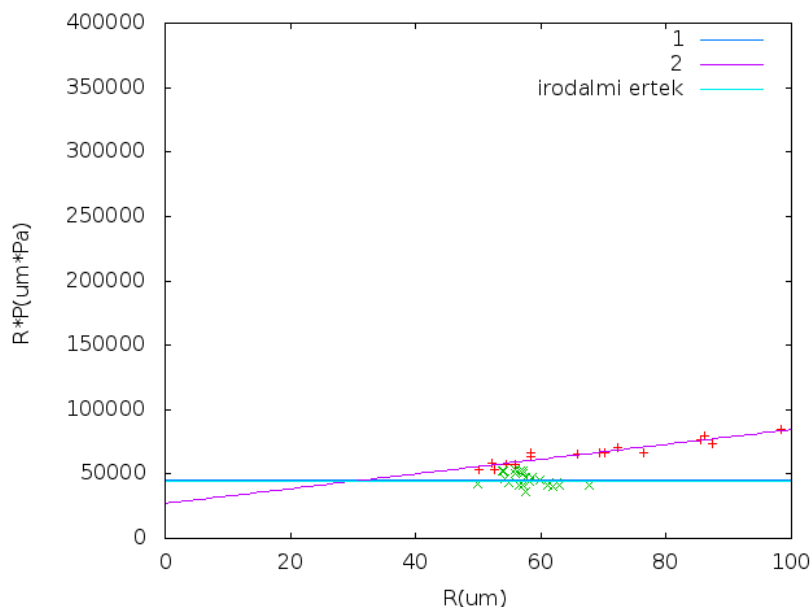
Itt a görbületi sugár függvényében ábrázoltam a nyomás és a sugár szorzatát. A vízszintes egyenes ábrázolja a (7)-es egyenlet szerinti várakozásainkat. Jól látható, hogy az adatok egyik esetben sem követik ezt a várakozást. Helyette, egy-egy jól definiált egyenesre illeszkednek a pontok. A mért adatfelhők jól elkülönülnek, jóllehet a kísérletek technikai részletei minden esetben megegyeztek. Az egyes mérések által lefedett nyomástartományok több helyen átfedésben vannak. Az ilyen helyeken látható, hogy azonos görbületi sugarak a különböző alkalmakkor végzett kísérletekben más-más nyomásértékek hatására jönnek létre. Az illesztett egyenesek adatai " $f(x) = a \cdot x + b$ " függvény illesztése esetén:

mérés sorszáma	a (Pa)	szórás(%)	b($Pa \cdot \mu m$)	szórás(%)
1	2593.83	14.49	65756.2	38.21
2	2109.88	4.3	23148.4	13.72
3	4768.63	8.7	43571.4	52.07

3.4.2. Mérés etanollal

Hasonló mérést végeztem 96 V/V%-os etil-alkohol oldattal is.

A mérés menete megegyezett a fentebb részletezettekkel, az egyetlen különbség, hogy az 1l-es mérőhenger helyett egy 25ml-eset használtam. Az eredmények a 10. ábrán láthatóak. Az első mérés esetén vízszintes egyenest



10. ábra.

illesztettem, hiszen látható, hogy az adatok lényegében egy vízszintes mentén helyezkednek el. Az illesztett egyenesek adatai :

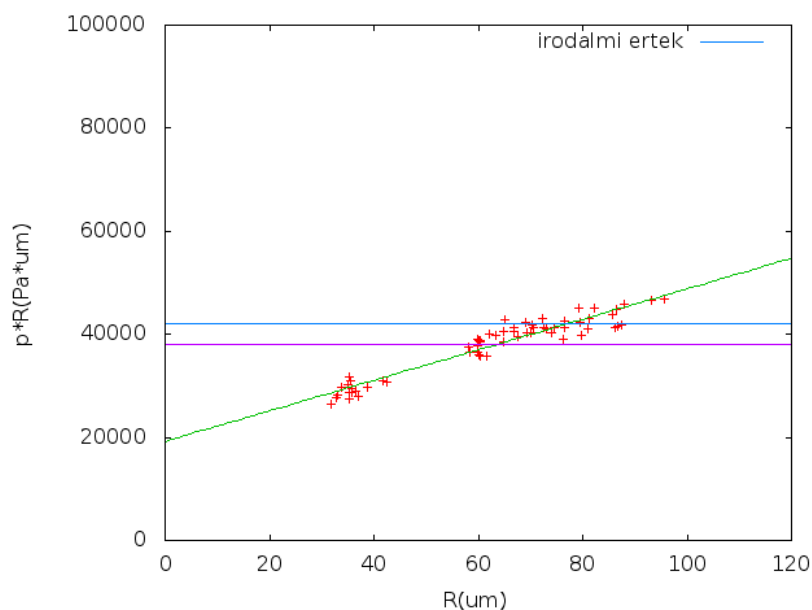
mérés sorszáma	a(Pa)	szórás(%)	b(Pa · μm)	szórás(%)
1	0	-	45707	3.4
2	572.94	8.94	27208.6	13.15

Itt már a mérések jobban összhangban vannak a (7)-es egyenlet szerint várható eredménnyel, az egyik mérés hibán belül megközelíti azt. Összesen 103 adatpár felvétele és kiértékelése után, a diszkusszióban részletezett következte-

téseket vonhatjuk le.

3.4.3. Mérés szilikonolajjal

A kísérletsorozat során, olajcseppek alakját is vizsgáltam. Ez azért indokolt mert az olaj, a fennálló körülmények között elhanyagolható mértékben párolog, így lényegesen különbözik a víztől. Az első mérés során, egy bizonyos nyomástartományon belül vizsgáltam az olajcseppek méretét. A mért pontokat a 11-es ábra mutatja. A zöld vonal a pontokra illesztett egyenest ($a = 296 \pm 11 Pa$), a lila



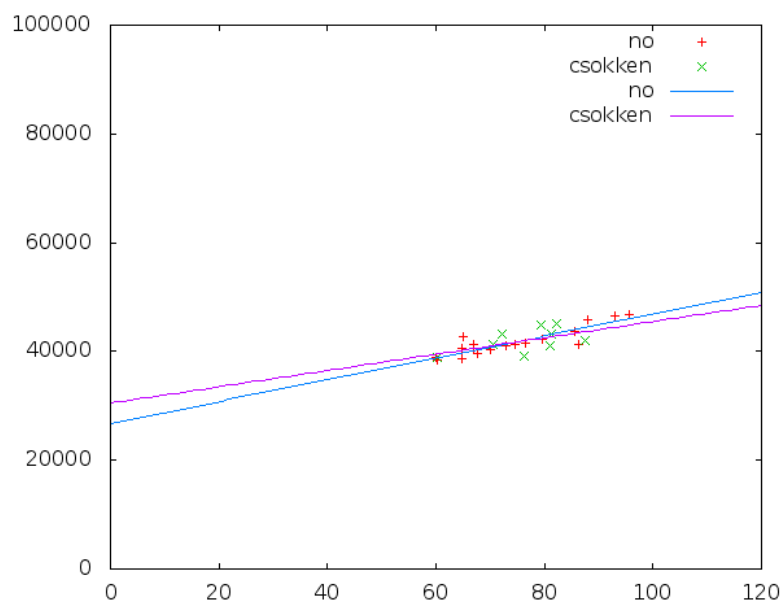
11. ábra.

vonal ($37939 Pa \cdot m$) pedig a pontok átlagát jelöli. A kék vonal a szilikonolaj felületi feszültsége.

Egy másik kísérlet során azt vizsgáltam hogy vajon a jelenség rendelkezik-e hiszterézissel, azaz a nyomás növelésekor illetve csökkenésekor más cseppméretek fordulnak-e elő. Ennek eldöntésére egy adott nyomástartományon először növeltem, majd ugyanolyan körülmények között csökkentettem a hidrosztatikai nyomást. A felvételeket mind a két irányban ugyanolyan vízállásnál, azaz nyomásnál készítettem, a könnyebb összehasonlítás kedvéért. A kapott eredmény a 12-es ábrán látható.

Az illesztett egyenesek adatai:

Mérés megnevezése	$a(Pa)$	szórás(%)	$b(Pa \cdot \mu m)$	szórás(%)
Növekvő nyomás	201	27.58	26763	7.74
Csökkenő nyomás	150	59	30504	22.7



12. ábra.

3.4.4. Kísérlet az automatizált mikropipettával

A gyakorlati alkalmazások szempontjából a legfontosabb kérdés, hogy miként lehet a lehető legkisebb csepp letenni a mikropipettával. Ennek vizsgálata érdekében, az automatizált sejtválogató berendezéssel végeztem kísérletet. Elsőkén a hidrosztatikus nyomást biztosító fecskendőt $0.1m$ magasra helyeztem a mikropipetta hegye fölé. Ezután a mikromanipulátorok segítségével a hegyet, egy alatta elhelyezkedő üveglap fölé $100\mu m$ magasságba helyeztem. Folyamatosan nyitott nyomószeleppel, $5\mu m$ -es lépésekben közelítettem a felülethez, egészen addig amíg a csepp ki nem cseppent az üveglapra. A kísérlet közben a csepp oldalról való megfigyelésére nem volt lehetőség. Azt találtam hogy a kritikus nyomásnál jóval kisebb $p = 979Pa$ hidrosztatikai nyomás hatására a csepp $8\mu m$ magasságban cseppent le.

3.5. Diszkusszió

3.5.1. Eltérés a kísérleti eredmények és a Laplace törvény között

A mérések alapján láthattuk, hogy víz esetében a (8)-as egyenlet alapján várt egyenest egyszer sem kaptuk meg. Bár az alkohol esetében a mérések eredménye jobban megegyezik a várttal, az alkalmazás szempontjából lényegesebb

a vízzel történt mérés, hiszen a mikropipetta vízzel van feltöltve sejtválogatás közben. A vízzel történt kísérleti eredmények szerint tehát:

$$p \cdot R = p_0 \cdot R + b \quad (9)$$

Azaz

$$p = p_0 + \frac{b}{R} \quad (10)$$

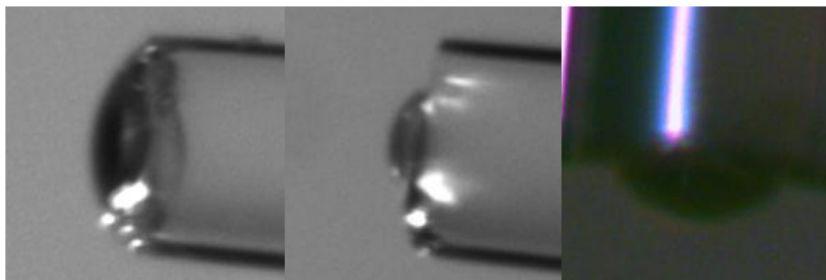
Az eddig figyelembe vett görbületi nyomáson kívül tehát más tényezőket is figyelembe kell venni, amelyek okozhatják a nyomás növekedését állandó görbületi sugár mellett is. Az illesztett egyenesek meredeksége adja meg a p_0 anomális nyomást, a tengelymetszetük pedig a b paramétert, ami láthatóan kisebb mint a várt 2α .

3.5.2. Az üveg és a víz közötti érintkezési szög hatása

Általánosan igaz, hogy egy görbült felületű folyadék határán görbületi nyomás jön létre. Ennek értéke: $H \cdot 2\alpha$ a korábban már definiált átlagos görbület. Esetünkre alkalmazva ezt az állítást, a következő megállapításokat tehetjük; A mikropipetta hegye, hengerszimmetrikus. Egy szabadon lebegő folyadékcsepp, a benne ható kohéziós erők hatására, a minimális felület elérésére törekszik. Ha elhanyagoljuk a gravitáció hatását, akkor ez a felület egy gömb lesz. Szintén láttuk már a bevezetőben, hogy a kapilláris állandó értéke miatt itt a gravitációt biztosan elhanyagolhatjuk. A mikropipetta hegyénél azonban a csepp nem szabadon lebeg, hanem az üveg hegyére van kitapadva bizonyos illeszkedési szögben. Elképzelhető, hogy a peremfeltételek miatt a csepp alakja nem gömb, hanem egy olyan alakzat, aminek a fő görbületi sugarai nem egyenlőek, így a (7)-es egyenlet nem helytálló.

Hogyan befolyásolja tehát a peremen való viselkedés a csepp alakját? A folyadék és az üveg találkozásánál, az (5)-ös egyenlet által meghatározott módon egy illeszkedési szög alakul ki. Az irodalomban keresgélve sokféle mérést lehet találni a víz, és boroszilikát üveg között létrejövő illeszkedési szögre. Ezen mérések eredménye 0-29 fokig különböző értékeket vesz fel. Ez annak köszönhető, hogy a jelenség igen érzékeny a felület legapróbb inhomogenitásaira. Vegyük most az egyszerűség kedvéért azt az esetet, amikor a víz tökéletesen nedvesít, azaz $\gamma = 0$! (Ez egy meglehetősen elterjedt közelítés). Ekkor biztosak lehetünk abban, hogy a vízfelület 0 fokot zár be a mikropipetta belső, vagy külső falával, attól függően hogy éppen hova tapadt ki a csepp (13.ábra).

Ha a hegy peremét tökéletesen szögletesnek feltételezzük, könnyen belátható, hogy a pipetta külső falához való 0 fokos illeszkedés kizárólag a félgömb esetén jönne létre. A többi esetben (tehát kisebb nyomás mellett) pedig valamilyen



13. ábra. Különbözőképpen kitapadt cseppek, a vízzel történt három mérésben

más alakzat jönne létre, ami 0 fokos érintővel indul, és a peremtől eltávolodva egyre jobban gömbre hasonlít. A felület azonban így is hengersizmetrikus és állandó átlagos görbületű lenne.

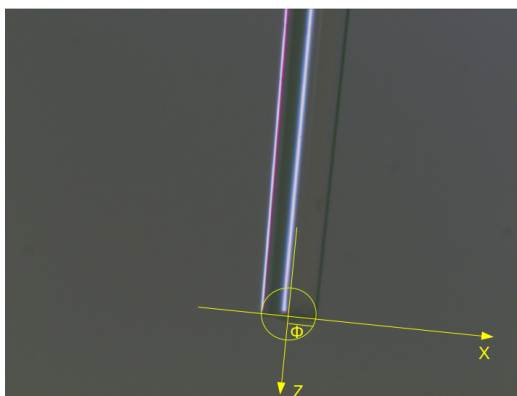
Egy forgásfelület standard paraméterezése a következő(18)

$$x(u, v) = \Phi(v) \cos u \quad (11)$$

$$y(u, v) = \Phi(v) \sin u \quad (12)$$

$$z(u, v) = \Psi(v). \quad (13)$$

Itt u az azimutszög, v pedig a forgástengelyen mért távolság. Ha a koordináta-rendszert úgy vesszük fel, ahogy az a 14. ábrán szerepel, akkor $\Psi(v) = v = z$.



14. ábra. A felület paraméterezése (az y tengely kifele mutat)

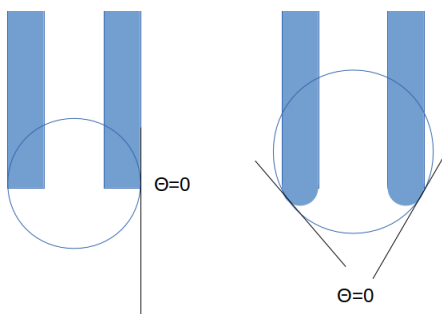
Ebből megkapható a felület átlagos görbülete, a következő formulával:

$$H = \frac{\Phi(\Phi''\Psi' - \Phi'\Psi'') - \Psi'(\Phi'^2 + \Psi'^2)}{2|\Phi|(\Phi'^2 + \Psi'^2)^{3/2}} \quad (14)$$

Estünkben $\Psi' = 1$ és $\Psi'' = 0$. Ezért az egyenlet a következő alakra egyszerűsödik:

$$H = \frac{\Phi\Phi'' - \Phi'^2 + 1}{2\Phi(\Phi'^2 + 1)^{3/2}} \quad (15)$$

Ez egy implicit, másodrendű, nemlineáris differenciálegyenlet az egyváltozós Φ függvényre nézve. A kezdeti feltételek esetünkben $\Phi(0) = r_0$ és $\Phi'(0) = \tan(\Theta)$. Az egyenletet numerikusan megoldva, megkaphatjuk a cseppalakokat különböző Θ érintkezési szögek esetére.



15. ábra. Szögletes és nem szögletes perem a mikropipetta hegyénél

A mikropipetta hegyét azonban nem tekinthetjük tökéletesen szögletesnek. Sokkal inkább hasonlít egy lekerekített peremű csőre. Ezért a meghatározott illeszkedési szög sokféleképpen létrejöhet (15. ábra). A víz tehát mindig ott érintkezhet az üveggel, ahol a meghatározott illeszkedési szög teljesülhet. Így a csepp alakja a különböző görbületi sugarak mellett is gömb lehet. Ez meg egyezik a képeken látottakkal, hiszen ezeken semmi nem utal arra, hogy a felület nem gömb alakú. Ezért az illeszkedési szög hatását a felületre nem vesszük számításba.

3.5.3. Nem statikus körülmények

A p_0 nyomás további különböző effektusokból származhat. Az egyik feltételezés az, hogy amikor a mérőhengerben megváltozik a víz magassága, a megnövekedett nyomás nem pillanatszerűen alakítja ki az új felületet, azaz a felület valamilyen Δt idő alatt alakul ki. Tehát a felület kialakulása még tranziens szakaszban volt, amikor a felvételt készítettem. Amennyiben ez tényleg igaz, a csőben áramlásnak kell jelen lennie, ami a Hagen-Poiseuille törvény értelmében csökkentené a mikropipetta hegyénél lévő nyomást. Ez magyarázatot adhat az anomális nyomás jelenlétére.

A felvételek készítése során folyamatosan figyeltem a mikroszkóp képét, és egyszer sem láttam észrevehető áramlást, azaz a csepp szemmel látható növekedését. Tegyük fel, hogy szemmel már nem észlelhető, ha a nyomásnövelés két lépcsője közötti 5 másodpercben a csepp magassága 10%-ot növekszik! Mekkora lesz ekkor az áramlásból származó nyomáskülönbség? A csepp alakjának oldalnézeti képe minden pillanatban, szinte egzaktul egy gömbszelet. Tekintsünk egy tipikus $R = 40\mu m$ sugarú vízfelületet t időpillanatban. Legyen m a gömbszelet magassága, és a az alapkörének sugara. Ekkor

$$m = R - \sqrt{R^2 - \frac{a^2}{4}} = 40 - \sqrt{40^2 - \frac{60^2}{4}} = 8.03\mu m \quad (16)$$

A mikropipettából kilógó vízcsepp térfogata az ismert, gömbszeletre vonatkozó képletből:

$$V_0 = \frac{(3a^2 + m^2)m\pi}{6} = 4.55 \cdot 10^{-14} m^3 \quad (17)$$

Ha a csepp magassága 10%-al növekszik, azaz $m \rightarrow 1.1 \cdot m$, a térfogatváltozás:

$$\Delta V = 4.803 \cdot 10^{-15} m^3 \quad (18)$$

Az áramlási ráta tehát:

$$I = \frac{\Delta V}{\Delta t} = \frac{4.803 \cdot 10^{-15} m^3}{5s} = 9.61 \cdot 10^{-16} \frac{m^3}{s} \quad (19)$$

A Hagen-Poiseuille törvény alakja a következő:

$$\Delta p = \frac{8I\eta l}{r^4\pi} \quad (20)$$

Itt r a cső sugara, l pedig a hossza. Esetünkben a vezeték egy 1m-es szakaszon $0.5mm$, kb $2mm$ -en pedig $35\mu m$ sugarú. A viszkozitás $\eta = 0.001Pa \cdot s$ a víz esetében. Ezért a teljes nyomásesést két részben írhatjuk fel:

$$\begin{aligned} \Delta p &= \frac{8I\eta}{\pi} \left(\frac{l_1}{r_1^4} + \frac{l_2}{r_2^4} \right) = \\ &= \frac{8 * 9.6 \cdot 10^{-16} * 0.001}{\pi} \left(\frac{1}{(5 \cdot 10^{-4})^4} + \frac{0.002}{(35 \cdot 10^{-6})^4} \right) = 0.00329Pa \end{aligned} \quad (21)$$

Láthatjuk tehát, hogy az esetleges áramlásból létrejövő nyomásesés mértéke elhanyagolható.¹ (23)-ból lineáris összefüggést kaphatunk I és Δp között.

$$\Delta p = 3.427 \cdot 10^{12} \cdot I \quad (22)$$

¹Érdekes megfigyelés, hogy az 1m-es cső által okozott nyomásesés 2 nagyságrenddel kisebb mint az, amit a csupán 2mm hosszú mikropipetta hoz létre.

Így egy, a kísérletek szempontjából szignifikáns, $1000Pa$ nagyságrendű nyomásesést $I = 2.912 \cdot 10^{-10} \frac{m^3}{s}$ -os áramlás hozna létre. Azaz ekkora térfogatú víznek kellene másodpercenként áramlania a cseppbe. Ez lehetetlen, hiszen egy tipikus csepp térfogata (mint láttuk) csupán $10^{-14}m^3$ -es nagyságrendű. Az áramlás tehát nem adhat magyarázatot az anomális nyomásra.

3.5.4. Párolgás hatása a mért nyomásra

A következő tényező, amit szemügyre veszünk az a víz párolgása. Párolgás során a víz felületéből molekulák lépnek ki, és a levegőbe jutva gőzt alkotnak. A párolgás sebessége nő a párolgó felület nagyságával, a hőmérséklettel, és csökken a légnyomással. Függ továbbá a levegő páratartalmától is. A vizsgált cseppet tehát egy vékony gőzréteg veszi körül, ami nagyon érzékeny a legkisebb légáramlatokra is. Ennek a rétegnek kettős hatása van. Egyrészt a gőznyomás miatt visszafele nyomja a felületet, másrészt pedig a párolgás miatt elfogyott vizet a rendszer a vezetékből pótolja, áramlást hozva létre. Vizsgáljuk elsőként ezt az áramlást. A mikropipetta hegyének vizsgálatakor a mikroszkóp alatt jól megfigyelhető volt, hogy a cső külsejére kijutott cseppek hamar elpárologtak. Egy $70\mu m$ átmérőjű vízcsepp körülbelül 4-6 másodperc alatt párologott el. Ha egy $1.4 \cdot 10^{-12}m^3$ térfogatú csepp 5s alatt párolog el, és ugyanennyi folyadék átáramlik a vezetéken, akkor a (24) egyenlet alapján

$$\Delta p = 3.434 \cdot 10^{12} \cdot \frac{1.4 \cdot 10^{-12}}{5} = 0.9615Pa \quad (23)$$

Ez megint csak elhanyagolhatóan kicsi, így nem járul hozzá az anomális nyomáshoz. Vizsgáljuk tehát a gőz nyomását. A gőznyomás a hőmérséklettel nemlineárisan nő, az Antoine egyenlet által meghatározott módon(19). Eszerint:

$$\log_{10}(p) = A - \frac{B}{C + T} \quad (24)$$

Itt A , B , és C az ún. Antoine-konstansok, melyek kísérletileg meghatározható paraméterek. Ezek (szokás szerint Hgmm-ben megadva) a következők: $A = 8.0713$, $B = 1730.63$, $C = 233.426$. A mérések során nem rögzítettem a laborban a hőmérséklet értékét, így közvetlenül a gőznyomást nem lehet kiszámítani. Ha azonban feltételezzük hogy az anomális nyomást a gőz okozta, akkor következtethetünk a hőmérsékletértékekre, és felmérhetjük, hogy azok mennyire reálisak. (26)-ból kiindulva:

$$T = \frac{B}{A - \log_{10}p} - C. \quad (25)$$

A víz esetén kapott meredekségeket a p helyére behelyettesítve a következőket kapjuk(a hibákat a meredekség szórásából számoltam):

Mérés sorszáma	meredekség(Pa)	$T(^{\circ}C)$	hibatartomány ($^{\circ}C$)
1	2593	22	19 - 24
2	2109	18	18 - 19
3	4768	32	30 - 34

Ezek szerint az első két mérésben hasonló lehetett a hőmérséklet. Ez egybevághat a ténnyel, hogy az első két kísérletet akkor végeztem, amikor még üzemelt a légkondicionálás a laborban. A harmadik kísérletnél már nem volt légkondicionálás, ellenben meglehetősen meleg volt, bár 30 foknál valószínűleg nem melegebb. A gőznyomás tehát reális magyarázatot ad arra, hogy miért nem kaptam meg az előzőleg várt vízszintes egyeneseket víz esetén.

Ezen felvetés ellenőrzésének céljából végeztem el a 3.4.3.-as részben leírt kísérletet. Mivel a szilikonolaj csak kevésbé párolog, a leírtak alapján azt várjuk hogy anomális nyomás kisebb mértékben jelentkezik. A gyártó által közzétett adat szerint a szilikonolaj gőznyomása $20^{\circ}C$ -on $5mmHg$, azaz $666.61Pa$. Ennél kisebb, $296Pa$ -os érték adódik a mérésekből azonban nem 20 hanem 23 Celsius fokon ment végbe a mérés. Összességében elég jó egyezést találunk a két adat között, ezáltal a párolgás hatása újabb igazolást nyert.

A második kísérlet annak megállapítását tűzte ki céljául, hogy a cseppek alakja függ-e a nyomásváltozás irányától. A 13-as ábra alapján megállapíthatjuk hogy a növekvő és a csökkenő ágban mért anomális nyomás nem tér el jelentősen egymástól. Ez alapján kijelenthető hogy a jelenségnek nincs hiszterézise.

3.5.5. A cseppátmérő hatása a felületi feszültségre

Ismert jelenség, hogy egy cseppet alkotó folyadék felületi feszültsége kapcsolatban áll a csepp méretével(20). Ez a

$$\delta = \Gamma(\rho_f - \rho_g) \quad (26)$$

menyiségtől függ, amelyet egy folyadék és egy gáz határán értelmezünk. Itt Γ a felületi sűrűség, ρ_f a folyadék, ρ_g a gáz sűrűsége. A felületi feszültség változása a δ/R értékkel egyenesen arányos, ahol R a görbületi sugár. Esetünkben azonban a sugár túlságosan nagy ahhoz, hogy ezt az effektust figyelembe vegyünk. Pusztán 4 % felületi feszültségcsökkenéshez $10^{-8}m$ nagyságrendű cseppátmérőre van szükség. Ez a mi esetünkben pusztán 10^{-5} nagyságrendű.

3.6. Összefoglalás

A vizsgálat célja az volt, hogy jobban megértsük a cseppentéskor fellépő kritikus nyomás hátterét. Ennek érdekében a kialakuló cseppekről mikroszkópos

felvételeket készítettem, és azokat képfeldolgozó szoftverrel elemeztem. Az elért eredmények röviden összefoglalva a következők:

- A mérések során eltérést tapasztaltam a Laplace-törvény és a kialakuló cseppek alakja között.
- Elméleti megfontolások alapján ezeket az eltéréseket a párolgás hatásával magyaráztam, melyből visszaszámolva reális hőmérséklet értékeket kaptam.
- A mérést szilikonolajjal megismételve, nagyságrendileg visszakaptam annak gőznyomását így megerősítve a munkahipotézist.
- A jelenség hiszterézis jellegét is vizsgáltam, ami azonban nem mutatkozott meg.

Ezek alapján a következő javaslatokat teszem a mikropipettás cseppentéssel kapcsolatban: Ha üveglapra, vagy Petri csészébe kell válogatni sejteket, akkor érdemes közelebb vinni a mikropipetta hegyét az üveglaphoz. Mint az automatizált mikropipettás kísérletből láttuk, csepp ekkor is létre tud jönni. Így a csepp mérete is megfelelően kicsi lesz, és nem limitálja a kritikus görbületi nyomás. A jövőben annak lehetőségét vizsgáljuk tovább, hogy hogyan lehetne egy olajréteg alá sok (több ezer) mikroszkopikus cseppet lerakni. Ezen technológiának beláthatatlan alkalmazásai lehetnek a biológiai high-throughput kísérletek terén.

4. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni Szabó Bálintnak a szakszerű témavezetői munkáját és a már egy éve tartó türelmes és segítőkész együttműködését. Köszönet illeti Salánki Ritát, amiért óriási türelemmel megtanított a mikropipetta használatára. Köszönöm továbbá Vigh Máténak a cseppek alakjával kapcsolatos értékes gondolatait és tapasztalatainak megosztását. Végül szeretném megköszönni családomnak, páromnak és barátaimnak, a dolgozat elkészítése közben nyújtott támogatását.

Bibliográfia

- (1) Jean Berthier: Micro-Drops and digital microfluidics; Elsevier, 2013
- (2) Le Pesant et al.: Electrodes for a device operating by electrically controlled fluid displacement; U.S. Pat. No. 4,569,575, Feb. 11, 1986.
- (3) <http://nanoravi.wordpress.com/2010/07/25/inkjet-printer-head/>
- (4) <https://www.imtek.de/laboratories/mems-applications/research/lab-on-a-chip/>
- (5) M.J.MacPherson, M.Ravichandiran: Lab-on-a-chip technology: the future of point-of-care diagnostic ability University of Western Ontario Medical Journal; 80:1, 24-26, 2011
- (6) S. Wang, F. Xu, U. Demirci: Advances in developing HIV-1 viral loadassays for resource-limited settings; Biotechnol Adv Nov-Dec;28(6), 770-81, 2010
- (7) M. Antia, T. Herricks, P.K. Rathod: Microfluidic approaches to malariopathogenesis; Cell Microbiol Oct;10(10):1968-74, 2008
- (7) A. Ståhlberg, C. Thomsen, D. Ruff, P. Åman: Quantitative PCR Analysis of DNA, RNAs, and Proteins in the Same Single Cell; The American Association for Clinical Chemistry 58, 1682-1691 , 2012
- (8) H.H Chang, M.Hemberg, M.Barahona, D. E. Ingber, S. Huang: Transcriptome-wide noise controls lineage choice in mammalian progenitor cells; Nature 453:544 –7, 2008
- (9) J.M. Levsky, R.H. Singer : Gene expression and the myth of the average cell; Trends Cell Biol. 13:4–6, 2003
- (10)alisky et al.: Genomic Analysis at the Single-Cell Level; Annual Re-

view of genetics Vol. 45: 431-445, 2011

(11) L.A.Herzenberg: The History and Future of the Fluorescence Activated Cell Sorter and Flow Cytometry:A View from Stanford Clinical Chemistry 48:10 1819 –1827, 2002

(12) <http://www.mpi-bremen.de/Binaries/Binary9186/>

(13) A.Y.Fu et al.: A microfabricated fluorescence-activated cell sorter Nature Biotechnology 17, 1109 - 1111, 1999

(14) S.H.Cho et al.: Human mammalian cell sorting using a highly integrated micro-fabricated fluorescence-activated cell sorter (μ FACS) ;Lab Chip, 10, 1567-1573, 2010

(15) Környei et al.: Cell sorting in a Petri dish controlled by computer vision; Scientific Reports 3, 1088, 2013

(16) <http://www.ramehart.com/contactangle.htm>

(17) G. Bracco, B Holst: Surface Science Techniques ; Springer, 2013

(18) <http://mathworld.wolfram.com/SurfaceofRevolution.html>

(19) http://en.wikipedia.org/wiki/Antoine_equation

(20) R.C. Tolman: The effect of doplet size on surface tension; The Journal of Chemical Physics 17, 333 ,1949