

## *mikro*organizmy w *mikro*kanałach

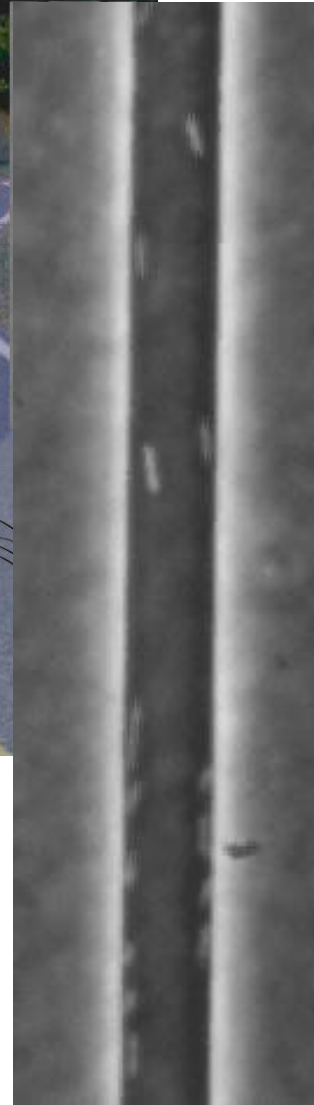
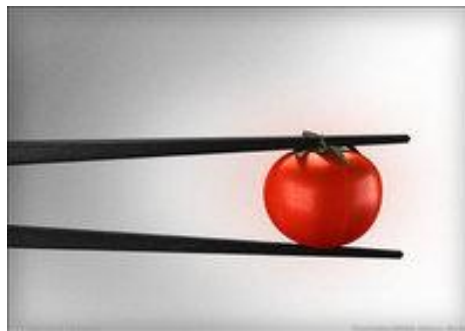
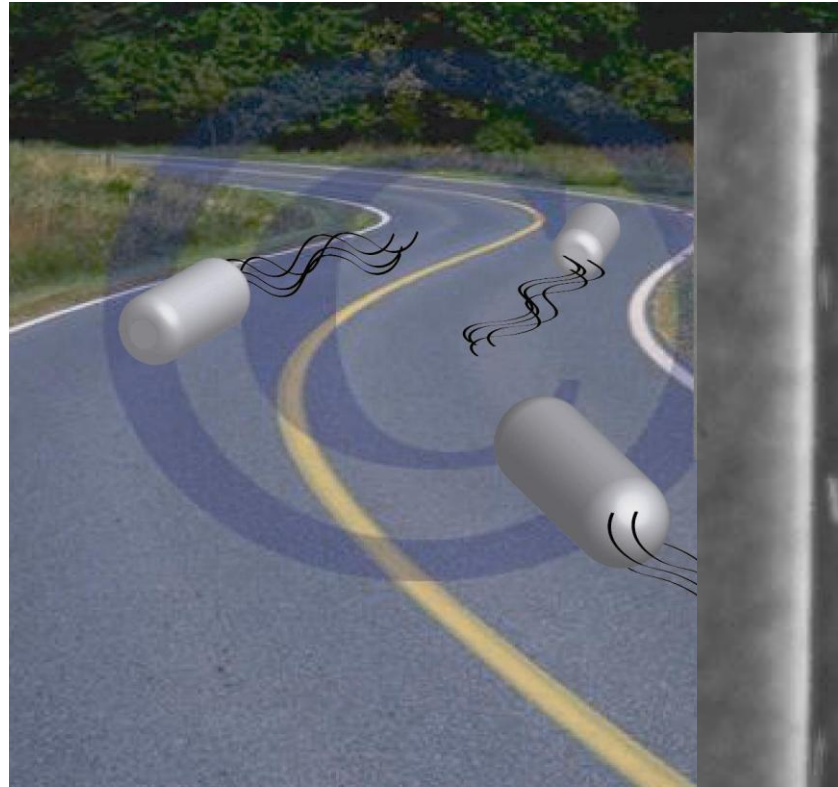
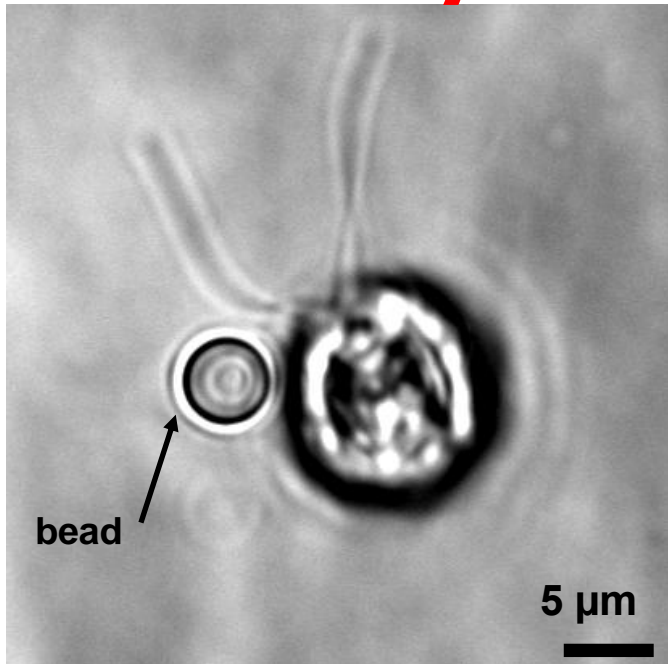
Piotr Garstecki

Instytut Chemii Fizycznej PAN

Instytut Podstawowych Problemow Techniki PAN  
Warszawa 20/02/2007

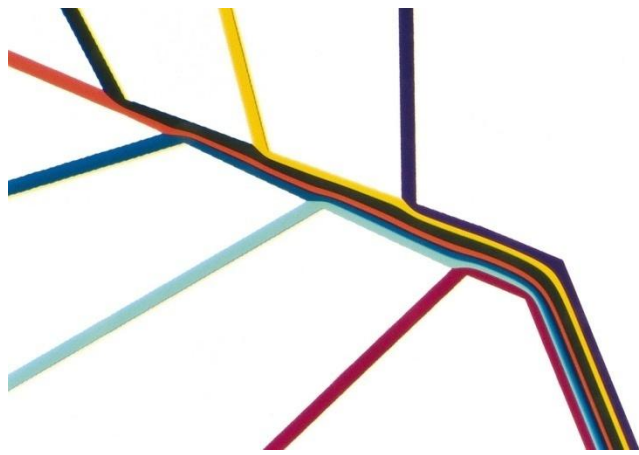
# *Escherichia coli* pływają prawą stroną

zawłotnie  
*Chlamydomonas reinhardtii* jako  
mikrowoły



***dlatego***

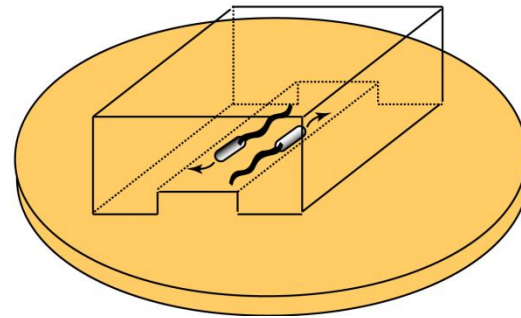
***Escherichia coli* pływają prawą stroną?**



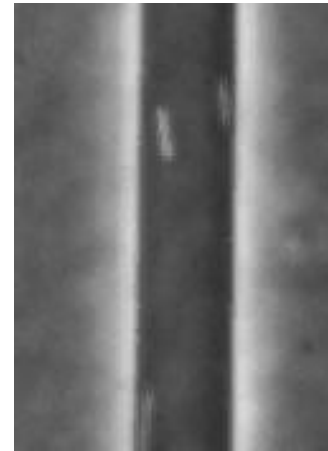
**mikroprzepływy**



***E. coli***

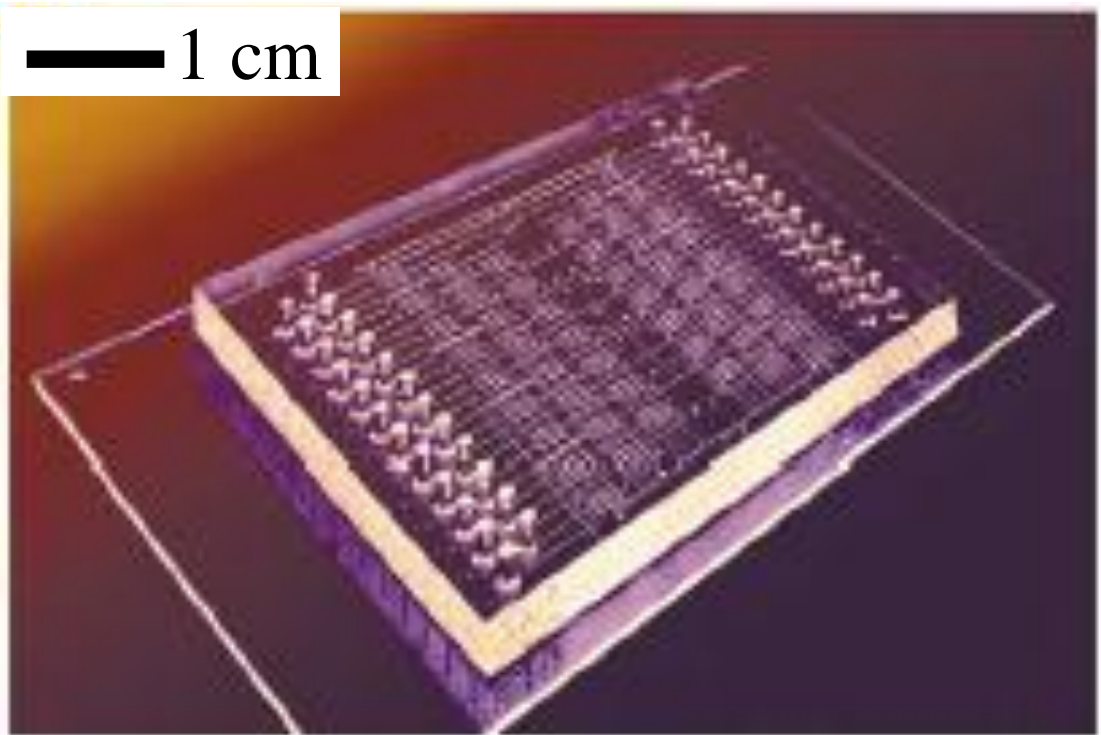


**eksperyment**



**dlaczego pływają prawą stroną?**

# mikroprzepływy



małe rozmiary: 10 – 100  $\mu\text{m}$

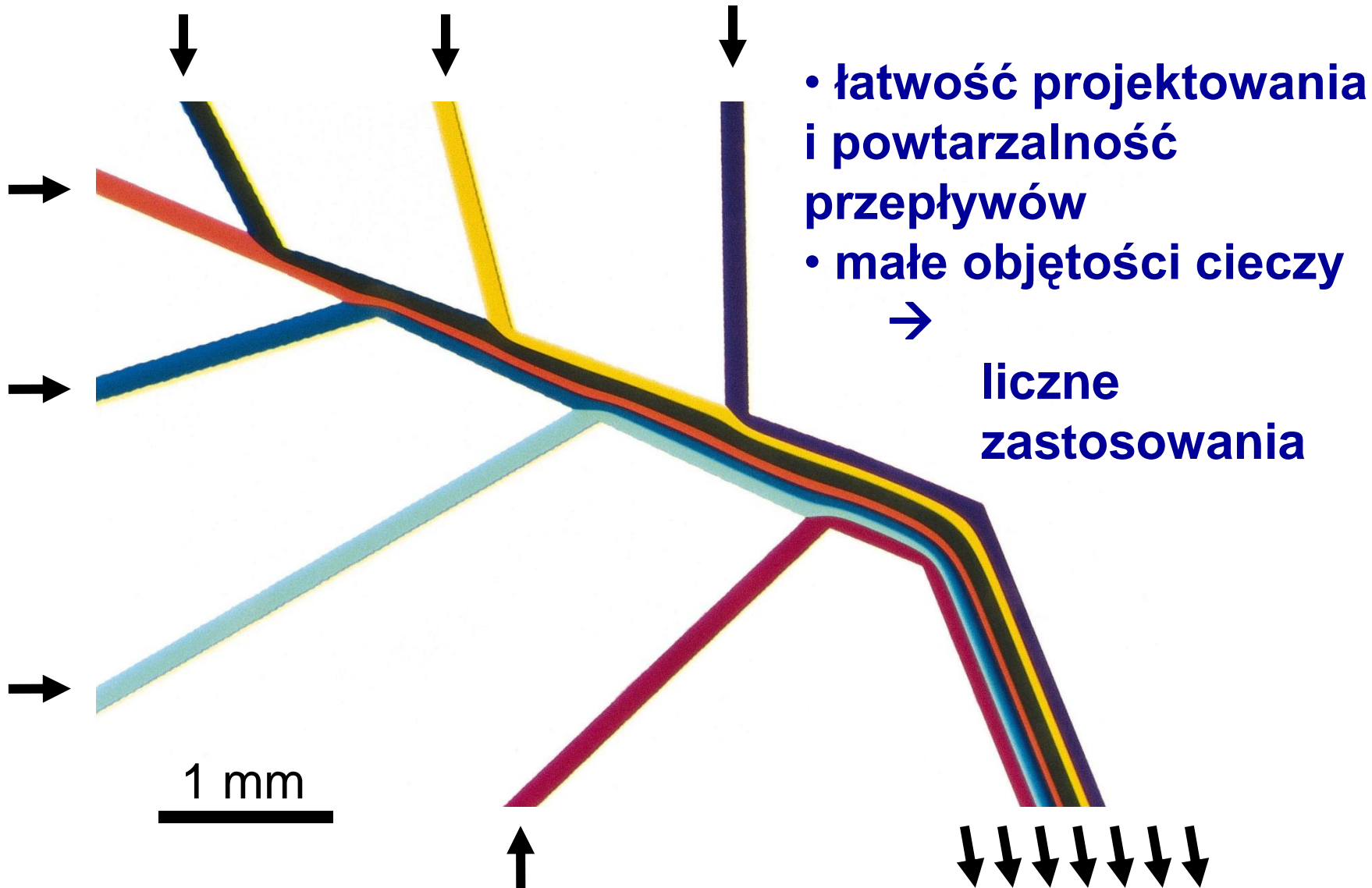
małe objętości cieczy:  $\mu\text{L}$  –  $\text{mL}$

**przepływy zdominowane przez efekty lepkościowe**



**przepływy laminarne**

# przepływ laminarny



- łatwość projektowania i powtarzalność przepływów

- małe objętości cieczy



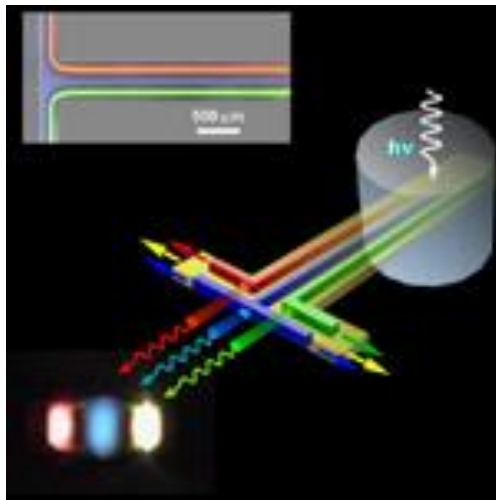
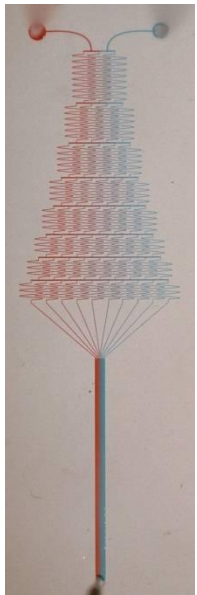
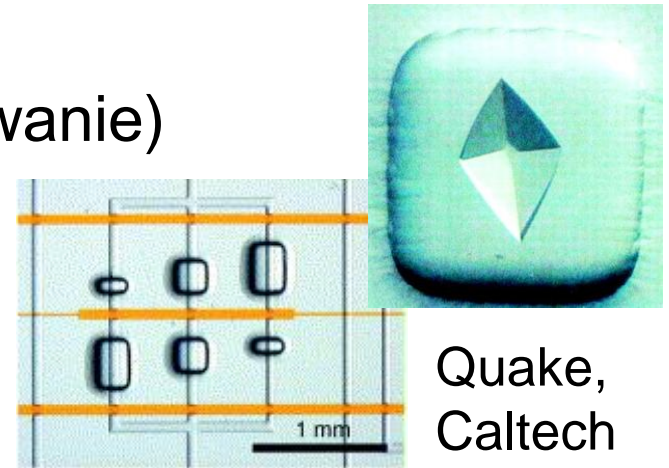
liczne  
zastosowania

zdjęcie, prawdziwe kolory, Kenis *etal*, Science 1999

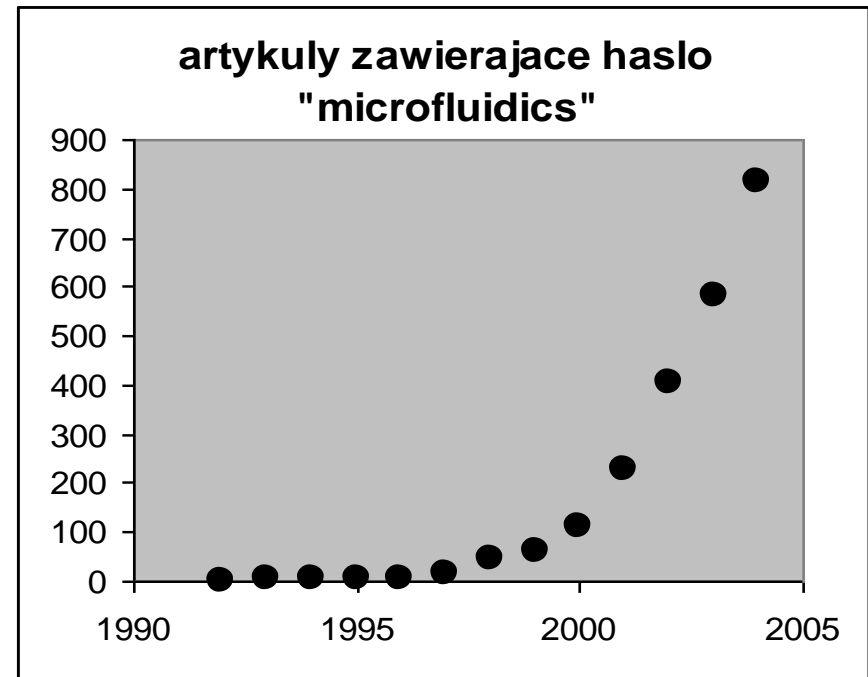


# zastosowania układów mikroprzepływowych

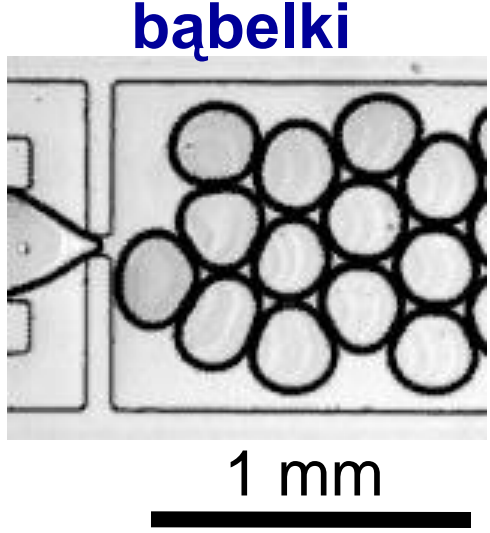
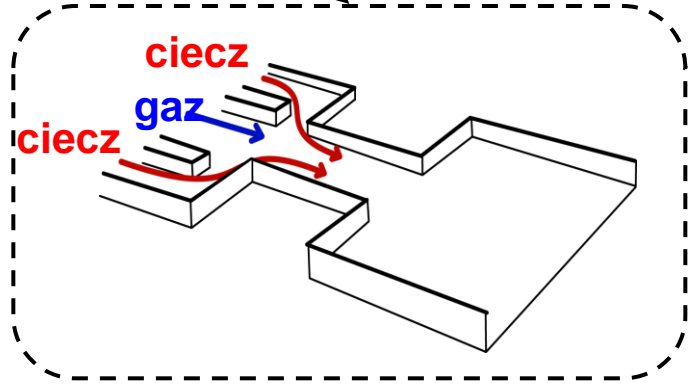
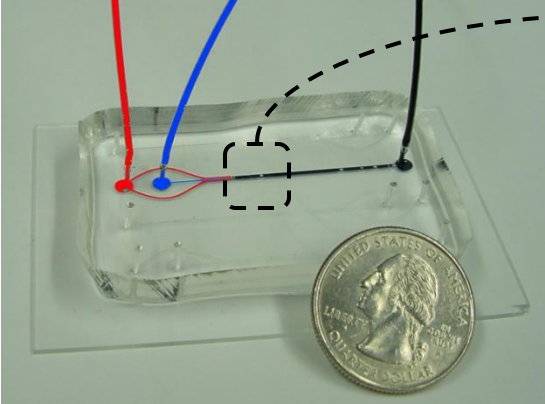
- chemia (kinetyka, synteza)
- projektowanie leków (szybkie przesiewanie)
- biotechnologia – sensory, analizatory
- synteza materiałów
- biologia
- fizyka, optyka



Whitesides, Harvard

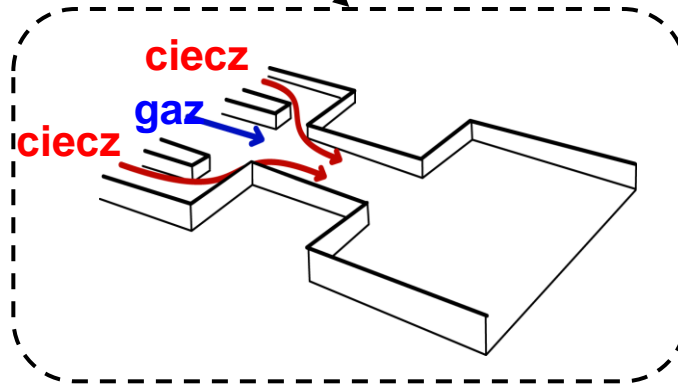
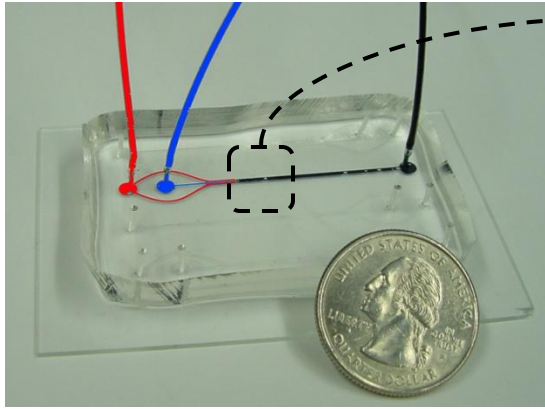


# mikroprzepływy dwufazowe

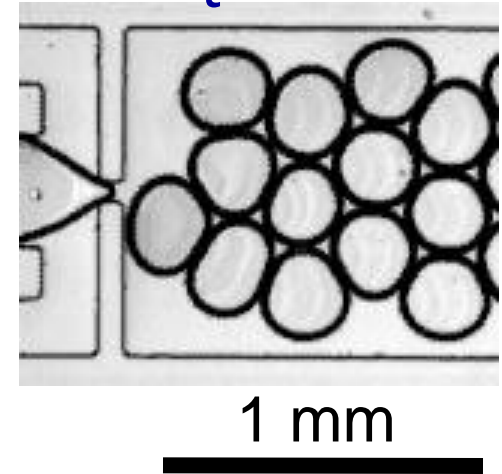




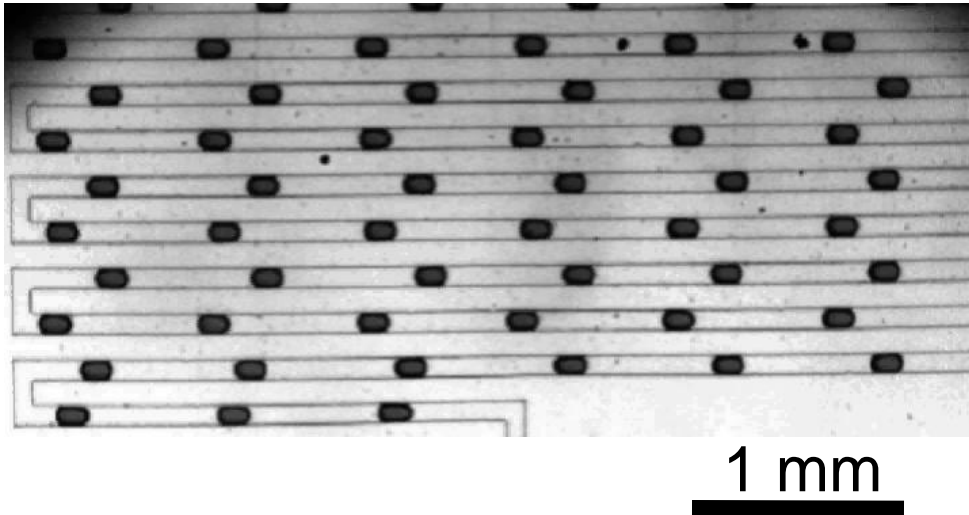
# mikroprzeptywy dwufazowe



**bąbelki**



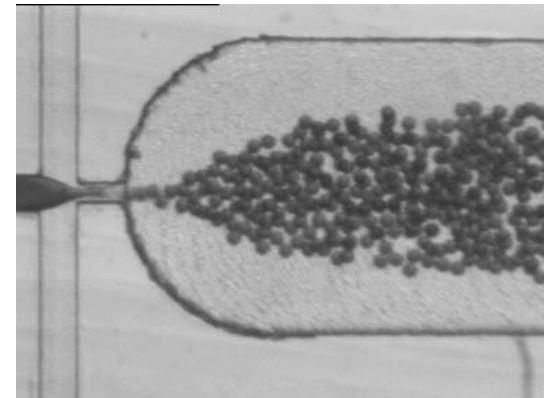
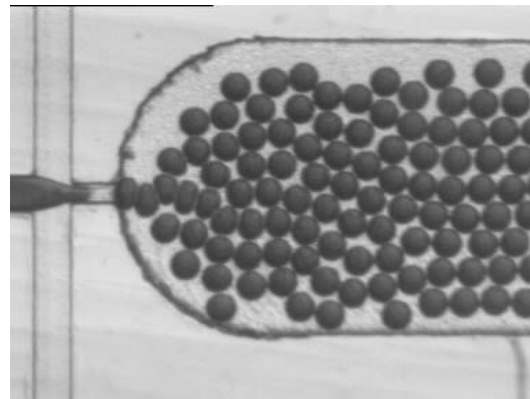
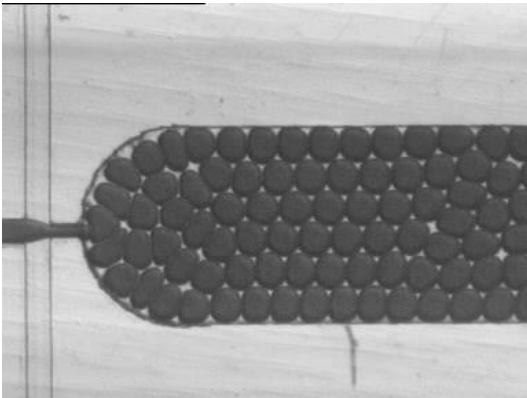
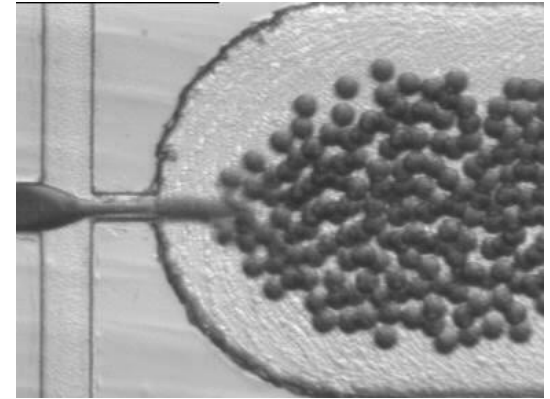
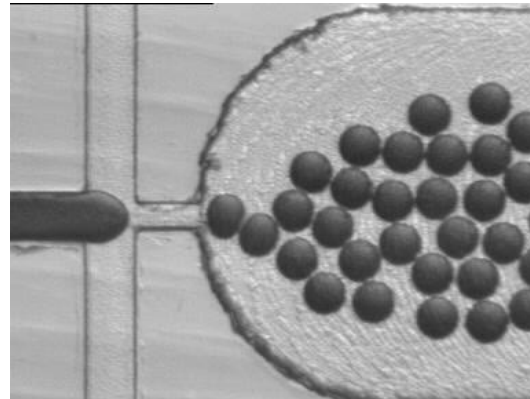
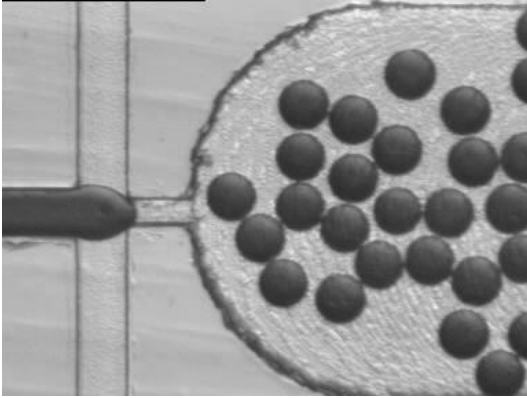
**kropelki**



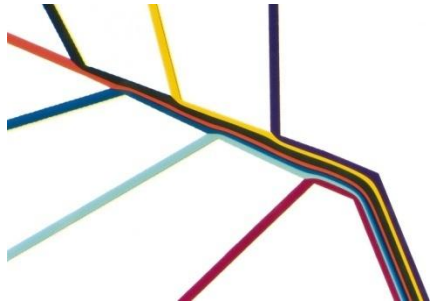
- emulsje
- materiały
- chemia w kroplach
- zjawiska nieliniowe
- lab-on-chip
- ...

# mikroprzeptywy dwufazowe

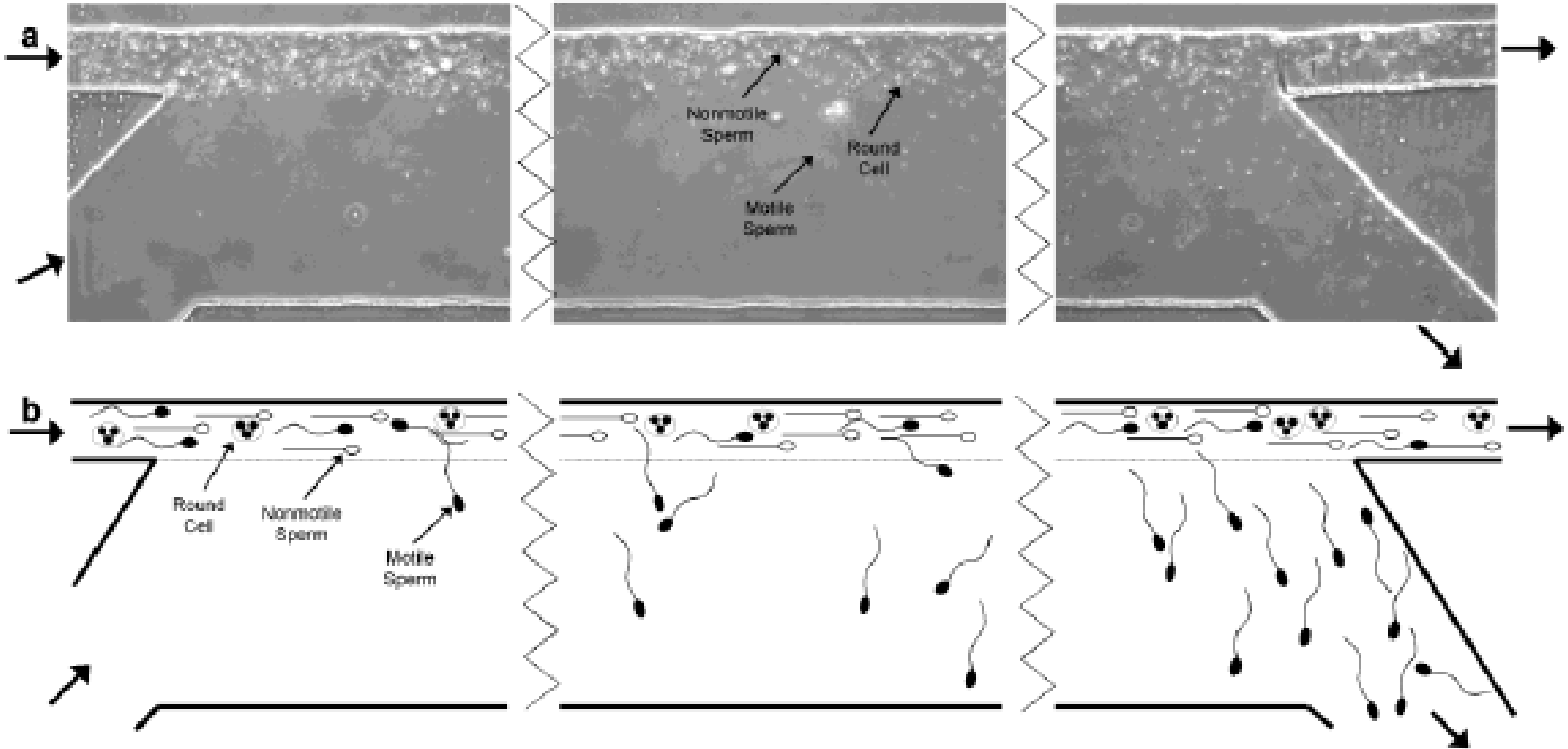
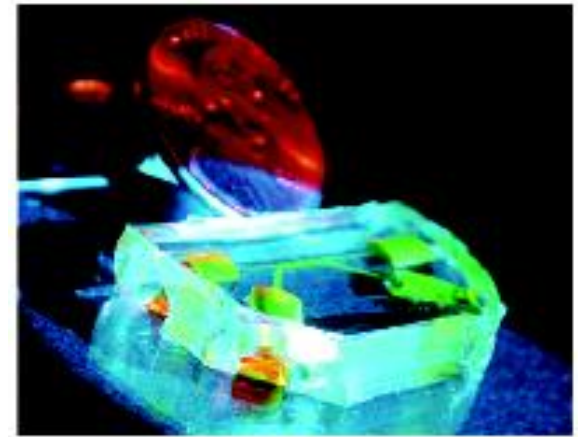
## ogniskowanie przepływu, układ ciec-ciecz



# sortowanie komórek



tylko żywe (ruchliwe)  
komórki przepływają  
między strumieniami



# Escherichia coli

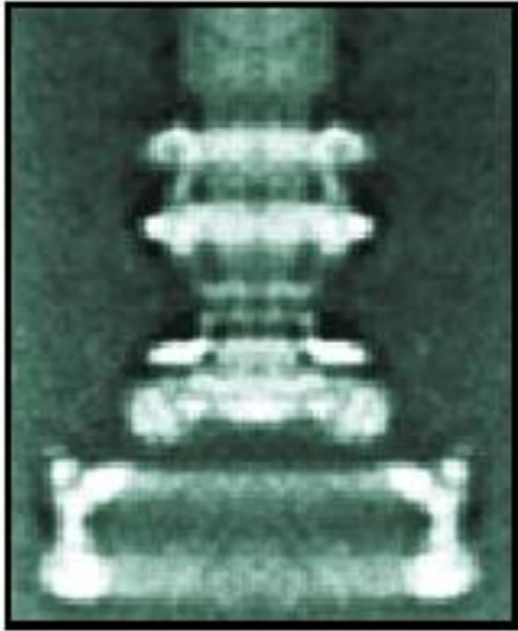


Protonic Nanomachine Project (Japan)  
<http://www.npn.jst.go.jp/index.html>

- prokariotae
- komórka ~ 1 x 2  $\mu\text{m}$
- ~ 10 flagelli  
długości ~ 7  $\mu\text{m}$
- witki napędzane silnikami protonowymi

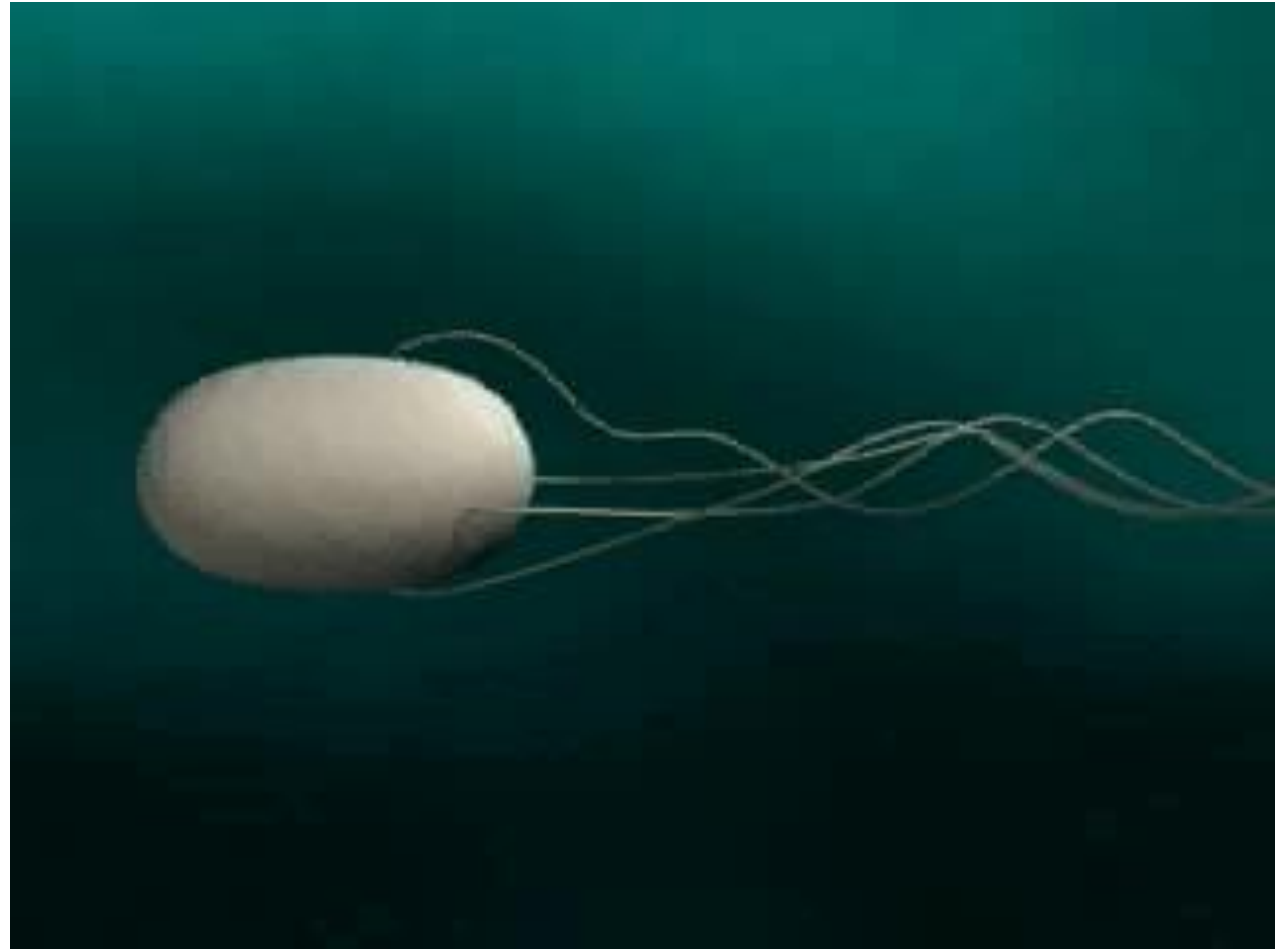
**bakterie są najmniejszymi organizmami ruchomymi**

# silnik obrotowy napędzany protonami



obraz TEM

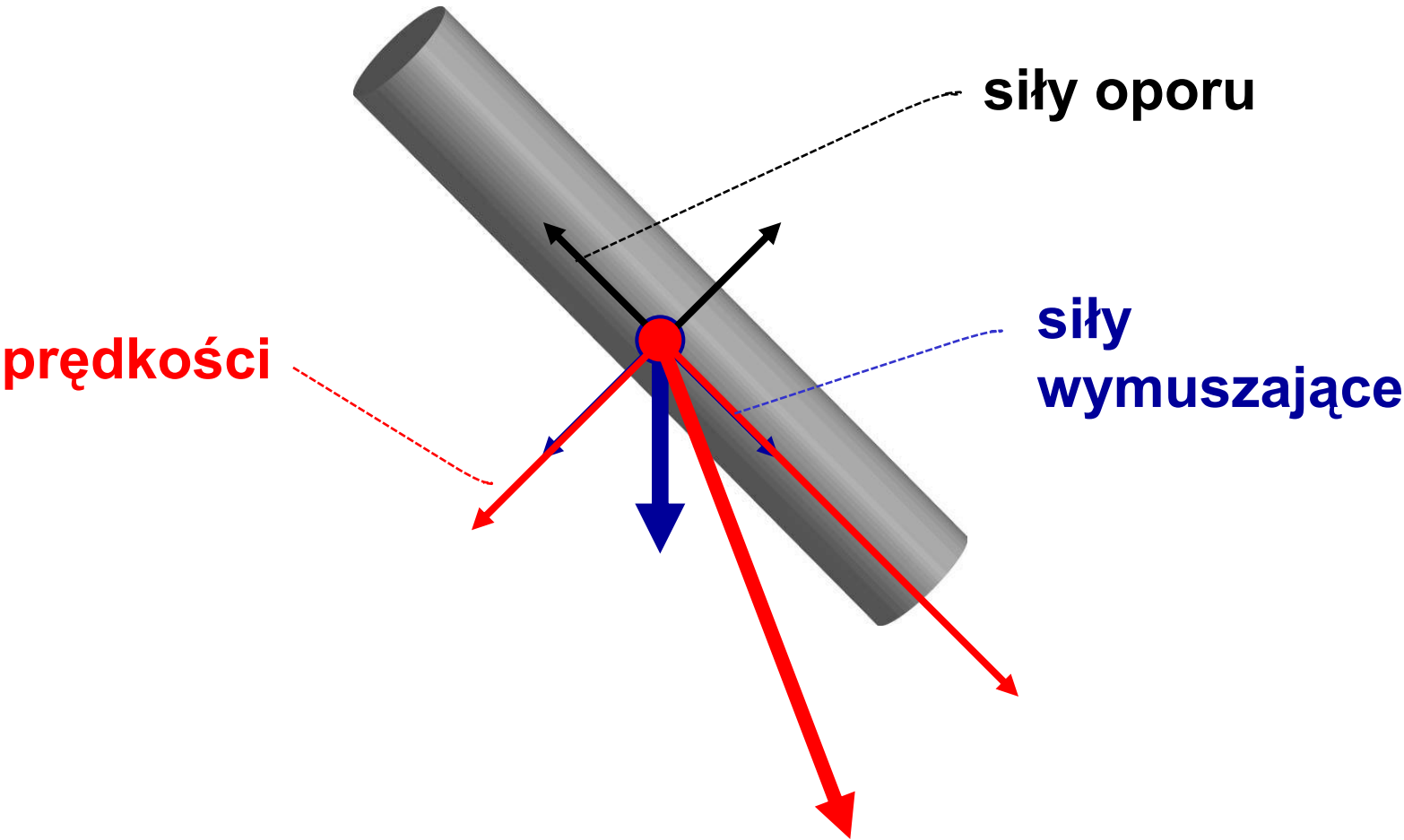
D. Blair, FEBS Lett (2003)



Protonic Nanomachine Project (Japan)

<http://www.npn.jst.go.jp/index.html>

# dlaczego rotująca falgella napędza bakterię?



wypadkowa prędkość nie jest równoległa do przyłożonej siły



# dlaczego rotująca falgella napędza bakterię?

$Re \ll 1$  :  
prędkość  $\propto$  siła

$$\mathbf{F} = -\mathbf{F}_{op} = -D\mathbf{u}$$

opór hydrodynamiczny

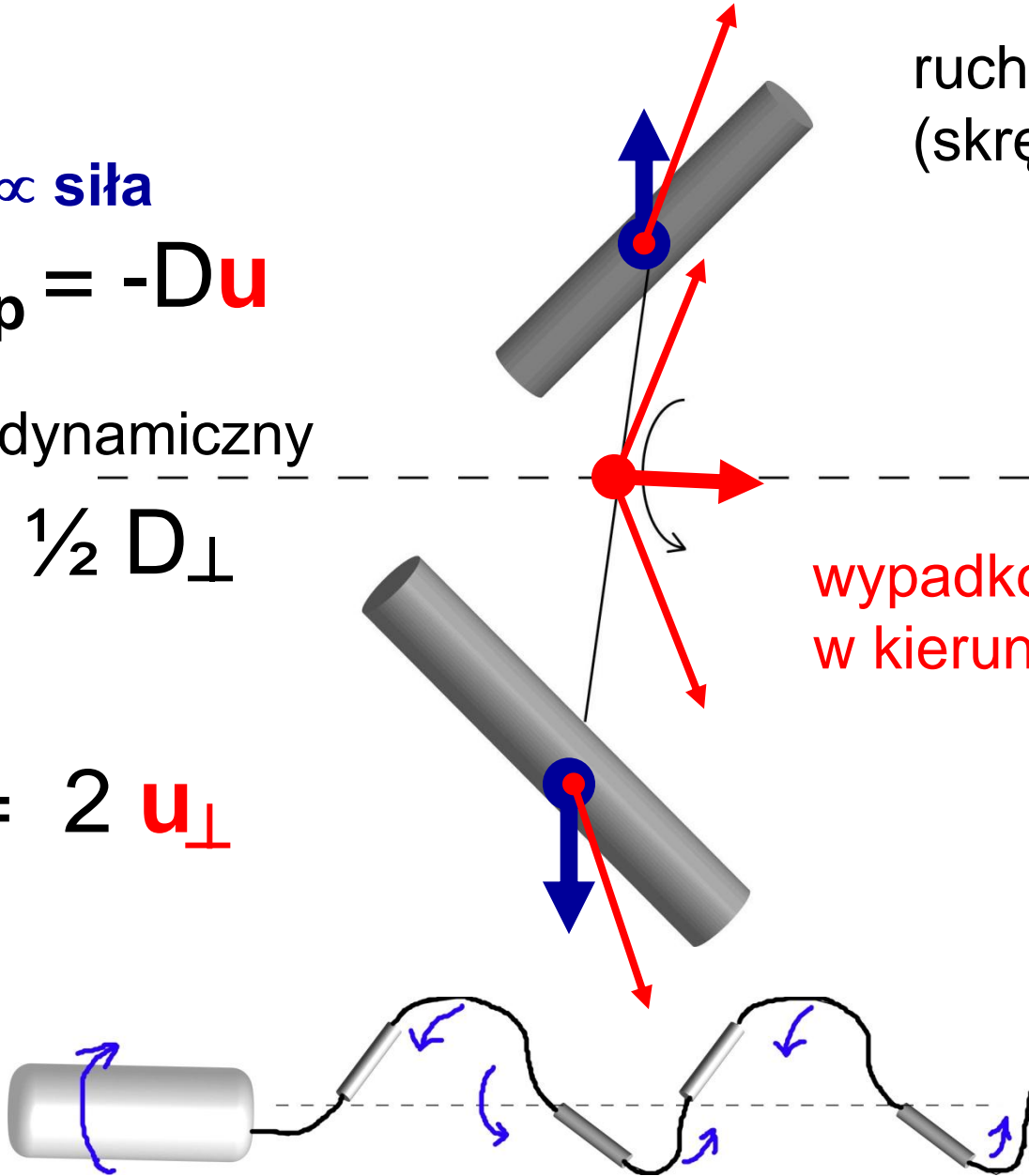
$$D_{||} = \frac{1}{2} D_{\perp}$$

prędkości

$$\mathbf{u}_{||} = 2 \mathbf{u}_{\perp}$$

ruch asymetryczny  
(skrętny)

wypadkowa prędkość  
w kierunku osi obrotu



# dlaczego rotująca falgella napędza bakterię?

- częst. obrotu  $\sim 100$  Hz
- prędkość  $\sim 30$   $\mu\text{m/s}$

rec. at 500 Hz



H. Berg, Rowland Inst.

# pływanie w objętości:

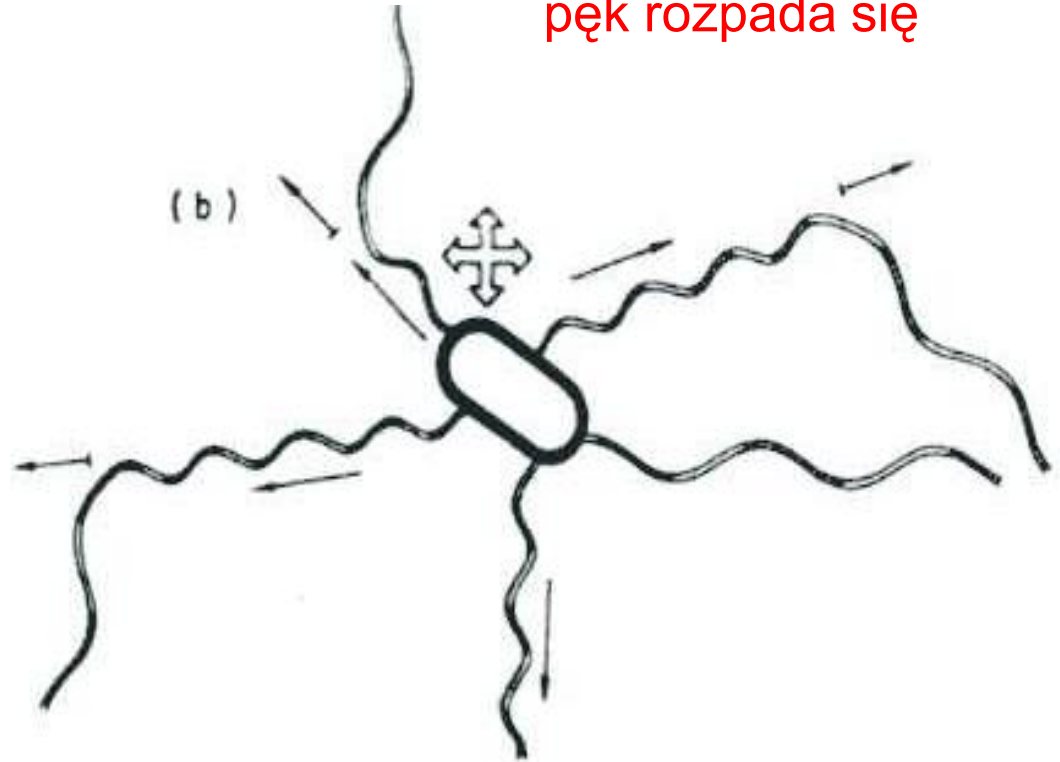
## do przodu:

silnik pracuje 'w lewo'  
flagelle zwijają się w pęk



## zmiana kierunku:

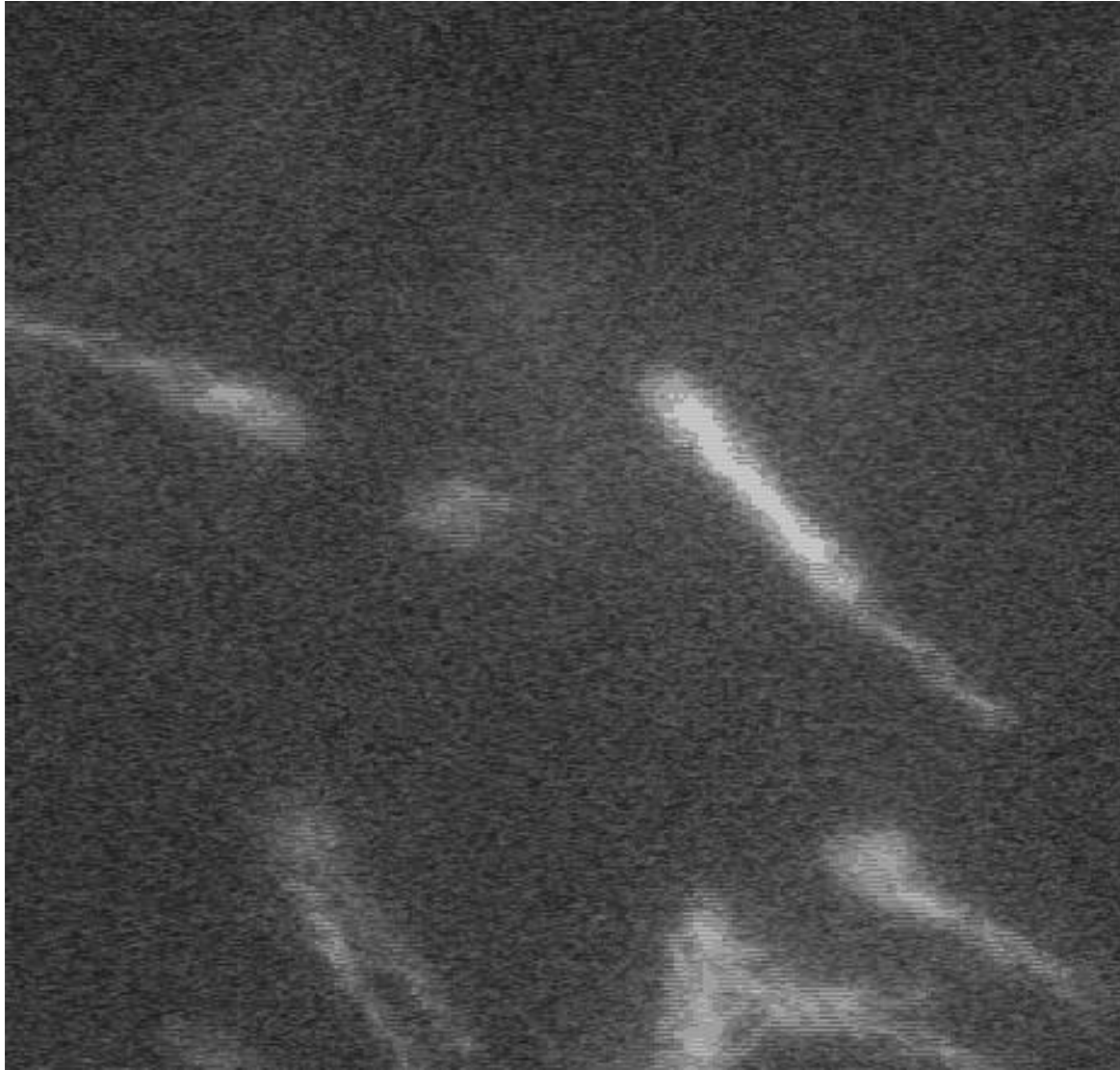
silnik pracuje 'w prawo'  
pęk rozpada się



MacNab & Orston *J Mol Biol* (1977) 112: 1-30

praca silnika sterowana jest przez mechanizm sensoryczny czuły na poziom stężenia odżywek

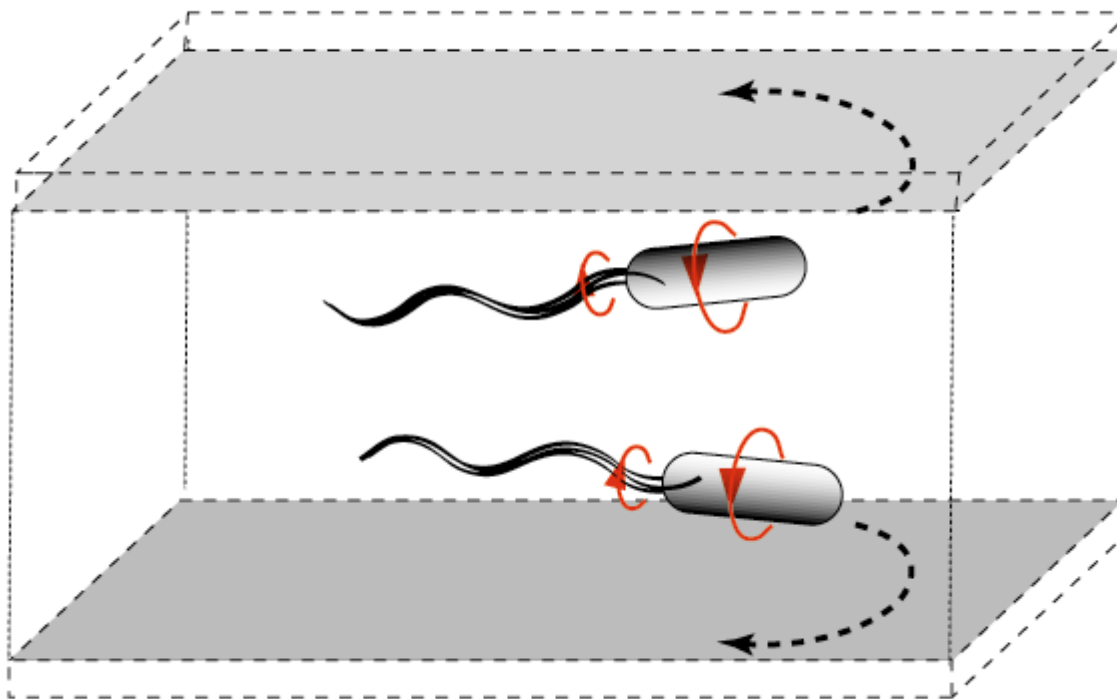
## pływanie w objętości:



H. Berg, Rowland Inst.

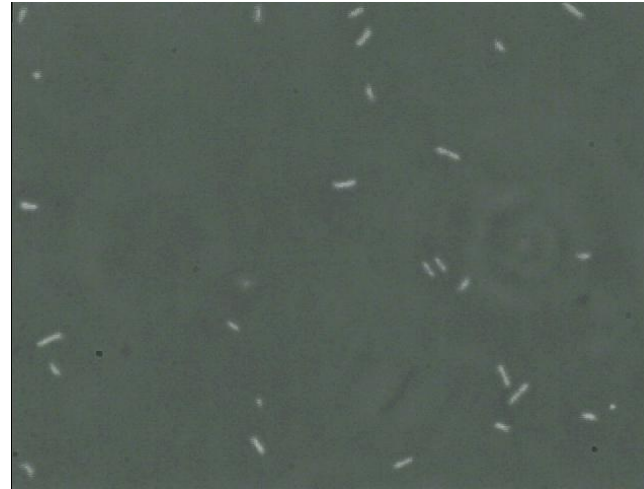
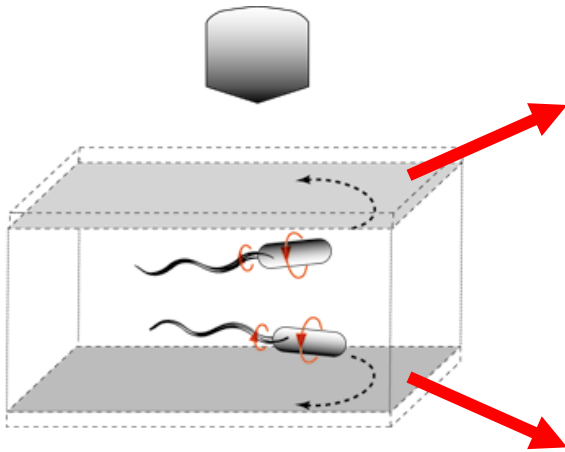
## pływanie przy powierzchni:

ruch obrotowy ciała i witek powoduje, że komórki pływają po trajektoriach okrężnych



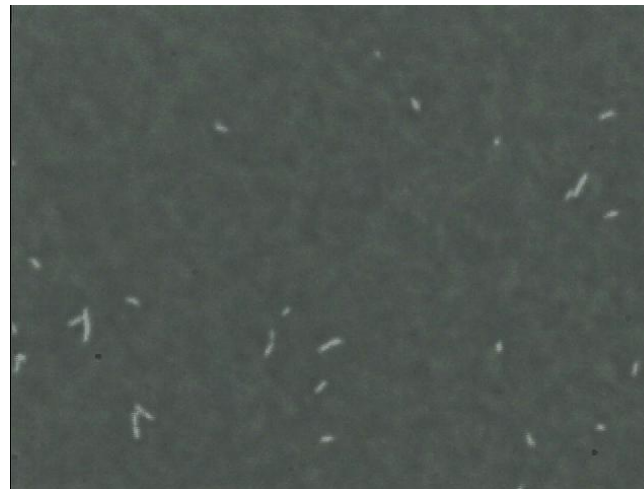
# pływanie przy powierzchni:

obserwacja z góry



obserwowane  
trajektorie:

w lewo  
**przeciwnie do ruchu  
wskazówek zegara**  
na górnej powierzchni



w prawo  
**zgodne z ruchem  
wskazówek zegara**  
na dolnej powierzchni

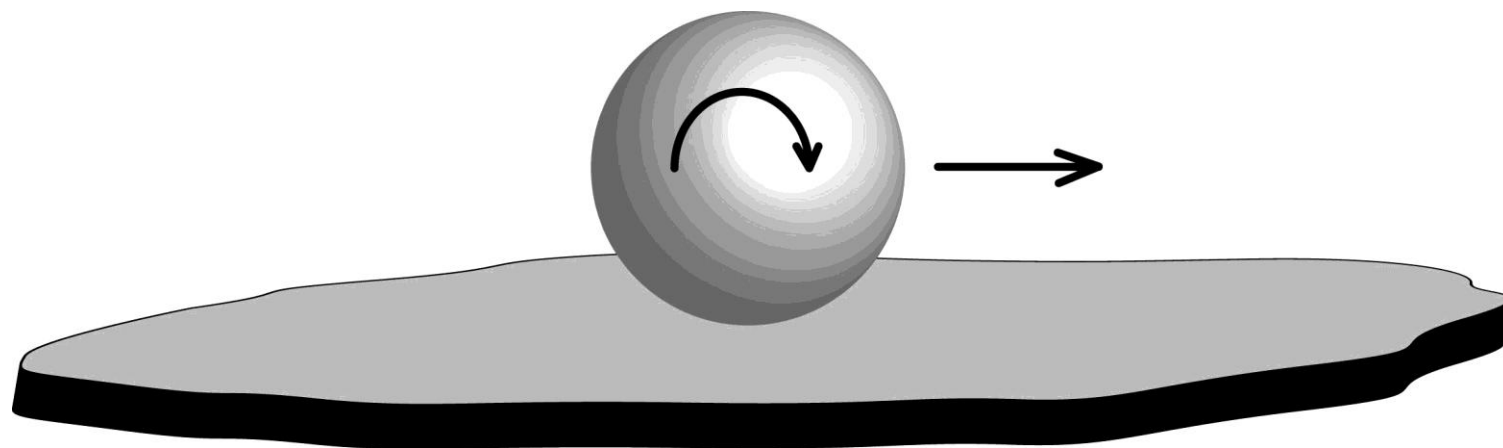
szczep zmutowany  
(HCB-437),  
prędkość 30-40  $\mu\text{m/s}$

(czas rzeczywisty)

15  $\mu\text{m}$

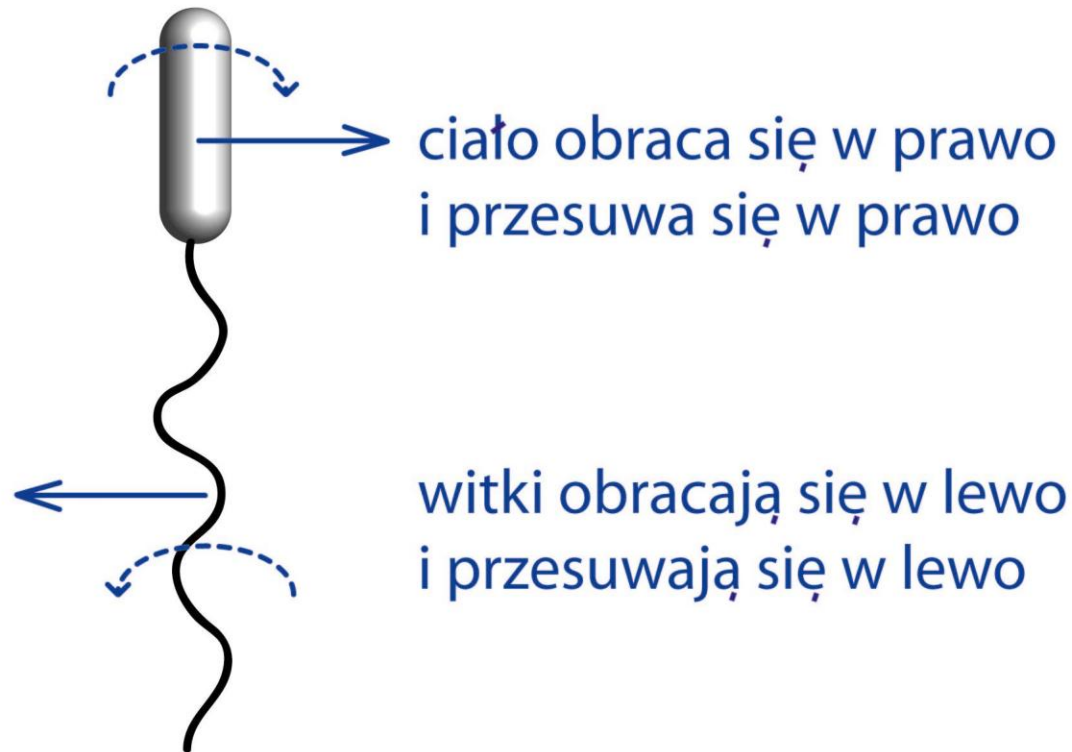


**kula w pobliżu powierzchni –  
– sprzężenie rotacji z translacją**

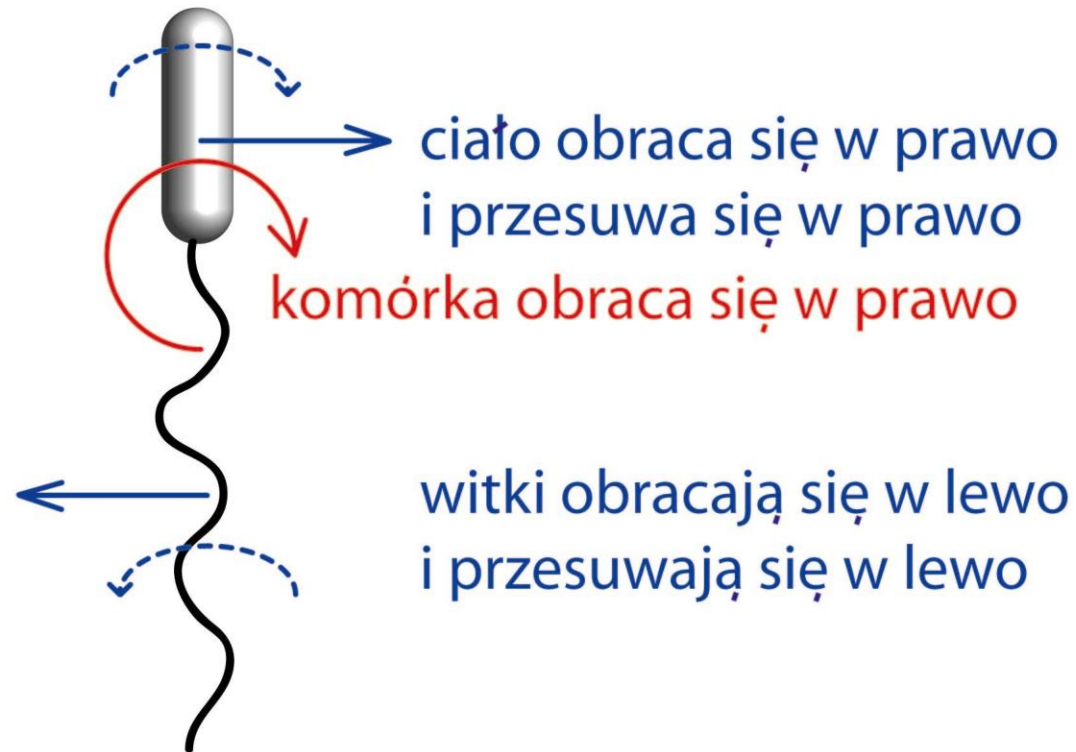


# dlaczego bakterie pływają w kółko?

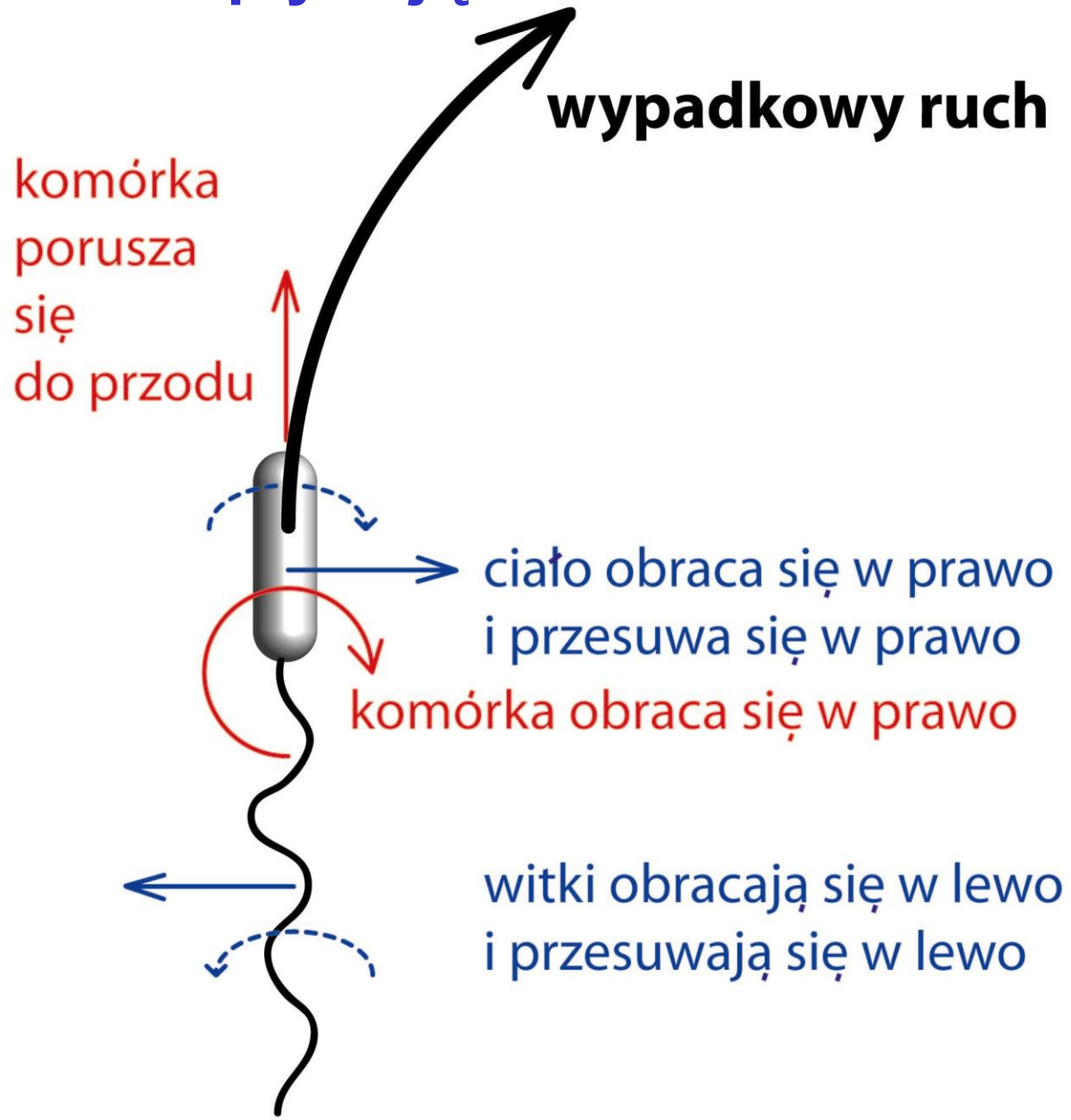
(patrzemy z *góry* na bakterię pływającą tuż *nad* powierzchnią)



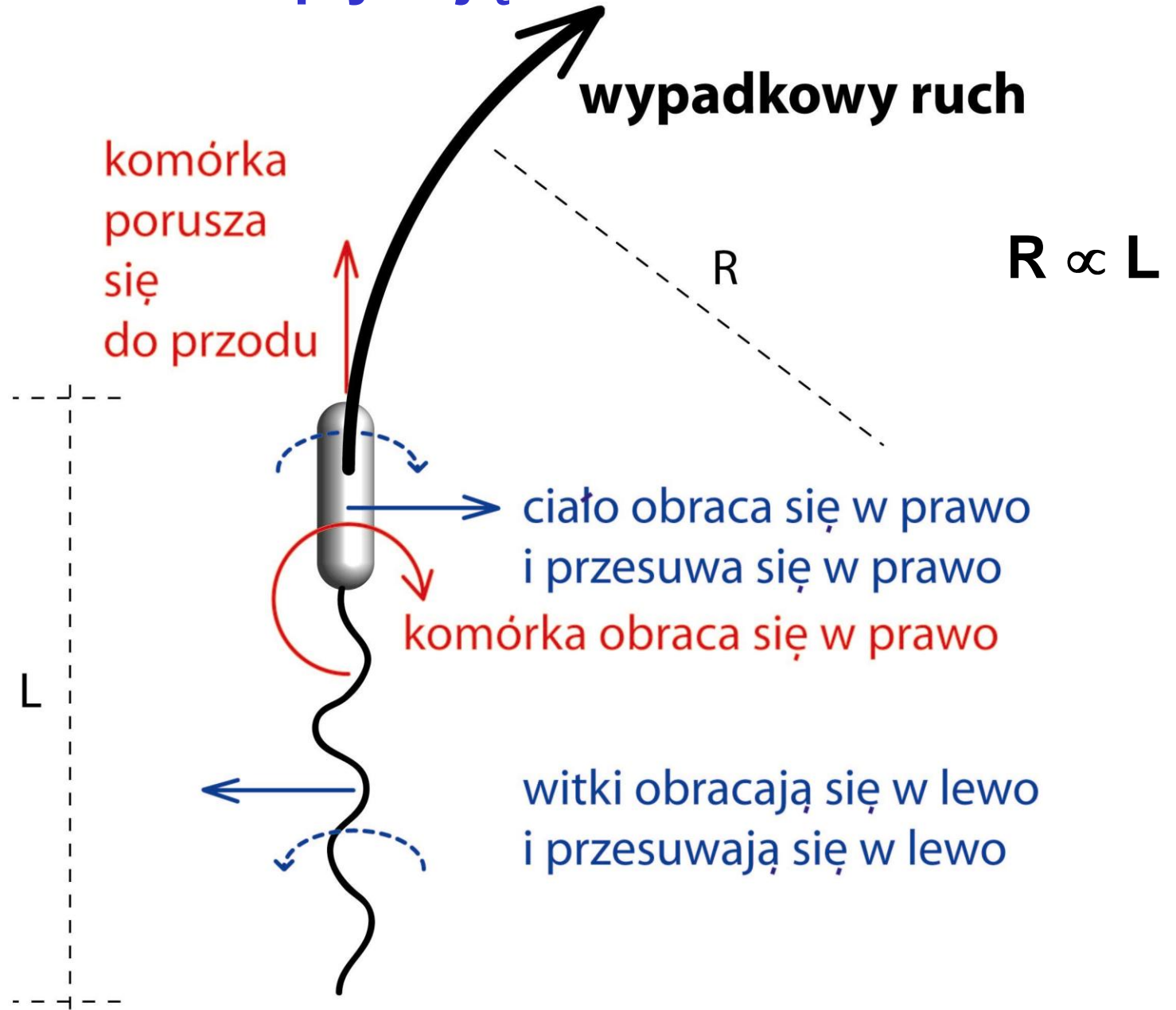
# dlaczego bakterie pływają w kółko?



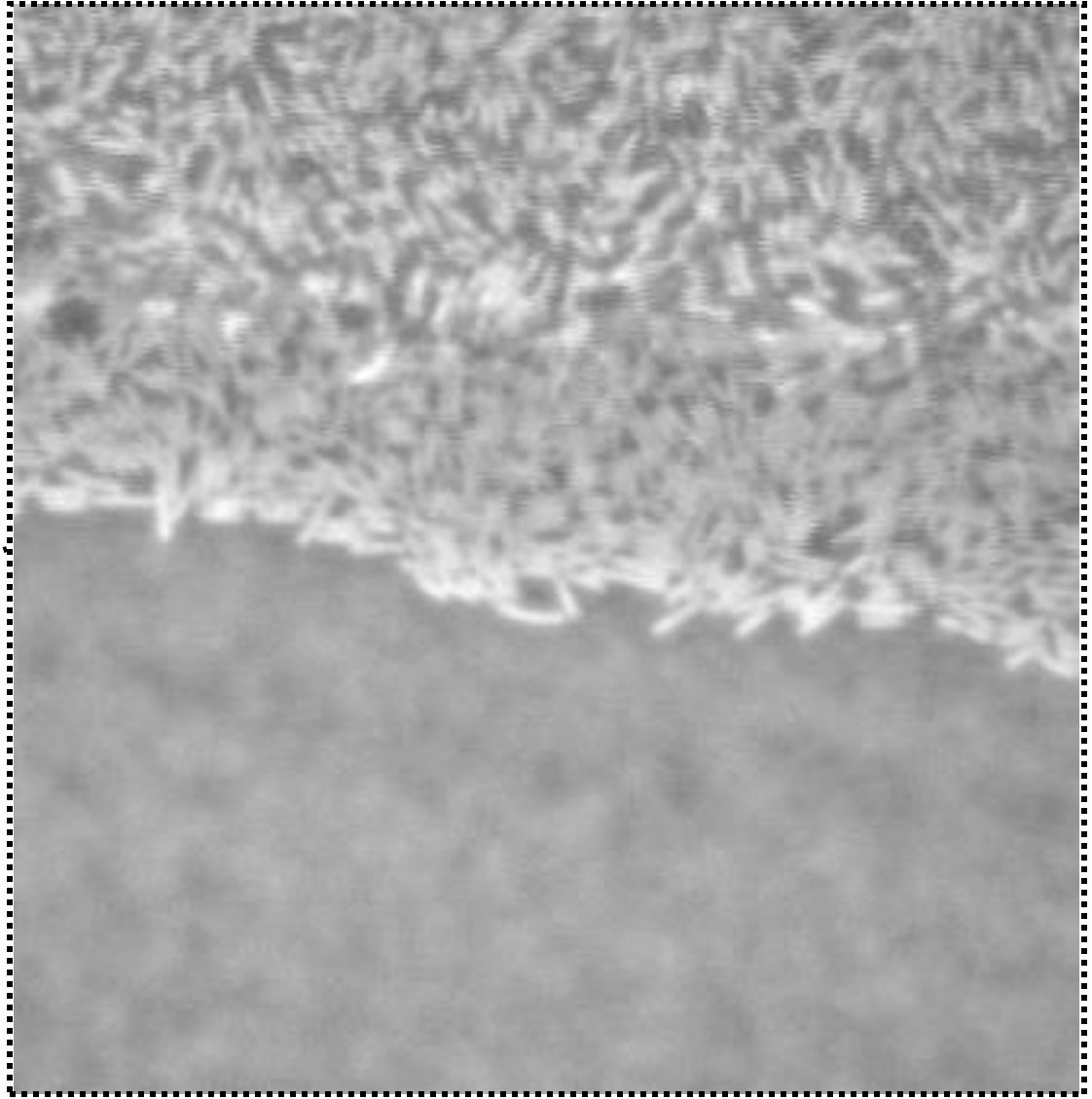
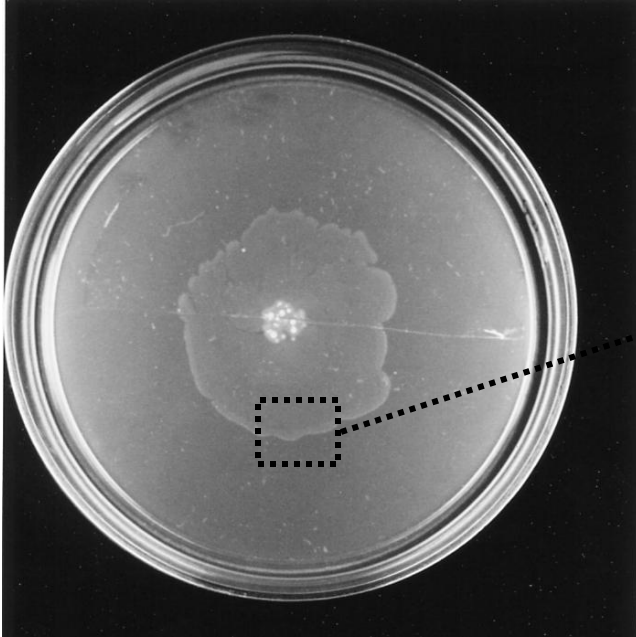
# dlaczego bakterie pływają w kółko?



# dlaczego bakterie pływają w kółko?

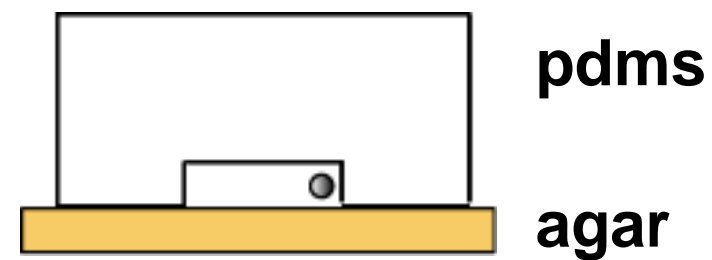
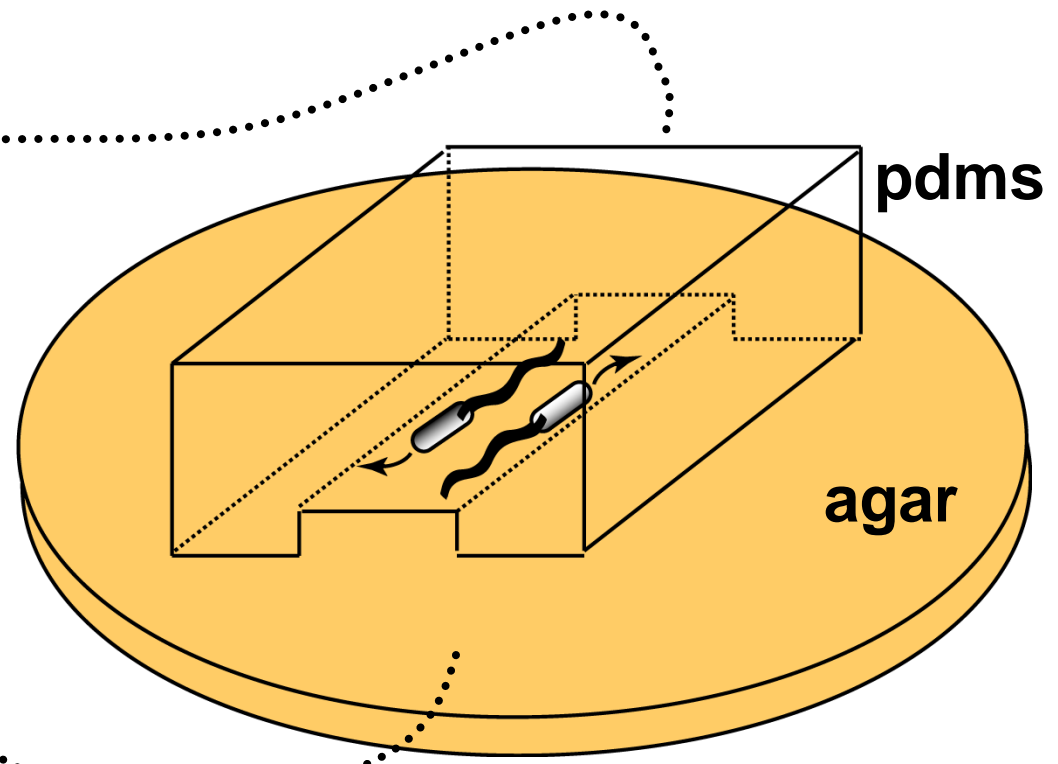
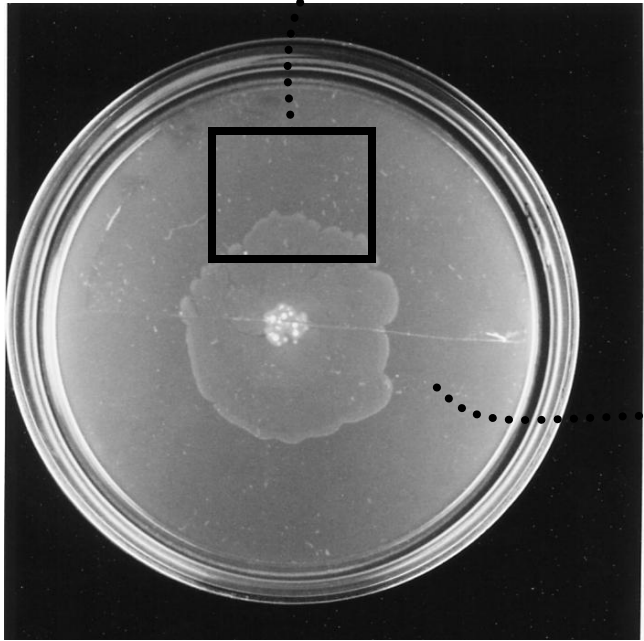


eksperyment:





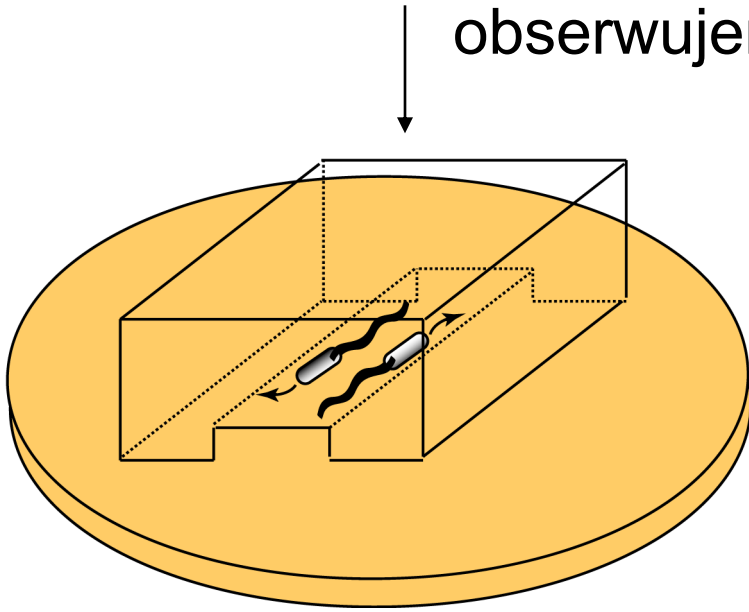
# eksperyment:



- elastomer z wyżłobionymi kanałami tworzy ściany i sufit kanału, a żel agarowy jego podłogę
- bakterie wpływają do kanalików

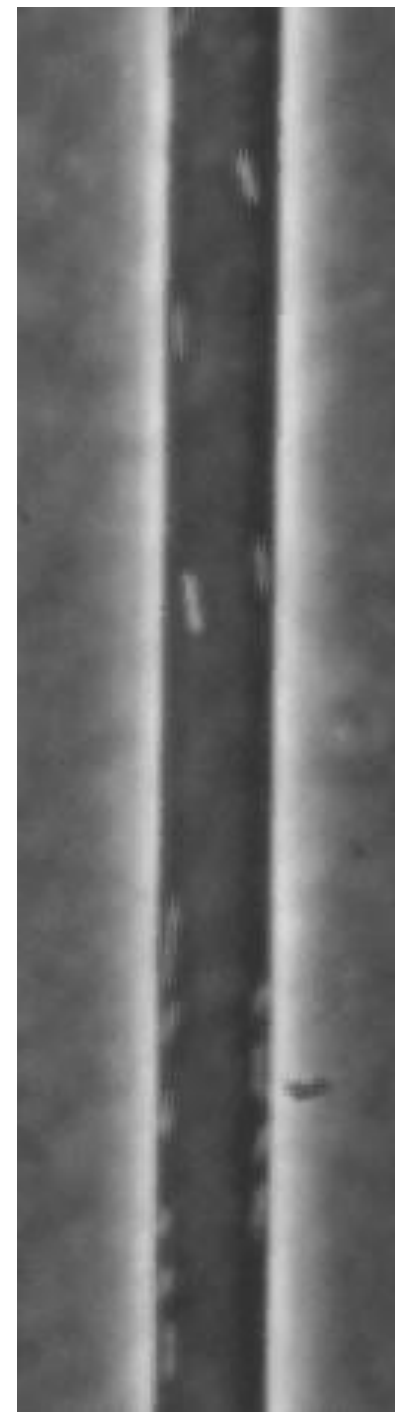
# eksperyment:

obserwujemy z góry:



→ bakterie pływają bliżej podłogi  
(potwierdzone bezpośrednio  
mikroskopią fluorescencyjną)

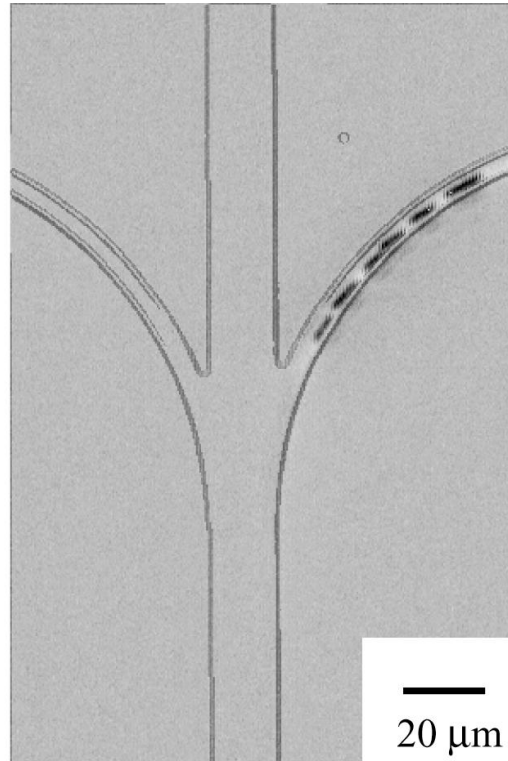
→ dlaczego?



10  $\mu\text{m}$

# eksperymenty ilościowe

bakterie płynące  
„pod sufitem”  
płyną w lewo

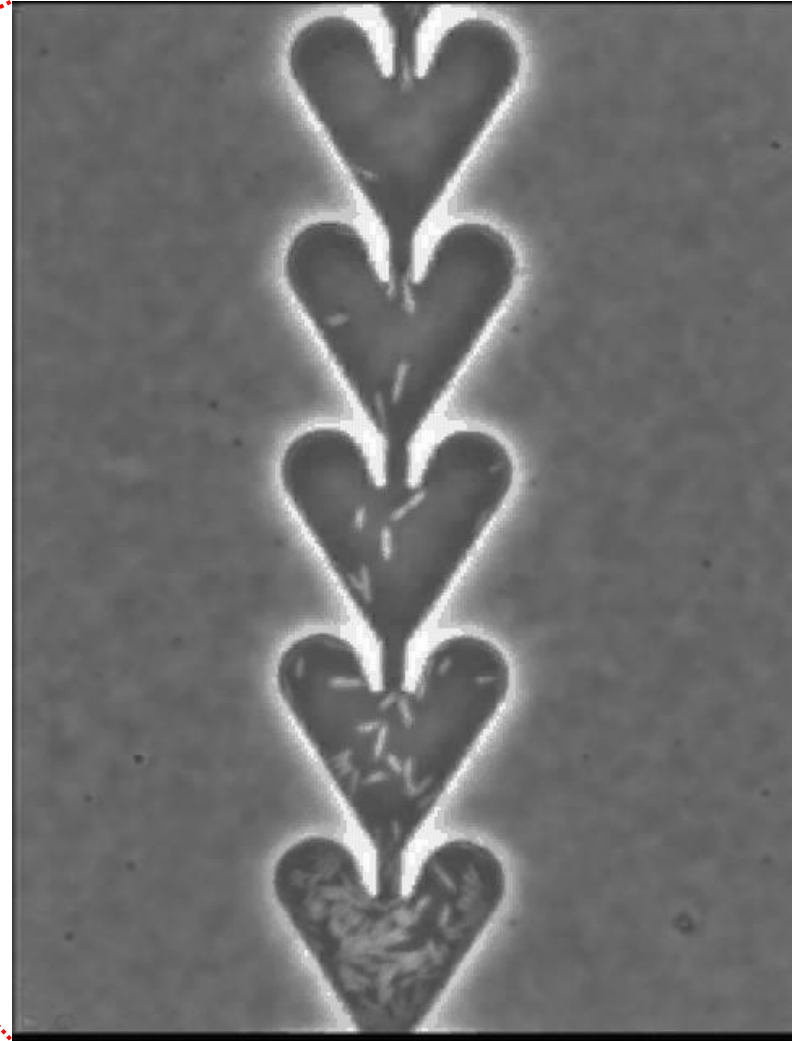
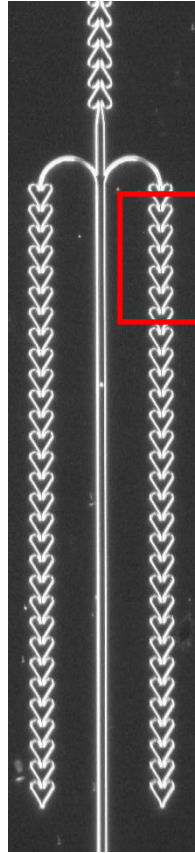


bakterie płynące  
„po podłodze”  
płyną w prawo

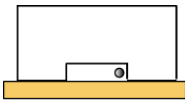
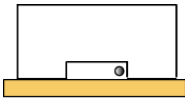
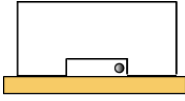
co zmieniamy:

- szczep *E. coli*,
- materiały, orientację kanału
- siłę jonową roztworu,
- surfaktanty
- wysokość kanalików

# liczenie bakterii – rozwidlenie i pułapki

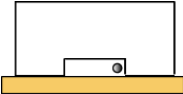
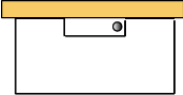


# szczep

Szczep	Materialy (1.4 $\mu\text{m}$ wysokości)	% w prawo
AW405 (wild type)	 PDMS Agar	$75 \pm 7$
RP437 (wild type)	 PDMS Agar	$77 \pm 2$
HCB437 (smooth-swimming)	 PDMS Agar	<b><math>88 \pm 7</math></b>

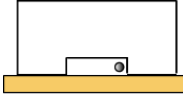
**skłonność do pływania prawą stroną nie zależy od szczepu bakterii**

# orientacja kanalików

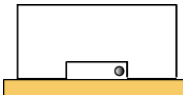
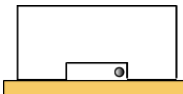
Strain	Materiały (1.4 $\mu\text{m}$ wysokości)	% w prawo
HCB437 (smooth-swimming)	 PDMS Agar	<b>88 <math>\pm</math> 7</b>
HCB437	 Agar PDMS	16 $\pm$ 13

**nie jest wynikiem grawitacji**

# siła jonowa i surfaktanty

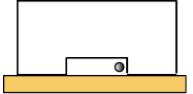
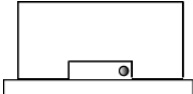
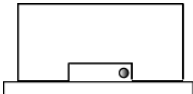
Szczep	Materialy (1.4 $\mu\text{m}$ wysokości)	% w prawo
HCB437 (smooth-swimming)	 PDMS Agar	$88 \pm 7$

**nie jest też wynikiem ani sił elektrostatycznych,  
ani powierzchniowych**

HCB437	 PDMS Agar vary ionic strength	$> 83$
HCB437	 PDMS Agar vary surfactants	$> 83$



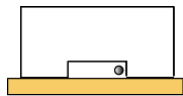
# materiał

Szczep	Materialy (1.4 $\mu\text{m}$ wysokości)	% w prawo
HCB437 (smooth-swimming)	 PDMS Agar	<b><math>88 \pm 7</math></b>
HCB437	 PDMS PDMS	$55 \pm 12$
HCB437	 PDMS Szkło	$53 \pm 2$

**porowatość powierzchni**

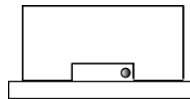
# hydrodynamika pływania przy powierzchni żelu

- prędkość pływania w mikrokanalach:



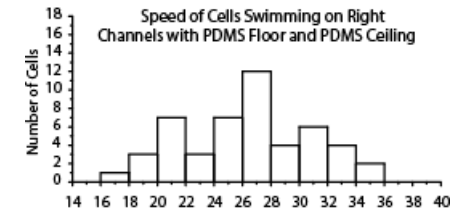
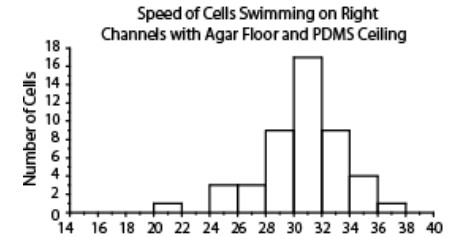
Agar/PDMS

$31 \pm 3 \mu\text{m/s}$

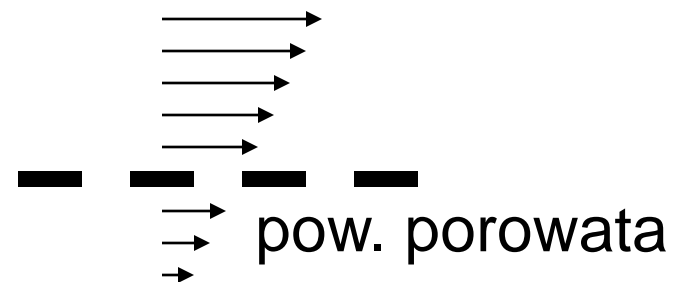
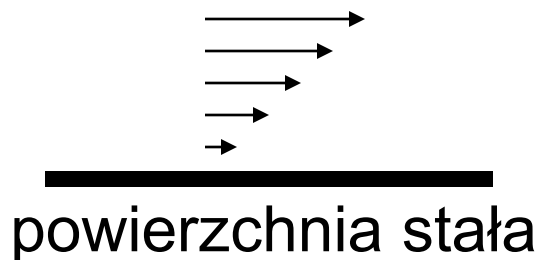


PDMS/PDMS

$26 \pm 5 \mu\text{m/s}$



- komórki doświadczają mniejszych oporów hydrodynamicznych, gdy płyną przy powierzchni porowatej



# wyniki

- bakterie pływają bliżej powierzchni agaru, nawet gdy mikrokanal jest odwrócony
- bakterie nie pływają prawą stroną gdy ‘podłoga’ i ‘sufit’ mikrokanalu wykonane są z tego samego materiału
- ani zmiana siły jonowej, ani zawartości surfaktantów nie zmieniają tendencji do pływania prawą stroną
- pływanie przy porowatej powierzchni wiąże się z mniejszymi oporami, niż pływanie przy powierzchni nieprzepuszczalnej
- *‘pływanie prawą stroną’* jest efektem **oddziaływań hydrodynamicznych**

# znaczenie / zastosowania

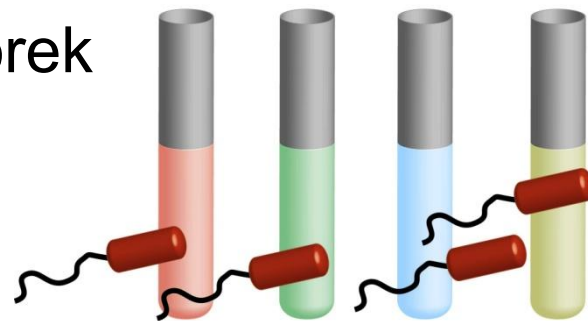
- wiele bakterii, w ich naturalnych środowiskach rośnie, dzieli się i migruje na powierzchniach – zrozumienie pływania przy powierzchniach jest istotne ze względu na rozumienie powstawania bio-powłok i zakażeń

- zautomatyzowane (przenośne) urządzenia do **bio-analiz**

ruch  
jednokierunkowy



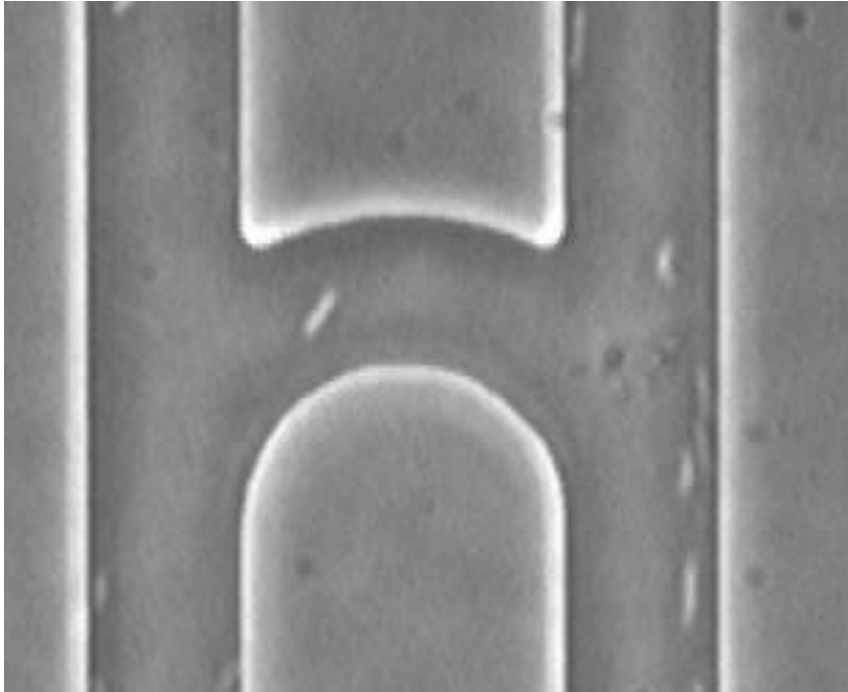
- wprowadzenie komórek
- ekspozycja
- inkubacja
- pomiar / analiza



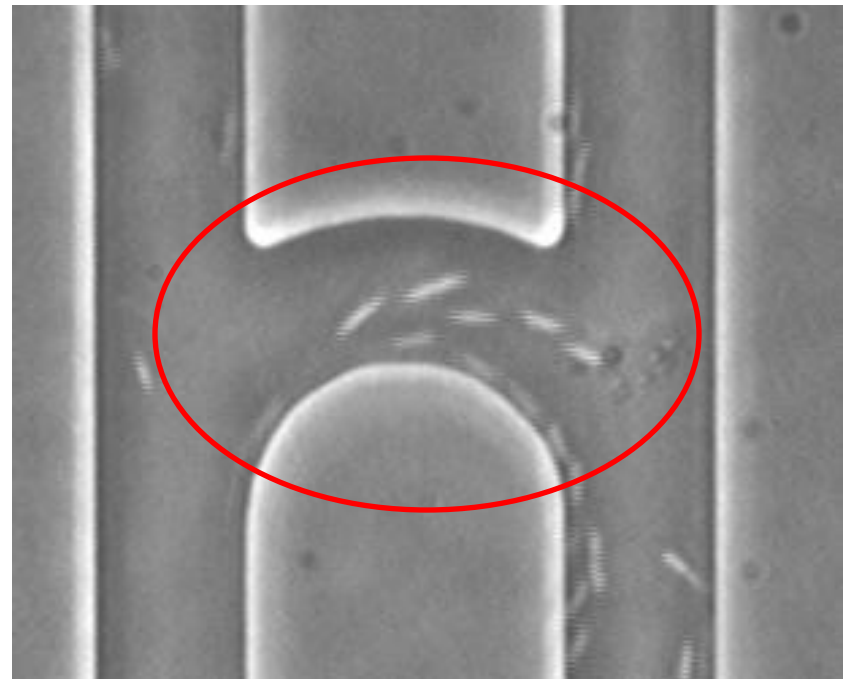
- **sortowanie ze względu na rozmiar komórki**

# sortowanie komórek ze względu na ich rozmiar

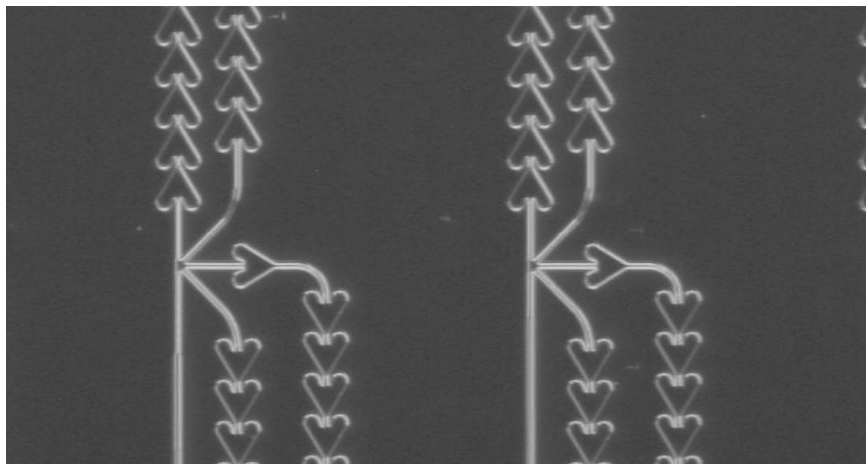
*E. coli* w mikrokanałach o wysokości 1.4  $\mu\text{m}$  (PDMS/agar)



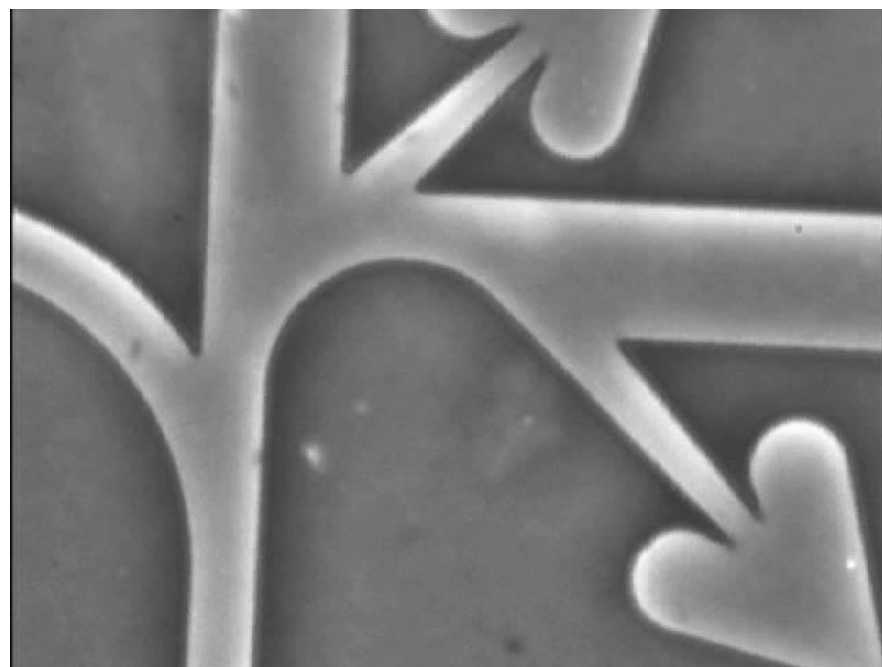
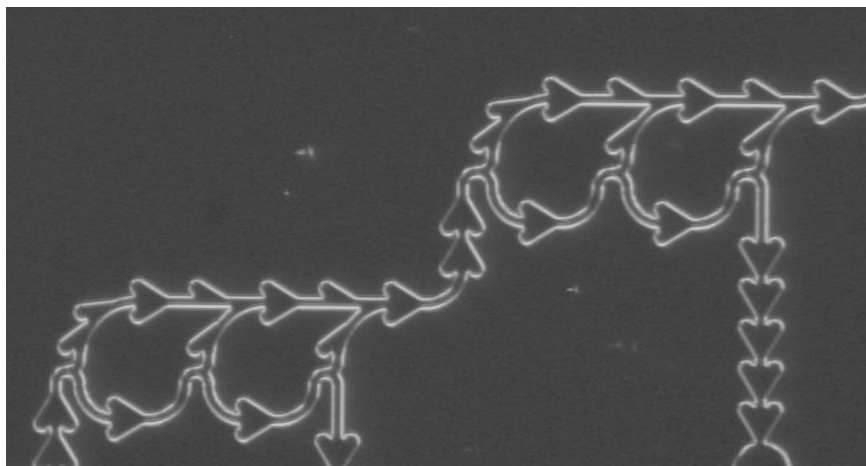
$$R \propto L$$



# prototyp



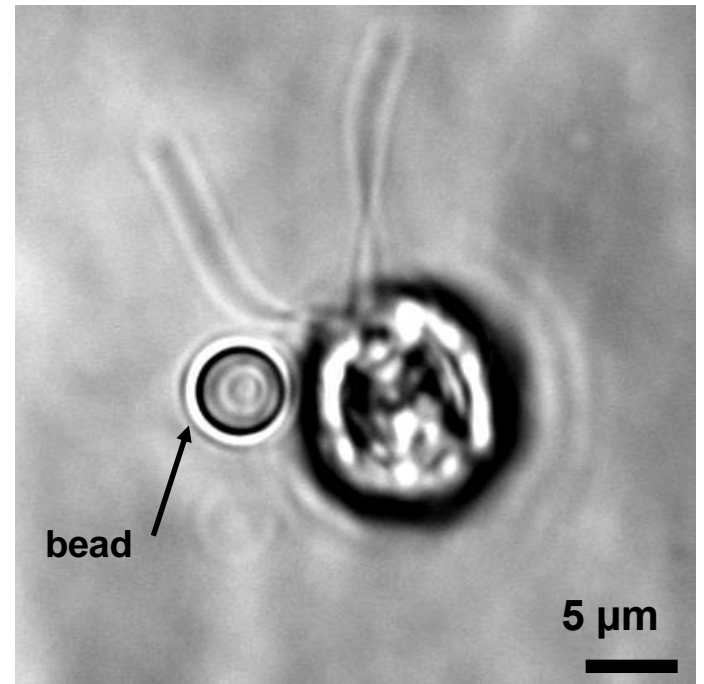
sortowanie i liczenie bakterii



czas rzeczywisty

**mikrowoły**

***Chlamydomonas reinhardtii***





# *manipulacja cząstek koloidalnych*

techniki:

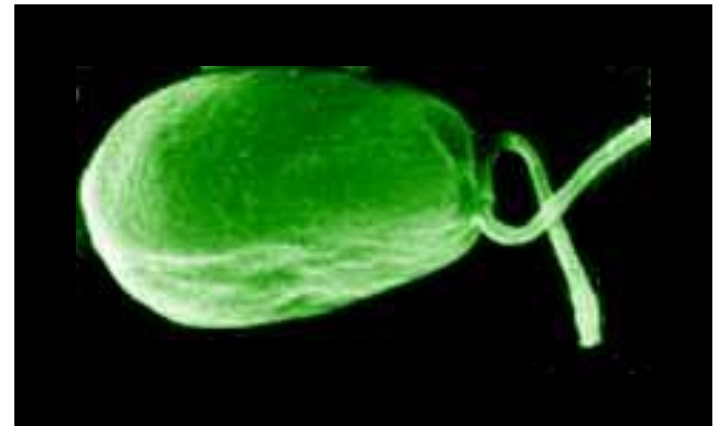
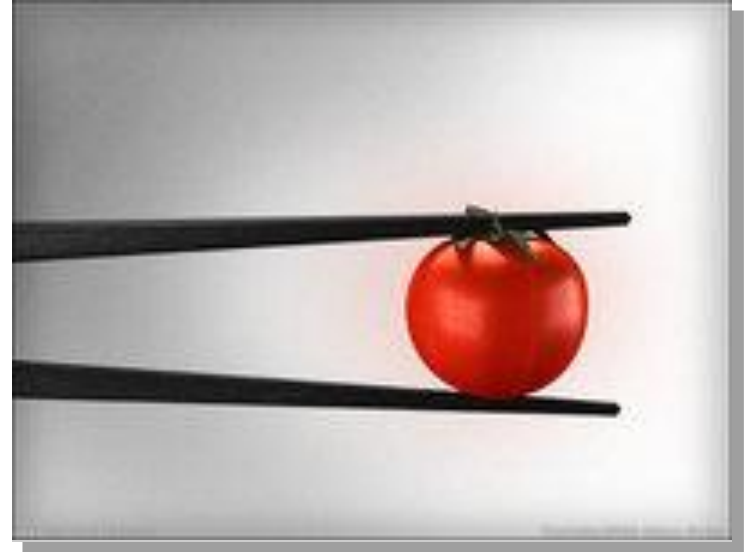
przepływy (hydrodynamika)

szczypscce optyczne

pola magnetyczne

pola elektryczne

wykorzystać silniki biologiczne  
→ mikroorganizmy



Rosenbaum, Yale

# **cel: zaprząć jednokomórkowe glony do przenoszenia ładunków**

wykorzystać ruchliwość komórek

wykorzystać *nienaruszone*

'silniki' biologiczne

## **strategia**

### **przyczepianie ładunku**

chemia powierzchni ściany komórkowej

### **sterowanie**

chemotaksja, fototaksja

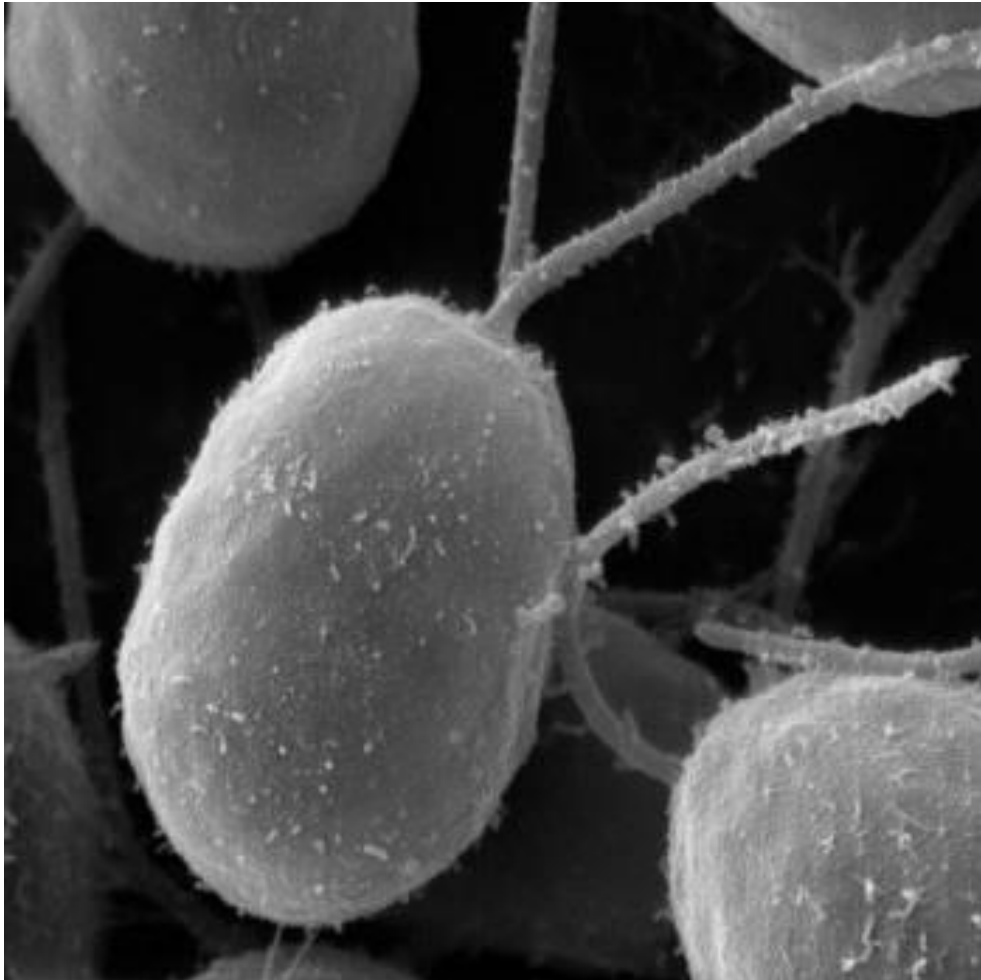
### **odczepianie ładunku**

fotokemia



*jednokomórkowy glon  
zawłotnia*

# *Chlamydomonas reinhardtii*



średnica:  $10 \mu\text{m}$  (~okragła)

gęstość:  $1.06 \text{ g cm}^{-3}$

szybkość:  $100\text{--}200 \mu\text{m sec}^{-1}$

bicie witki:  $25 - 50 \text{ Hz}$

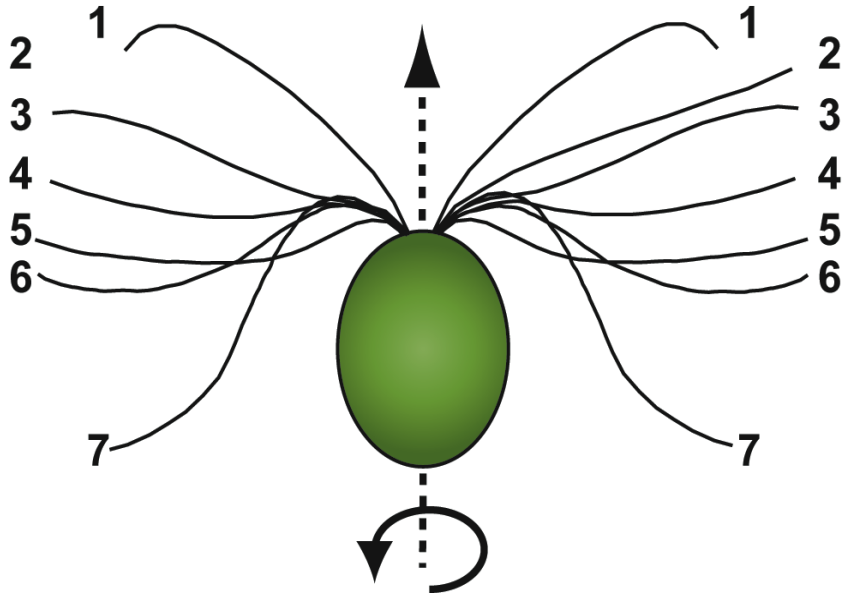
siła:  $10^{-6} \text{ g cm sec}^{-2}$

Reynolds #:  $10^{-3}$  (dla ciała)

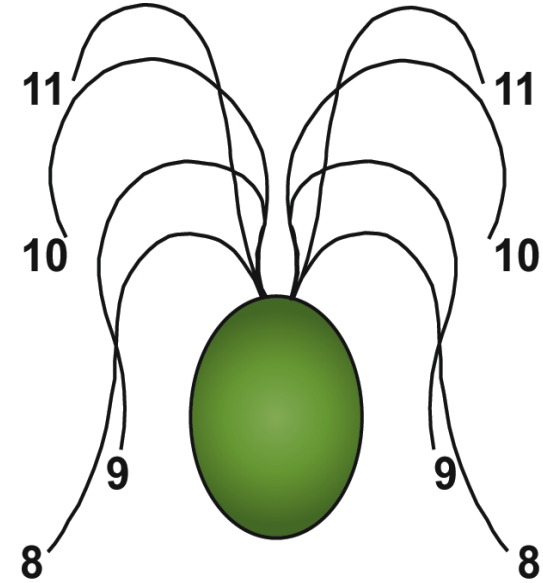
czas życia: ~3 days

# *mechanizm pływania*

## Power Stroke



## Recovery Stroke



szerokość witki ~ 250 nm

długość witki ~ 15  $\mu\text{m}$

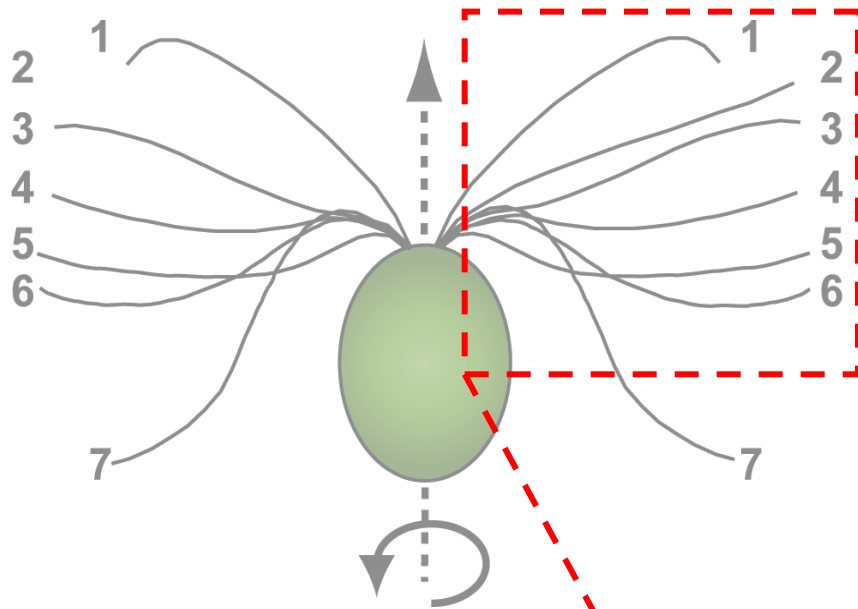
bicie witek ~ 50 Hz

komórka obraca się ~ 2 Hz

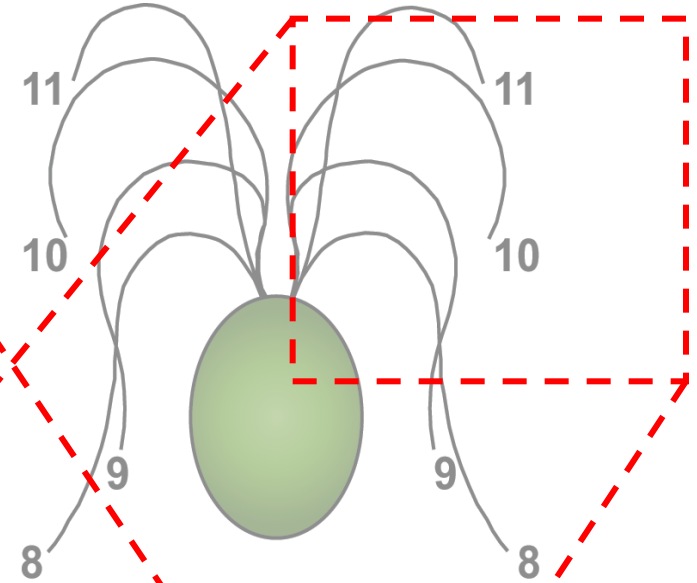
szybkość ciała ~ 100 – 200  $\mu\text{m/s}$

# *mechanizm pływania*

## Power Stroke



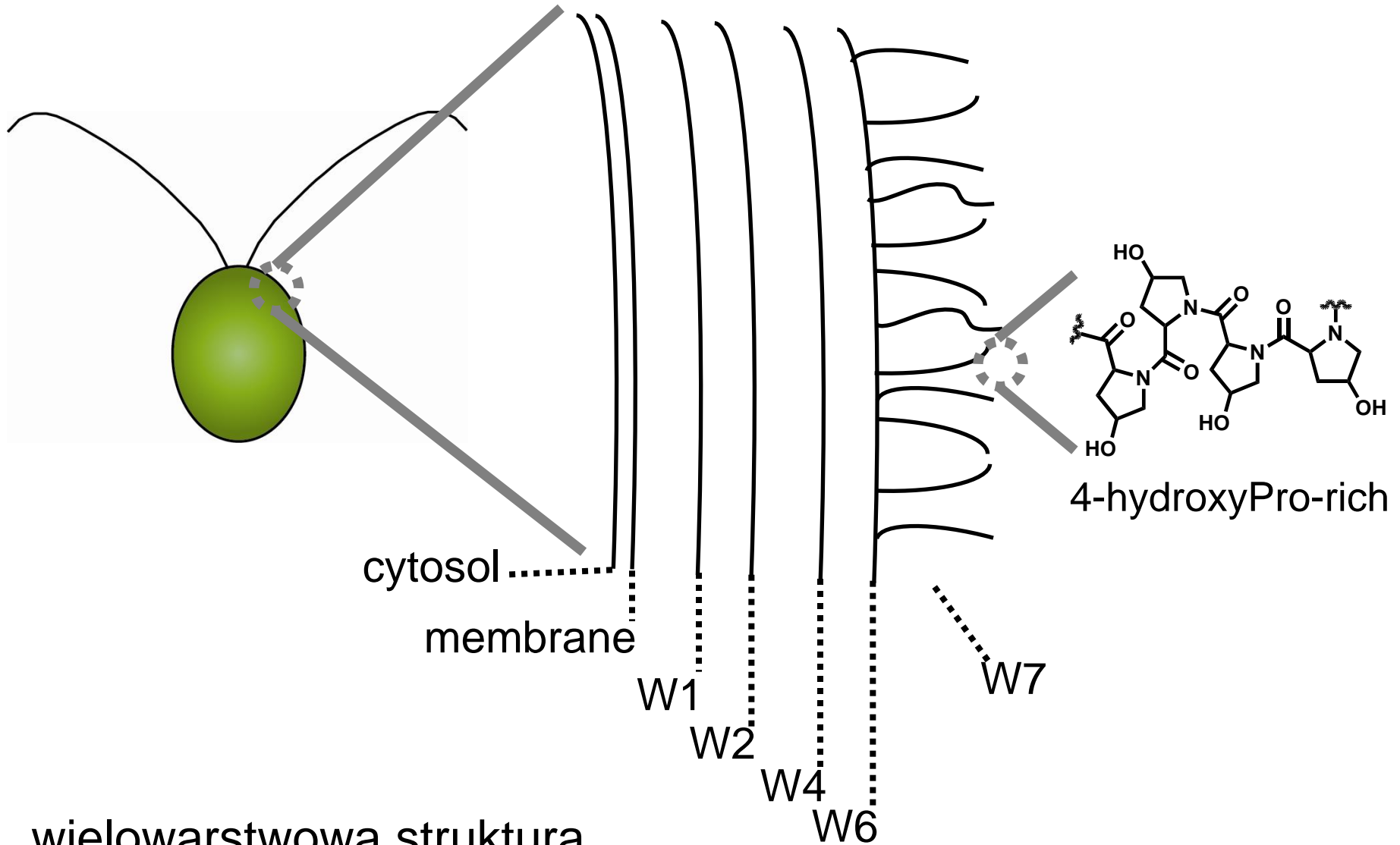
## Recovery Stroke



- szerokość witki ~ 250 nm
- długość witki ~ 15  $\mu\text{m}$
- bicie witek ~ 50 Hz
- komórka obraca się ~ 2 Hz
- szybkość ciała ~ 100 – 200  $\mu\text{m/s}$



# struktura ściany komórkowej



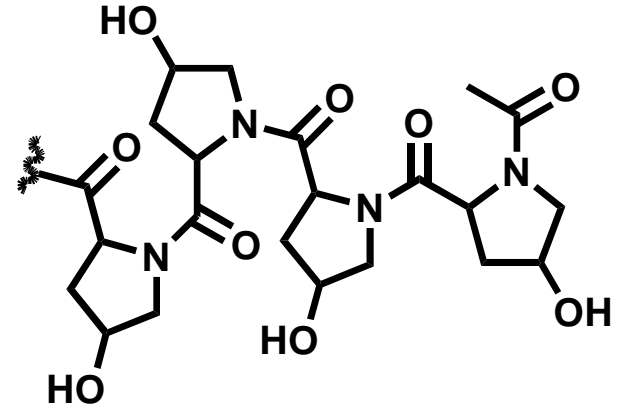
wielowarstwowa struktura

składająca się z glikopeptydów bogatych w 4-hydroksyproliny

# przyczepianie ładunku

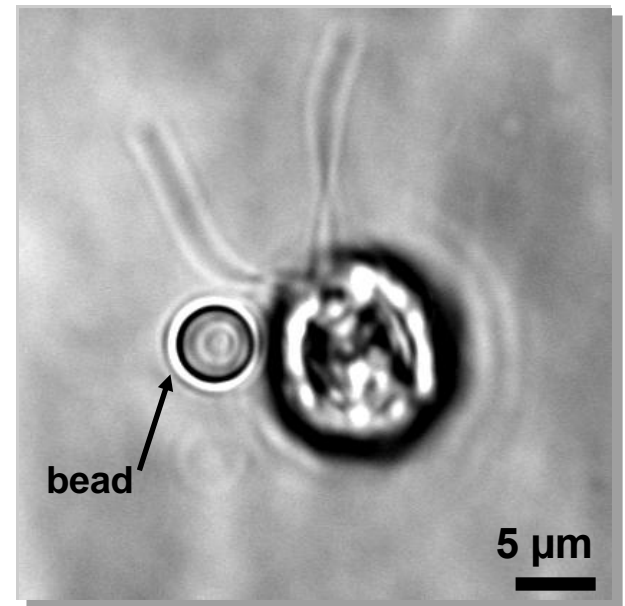
powierzchnia cząstek koloidalnych  
pokryta polipeptydami zakończonymi  
grupami 4-hydroksprolinowymi

tak przygotowane cząstki przyczepiają  
się do komórek



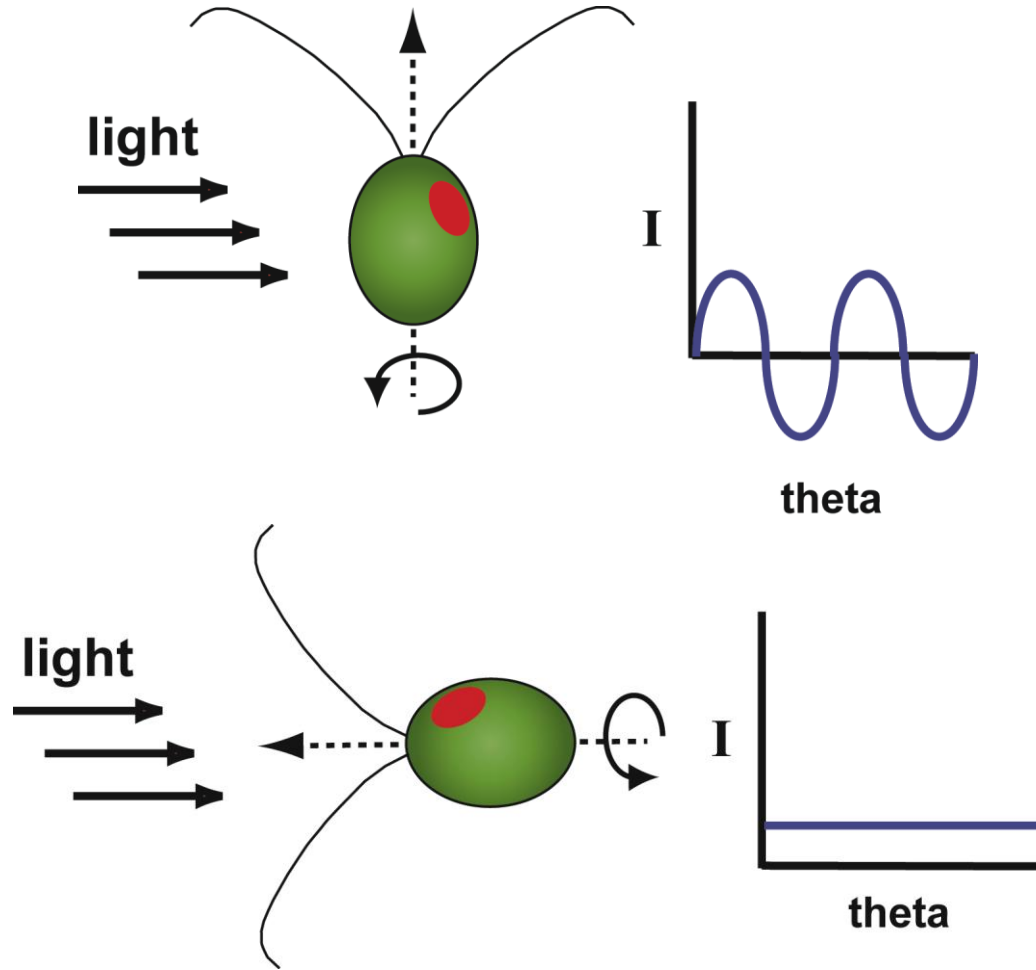
film

komórki z przyczepionymi cząstkami  
pozostają ruchliwe ( $100\text{-}200\ \mu\text{m sec}^{-1}$ )





# *(elementy) mechanizmu fototaksji*



Szczegóły nie są znane. Prawdopodobnie komórki muszą pamiętać natężenie światła.

# *sterowanie komórkami: fototaksja*

intensywność światła	kierunek ruchu	fototaksja	długość światła
----------------------	----------------	------------	-----------------

b. wysoka	brak		
-----------	------	--	--

wysoka	*od* światła	ujemna	
--------	--------------	--------	--

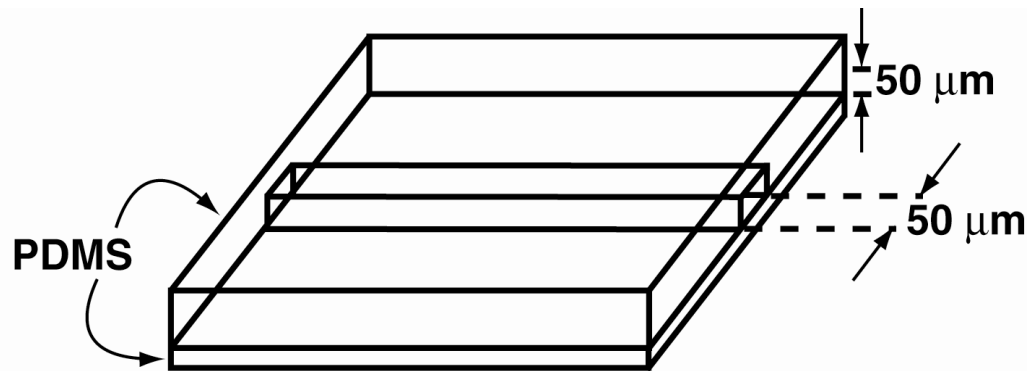
$\lambda_{\max}$  500 nm

średnia	*do* światła	dodatnia	
---------	--------------	----------	--

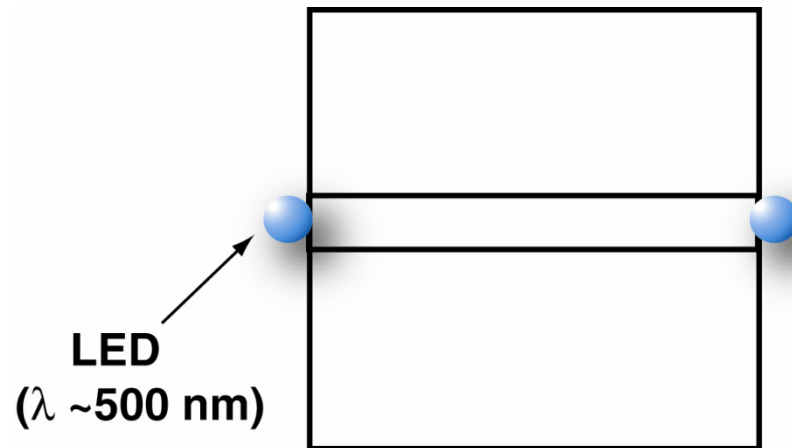
zero	losowy		
------	--------	--	--

# fototaksja – sterowanie w mikrokanalach

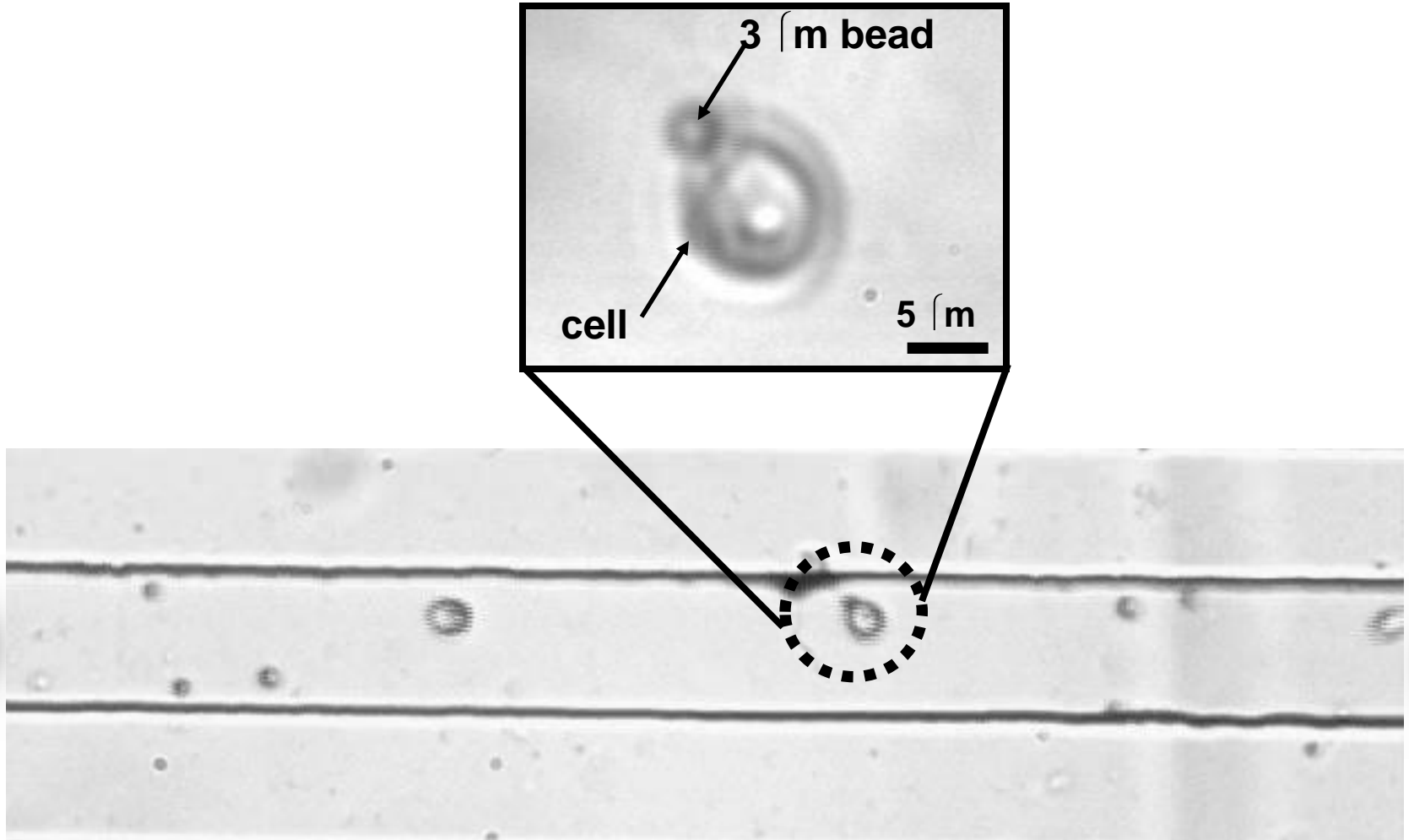
widok perspektywiczny



widok z góry

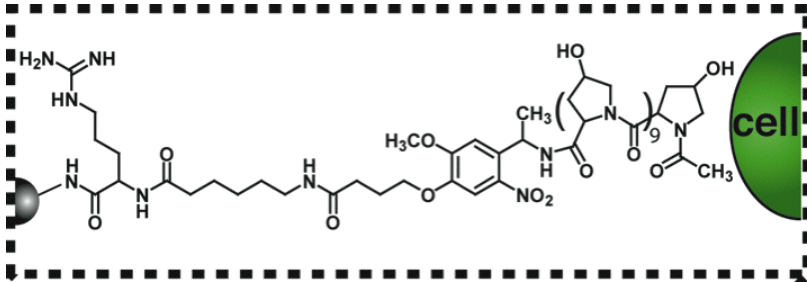


# *fototaksja – sterowanie*

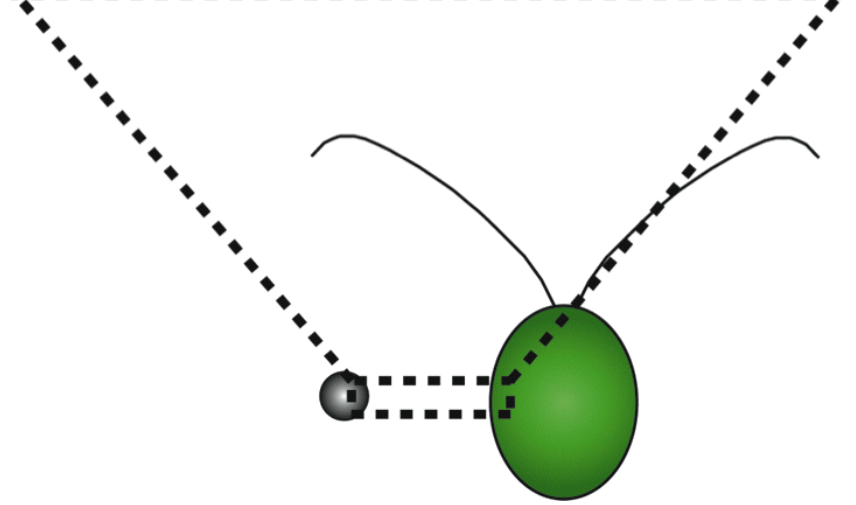
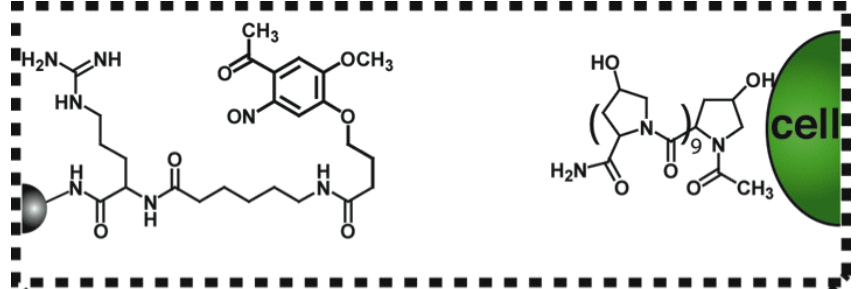
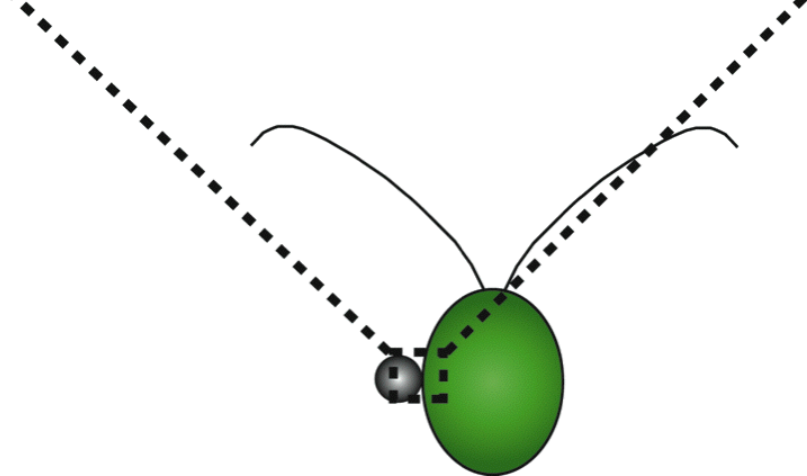


obciążone komórki przebywają conajmniej ~20-30 cm

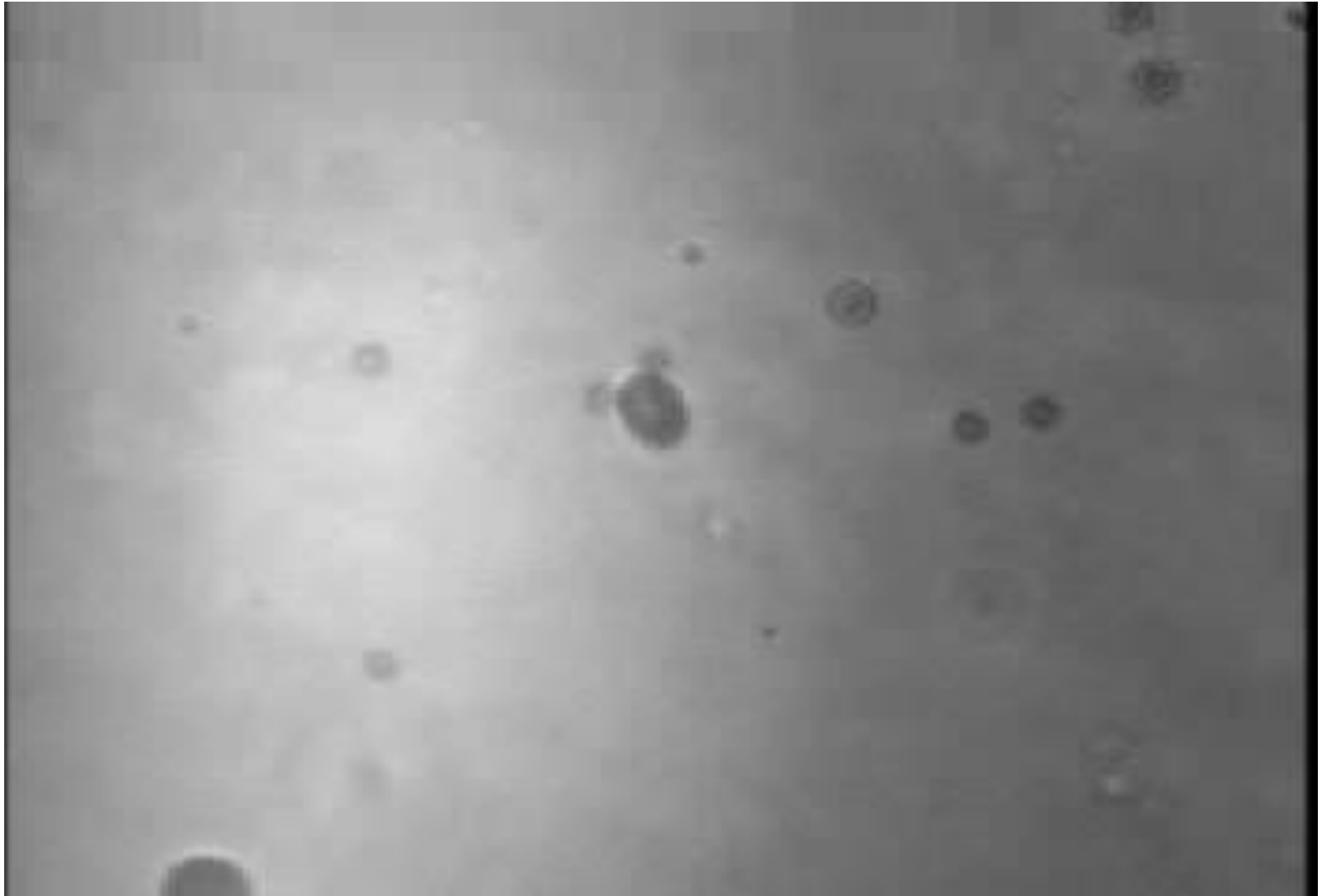
# odczepianie ładunku



UV,  $\lambda=365$  nm



# *odczepianie ładunku*



UV,  $\lambda=365$  nm

# *mikromuły – zawłotnie juczne*

- ‘proof-of-principle’:
  - przyczepianie,
  - przenoszenie
  - odczepianie



- mobilne katalizatory?
- ekologia?
- self-assembly?
- ...?



- **układy mikroprzepływowe**
  - jedno/dwufazowe
  - zastosowania
- **E. coli w mikrokanalach**
  - pływają prawą stroną
  - efekty hydrodynamiczne
  - **zastosowania**
    - mikro—laboratoria
    - sortowanie komórek
- **mikromuły – zawłotnie juczne**

# podziękowania



Prof. George Whitesides  
Wydział Chemii  
Uniwersytet Harvarda



Dr Willow DiLuzio



Dr Douglas Weibel  
obecnie Profesor  
Univ. Wisconsin Medison

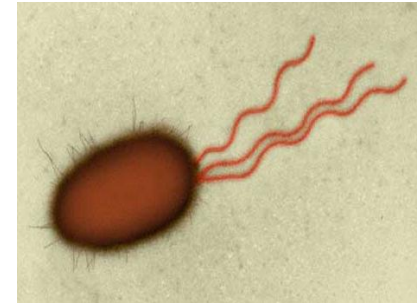
Prof. Howard Berg

Dr Linda Turner

Prof. Howard Stone

Prof. Eric Lauga

Prof. Michael Mayer



fundusze: NIH, NIH NRSA, DoE, MRSEC/NSF

Fundacja na rzecz Nauki Polskiej