



M Ű E G Y E T E M 1 7 8 2

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

Villamosmérnöki és Informatikai Kar

Elektronikai Technológia Tanszék

***E. coli* baktériumok detektálása, polimerrel
és antitestekkel bevont szenzorfelületeken
OWLS-sel**

Készítette:

Tarr Róbert Dániel

Konzulensek:

Farkas Enikő

Dr. Horváth Róbert

Dr. Bonyár Attila

Energiatudományi Kutatóközpont

Műszaki Fizikai és Anyagtudományi Intézet

2020

Tartalomjegyzék

1	Kivonat	5
2	Abstract	6
3	Bevezetés	7
3.1	Célkitűzés	8
4	Elméleti háttér	8
4.1	Bioszenzorok	8
4.1.1	Optikai bioszenzorok	8
4.2	Optikai Hullámvezető Fénymódus Spektroszkópia	9
4.2.1	OWLS működésének elmélete.....	9
4.2.2	OWLS műszer felépítése.....	11
4.2.3	A mérés menete.....	12
4.3	Antitestek.....	13
4.3.1	IgG	14
4.4	Baktériumok.....	15
4.4.1	<i>Escherichia coli</i>	15
4.5	Felületi adszorpció.....	16
4.6	Atomerő mikroszkópia.....	Hiba! A könyvjelző nem létezik.
4.7	Ellipszometria	Hiba! A könyvjelző nem létezik.
5	Anyagok és protokollok	17
5.1	Alkalmazott oldatok	17
5.2	Felületkezelés	18
5.2.1	Tisztítás	18
5.2.2	Szilanizálás GOPS használatával.....	18
5.2.3	Szilanizálás APTES használatával.....	19

5.2.4	Oldatkészítés	19
5.2.5	Polimer rétegek leválasztása	19
5.3	Mérési protokollok	20
5.3.1	Ellipszometria	Hiba! A könyvjelző nem létezik.
5.3.2	Atomerő mikroszkóp.....	20
5.3.3	Vizelet adszorpciója PC rétegen	Hiba! A könyvjelző nem létezik.
5.3.4	<i>E. coli</i> adszorpció PC rétegen	20
5.3.5	<i>E. coli</i> adszorpció COP rétegre	20
5.3.6	<i>E. coli</i> adszorpciója monoklonális antitesten.....	20
5.3.7	<i>E. coli</i> adszorpciója poliklonális antitesten	21
5.3.8	<i>S. epidermidis</i> adszorpciója poliklonális antitesten	21
6	Eredmények	21
6.1	A rétegek karakterizálása	21
6.1.1	Ellipszometria	Hiba! A könyvjelző nem létezik.
6.1.2	Atomerő mikroszkópos ellenőrzés	22
6.1.2	A karakterizált rétegek modellje	28
6.2	OWLS mérések	28
6.2.1	Vizeletből történő adszorpció PC rétegen	Hiba! A könyvjelző nem létezik.
6.2.2	<i>E. coli</i> adszorpciója PC rétegen.....	31
6.2.3	<i>E. coli</i> adszorpciója COP rétegen	33
6.2.4	<i>E. coli</i> adszorpciója monoklonális antitesten	33
6.2.5	<i>E. coli</i> adszorpciója poliklonális antitesten	35
6.2.6	<i>S. epidermidis</i> adszorpciója poliklonális antitesten	36
7	Összefoglalás	38
8	Irodalomjegyzék	39

1 Kivonat

A baktériumok kimutatása különböző oldatokban, folyadékokban fontos mind az élelmiszeripar, mind az egészségügy szempontjából. Erre az optikai hullámvezető fénymodus spektroszkópia, avagy angolul Optical Waveguide Lightmode Spectroscopy (OWLS) egy elterjedt jelölésmentes módszer, amely a fehérjék felületi kitapadásának valós idejű mérésére használható. Az érzékelés, a felület síkjában terjedő fény fázisának eltolódásán alapul. Előnye, hogy segítségével a kitapadt réteg három tulajdonsága, a felületarányos tömeg, a vastagság és a törésmutató is egyszerre határozható meg. [1]

Az OWLS technika kiaknázható baktériumok felülethez történő kitapadásainak tanulmányozásában, viszont a baktériumok szelektív méréséhez megfelelő felületkémia létrehozása szükséges a chip felületén (pl.: polimerrel), amelyhez a baktérium specifikus antitestek rögzíthetőek. Az antitestek szempontjából kritikus az antitest adott baktérium törzsre mutatott érzékenysége és szelektivitása. Nagyon fontos szempont továbbá, hogy minimálisan még mekkora baktérium koncentrációnál kapunk detektálható jelet (a detektálási limit). A polimer réteg felvitele során kritikus a megfelelő felületi vastagság, illetve az alacsony felületi érdesség elérése.

Kutatómunkám fő célja, hogy baktérium oldatokkal végzett kísérletekkel megtaláljam az OWLS mérésekben legjobban teljesítő *E. coli* specifikus antitestet. Fontos cél volt továbbá meghatározni azt a minimális baktérium koncentrációt, amelynél még detektálható az *E. Coli* jelenléte a vizsgált mintákban. Célkitűzés volt még hatékony blokkoló anyagok kiválasztása a nem specifikus kötések kiküszöbölésére. Továbbá, a fejlesztett műszer működőképességének modellezéséhez egy polimer nanoréteg felviteli eljárásának optimalizálását is elvégeztem, amivel biztosítani lehet 20-30 nm rétegvastagságot, és maximum pár tíz nanométeres felületi érdességet.

1 Abstract

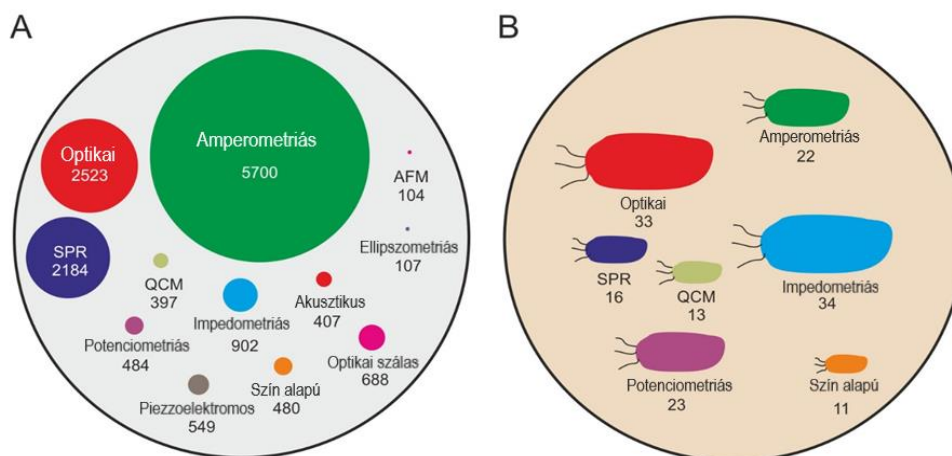
Bacteria detection in various solutions and liquids is important in healthcare and also in the food industry. Optical Waveguide Lightmode Spectroscopy (OWLS) is a sensitive label-free method, which enables real-time detection of proteins. Its sensing principle is based on the change of the phase of the transmitted light in a waveguide forming the sensing surface. The main benefit of the method is that it can simultaneously measure the deposited mass density, thickness and refractive index of the adsorbed layer. [1]

Using the OWLS technique, measurement of bacterial adsorption is possible, but to measure bacteria with high specificity, the preparation of a specific surface chemistry (e.g. using polymers) on the chip surface is necessary to effectively capture the bacteria specific antibodies. Regarding the antibodies, sensitivity and selectivity for the monitored bacterial strain are crucial. The minimal concentration of bacteria giving a detectable signal (the detection limit) is also a major aspect. Moreover, during the polymer layer preparation, it is critical to create the required thickness with minimal surface roughness.

The main goal of my work was to find the E. coli specific antibody giving best performance in OWLS measurements. The the detection limit was also determined using the above antibody. Another goal was to choose a suitable blocking agent to prevent nonspecific binding. Furthermore, optimizing the deposition protocol of the polymer layer, to obtain a 20-30 nm layer thickness and a few tens of nanometers of surface roughness was also performed.

2 Bevezetés

A baktériumok kimutatása nagy szerepet játszik az élelmiszeriparban és az egészségügyben egyaránt, mivel a kórházi fertőzések számát csökkenteni és az élelmiszer biztonságot pedig növelni szeretnénk, illetve a gyógyszerfejlesztésben is komoly szerepe van az ilyen jellegű kutatásoknak. Azonban ez különböző nehézségekbe ütközik, mivel nem steril környezetből, hanem vér-, vizelet- vagy más potenciálisan szennyezett mintából kell kiindulni és méréseket végezni. Így természetes, hogy minél gyorsabb, hatékonyabb és pontosabb módszereket szükséges kidolgozni a szenzorika területén. Mivel már molekuláris mérésekhez régóta használatban vannak a bioszenzorok, ezért a technika és műszerek fejlődésével kézenfekvő lett, hogy a költséghatékonyság, gyorsaság és megfelelő pontosság miatt ezeket alkalmazzák baktériumok detektálására is. Az ilyen szenzorok érzékelési folyamata többségében, felületi adszorpción alapul, amely molekulák, sejtek, vagy jelen esetben baktériumok szilárd felületre történő kitapadását jelenti. Azért is hatékonyak ezek a módszerek, mert a felületre kitapadt baktérium mennyiségének függvényében bizonyos fizikai jellemzők változása (pl.: törésmutató, impedancia, hőmérséklet) jól megfigyelhető és pontosan mérhető. Több módszert is kidolgoztak a hordozón megtapadt anyagok mennyiségének meghatározására (1. ábra). Ezen módszerek közül az optikai bioszenzorok, jelentős részét adják a bakteriális adszorpció témájú kutatásoknak és megjelent publikációknak. Az optikai bioszenzorokon belül, az az optikai hullámvezető fénymódus spektroszkópia egyik előnye, hogy jelölésmentes és nagy érzékenységgel (akár 50 CFU/ml *) rendelkezik, így kis mennyiségben jelenlévő anyagokat is ki tud mutatni egy oldatból, valamint valós idejű kinetika mérést is lehetővé tesz. [1] [2] (* CFU nem más, mint a colony forming unit, vagyis egy adott minta hány foltban jelenik meg petricsészés tenyésztés esetén.)



1. ábra Publikációk a bioszenzorokról (A) összesítve a teljes baktériumok detektálásról szólókkal (B). A körök mérete arányos az adott módszerrel elvégzett kísérletek számával 2014-ben [1]

2.1 Célkitűzés

Dolgozatomban szeretném bemutatni az optikai hullámvezető fénymódus spektroszkópia (OWLS) technológiáját részletesebben is. Összefoglalom, hogy milyen fizikai jelenség áll a mérések mögött, és milyen kihívásokat kell megoldani a megfelelő pontosság, illetve a baktériumok hatékony érzékelésének érdekében. Bemutatom továbbá a mérésekhez alkalmazott műszereket. Szót ejtek az antitestek és baktériumok általános tulajdonságairól, valamint az általunk használt *E. coli* baktérium és IgG típusú antitest jellemzőiről is. Valamint szeretném bemutatni eddig milyen eredményeket értek el a területen.

....

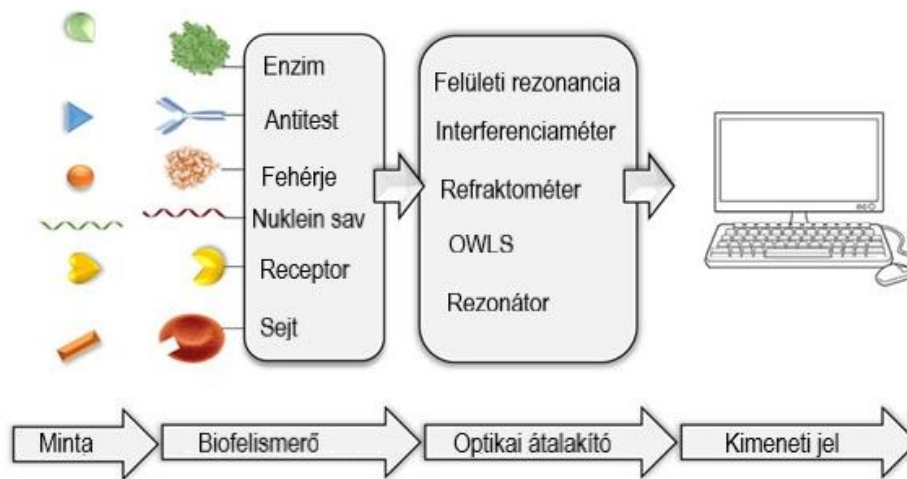
3 Elméleti háttér

3.1 Bioszenzorok

A bioszenzorok olyan analitikai műszerek, amik biológiai választ képesek mérhető és feldolgozható jellé alakítani. A két fő eleme egy bioérzékelőnek a bioreceptor, és az átalakító, ami segítségével a biológiai, kémiai, fizikai változás konvertálható általában elektromos jellé. Az átalakítás módszerétől függően megkülönböztethető több fajta bioszenzor (pl.: elektrokémiai, optikai, kalorimetriás). [3]

3.1.1 Optikai bioszenzorok

Az optikai bioszenzorok szerepe és elterjedése jelentős a bioszenzorok körében, mert a bevezetésben említett előnyök mellett valós-idejű és jelölés-mentes detektálást is lehetővé tesznek. Optikai érzékelés a fény és a biofelismerő elem interakciójának kihasználásával történik (2. ábra). Az optikai érzékelés alapvetően jelölt és jelölés-mentes módszerrel történhet. A fő különbség a kettő között, hogy a jelölésintenzív módszerek alkalmaznak egy plusz fluoreszcens vagy lumineszcens anyagot és a jelet azok segítségével állítják elő míg a másik módszer közvetlenül érzékeli a kimutatni kívánt anyagot. Egy fontosabb jelölésmentes módszer az OWLS, amit bővebben is szeretnék kifejteni. Az optikai bioszenzor egy olyan kompakt analitikai eszköz, ami bioérzékelő komponensből és egy az optikai jelet átalakító részből áll. Ilyen bioérzékelők lehetnek többek között: enzimek, antitestek vagy akár sejtek és egysejtrétegek. Az optikai bioszenzor fő feladata, hogy olyan jelet állítson elő, ami arányos a mért minta felületre kitapadó koncentrációjával. [4]



2. ábra Az optikai bioszenzorok működésének illusztrációja [4]

3.2 Optikai Hullámvezető Fénymódus Spektroszkópia

Az optikai hullámvezető fénymódus spektroszkópia, avagy angolul optical waveguide lightmode spectroscopy (OWLS) egy optikai elven működő, jelölésmentes módszer a felületi kitapadás valós idejű mérésére. Előnye, hogy egyszerre a kitapadt réteg három tulajdonsága, a felületegységre eső kitapadt tömeg, a kitapadt réteg vastagsága és törésmutatója is meghatározható a segítségével. [3]

3.2.1 OWLS működésének elmélete

A mérések alapja, hogy a szenzor chip felületén kialakított hullámvezető rétegbe becsatoljuk a gerjesztő He-Ne lézer sugarát egy, a hullámvezető felszínén létrehozott diffrakciós rács segítségével. A becsatolás eredményeképp sorozatos teljes visszaverődésekkel terjed a hullámvezetőben a fény. Ennek hatására két megvilágítási szögnél (α_{TE} , α_{TM}), ahol az egy teljes belső visszaverődési ciklus alatt a teljesfáziseltolódás nulla, rezonancia jelenség figyelhető meg, ami egy evanescens elektromágneses teret hoz létre a hullámvezető réteg felületén. Ez a tér a hullámvezető felület fölött nagyjából 100-200 nm mélységig hatol be a közegbe, exponenciális térerősség lecsengéssel. A kialakuló rezonanciák esetén mérhető a maximális intenzitás a lapka széleinél a hullámvezető réteghez beállított fotodiódák segítségével. Az említett két szög az effektív törésmutatókkal n_{TE} és n_{TM} (tranzverzális elektromos és tranzverzális mágneses módus) jellemezhető, amelyek (1) szerint meghatározhatóak. Mivel az evanescens térben kitapadt anyag mennyisége megváltoztatja a törésmutatót a felület határán így változik az n_{TE} , az n_{TM} és a hozzájuk tartozó α_{TE} , illetve α_{TM} szög is, amit lehetséges kvantitatívan mérni. Folyamatosan mérve ezeket a szögeket, valós-idejű értékek határozhatók meg a felületi rétegekkel kapcsolatban, ami lehetővé teszi a kitapadási kinetika monitorozását

is. A rezonancia szögekből, illetve a segítségükkel az (1) alapján számított effektív törésmutatók, és az oldat (puffer) törésmutatója (n_C) használatával (2) egyenlet alapján lehet kiszámolni a kitapadt réteg vastagságát és törésmutatóját (d_A ill. n_A) (5.ábra). A kitapadt anyag felületi tömegsűrűsége (m) az (1) és (2) eredményét felhasználva a (3) egyenlet alapján számítható, feltételezve, hogy a kitapadt anyag egybefüggő réteget alkot. Az érzékenység nagyon jónak mondható ($<1 \text{ ng/cm}^2$), azonban a baktériumok mérete általában minimum egy nagyságrenddel nagyobb, mint a létrejövő evaneszcens tér hullámvezetőre merőleges kiterjedése, ezért az érzékenység ilyen alkalmazásra nem mindig megfelelő, mert a sejtek csak egy része esik a mért térrészbe. [5] [6] [7] [8] [9]

$$n = n_{air} \sin \alpha + \frac{l\lambda}{\Delta}, \quad (1)$$

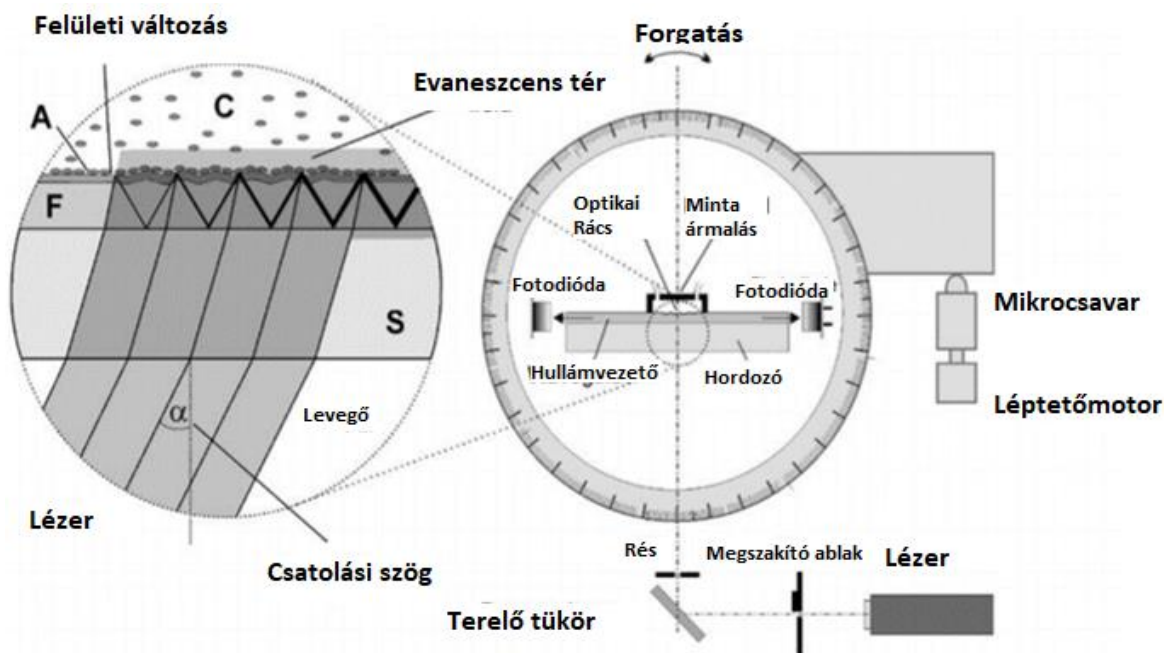
ahol n az effektív törésmutató, n_{air} a levegő törésmutatója, α a rezonancia szög, l diffrakció rendje, λ a lézer hullámhossza, Δ pedig a rácsállandó

$$0 = k \sqrt{n_F^2 - n^2} \left(d_F + \frac{n_A^2 - n_C^2}{n_F^2 - n_C^2} \left[\frac{\left(\frac{n}{n_C}\right)^2 + \left(\frac{n}{n_A}\right)^2 - 1}{\left(\frac{n}{n_C}\right)^2 + \left(\frac{n}{n_F}\right)^2 - 1} \right]^\rho d_A \right) - \tan^{-1} \left[\left(\frac{n_F}{n_C}\right)^{2\rho} \frac{\sqrt{n^2 - n_C^2}}{\sqrt{n_F^2 - n^2}} \right] - \tan^{-1} \left[\left(\frac{n_F}{n_S}\right)^{2\rho} \frac{\sqrt{n^2 - n_C^2}}{\sqrt{n_F^2 - n^2}} \right] \quad (2)$$

,ahol $k=2\pi/\lambda$, d_F , n_F a hullámvezető vastagsága, illetve törésmutatója, n_S a hordozó törésmutatója, n_C pedig a mérési közeg törésmutatója, $\rho=0$ elektromos módus esetén, $\rho=1$ mágneses módus esetén

$$m = d_A * \frac{n_A - n_C}{\frac{dn_p}{dc_p}} \quad (3)$$

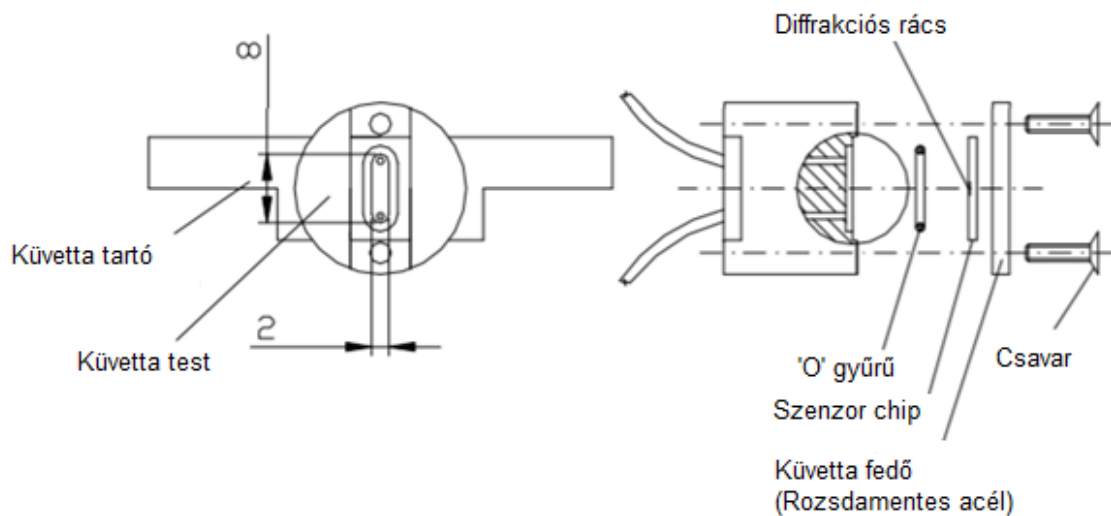
ahol, m a felületi tömegsűrűség, d_A a kitapadt réteg vastagsága, n_A és n_C a kitapadt réteg és a puffer törésmutatója, dn_p/dc_p pedig a törésmutató növekedés (ami minden esetben mérhető függetlenül)



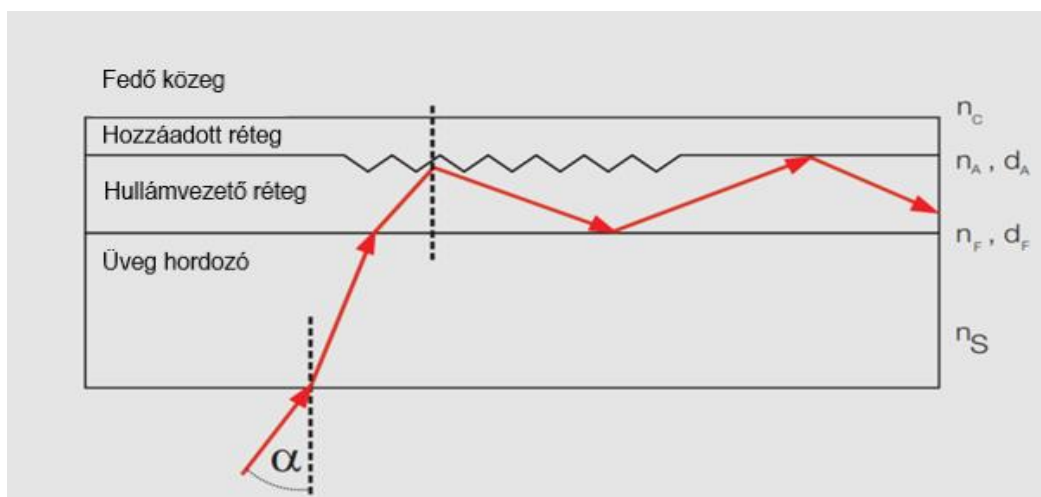
3.ábra Az OWLS szenzor működése és felépítése [5]

3.2.2 OWLS műszer felépítése

Az előbbieken megismert elvek fizikai megvalósítása és egy kompakt műszerben történő implementálása fontos a mérések egyszerű elvégzéséhez, ezért ismertetném az általunk használt MicroVacuum Ltd. által fejlesztett OWLS 210 típusú műszer felépítését. Ez a műszer képes az evanescens térbeli érzékeléssel együtt elektrokémiai mérésre is (EC-OWLS) is, de ezt a lehetőséget mi nem alkalmaztuk. A baktériumok kitapadása egy fluidikai cellában (küvetta) zajlik (4.ábra), mivel az adszorpció folyékony baktérium szuszpenziókból történik. A küvetta rendelkezik egy befolyó-, illetve kifolyónyílással, hogy áramoltatni lehessen a folyadékokat a mérés közben egy perisztaltikus pumpa segítségével. Továbbá a cella egyik oldalát maga az OWLS chip zárja le, a hullámvezető rétegével a cella felé fordítva, így a felületére tapadt réteg mérhető. A küvetta és a lapka között az oldat szivárgását egy O-gyűrű előzi meg, biztosítva a fluidika szigeteltségét. Maga a cella egy fém tartóegységen helyezkedik el, amit rögzíteni lehet a gépen egy kézcsovar segítségével. A gép ezen részét a beépített léptetőmotor mozgatja egyenletesen $+7^\circ$ és -7° között. Továbbá a műszer képes a hőmérséklet szabályozására 20°C - 80°C tartományban kisebb, mint $0,1^\circ\text{C}$ pontossággal, illetve nagyjából $8^\circ\text{C}/\text{min}$ hűtési, illetve fűtési sebességgel. [10] [11]



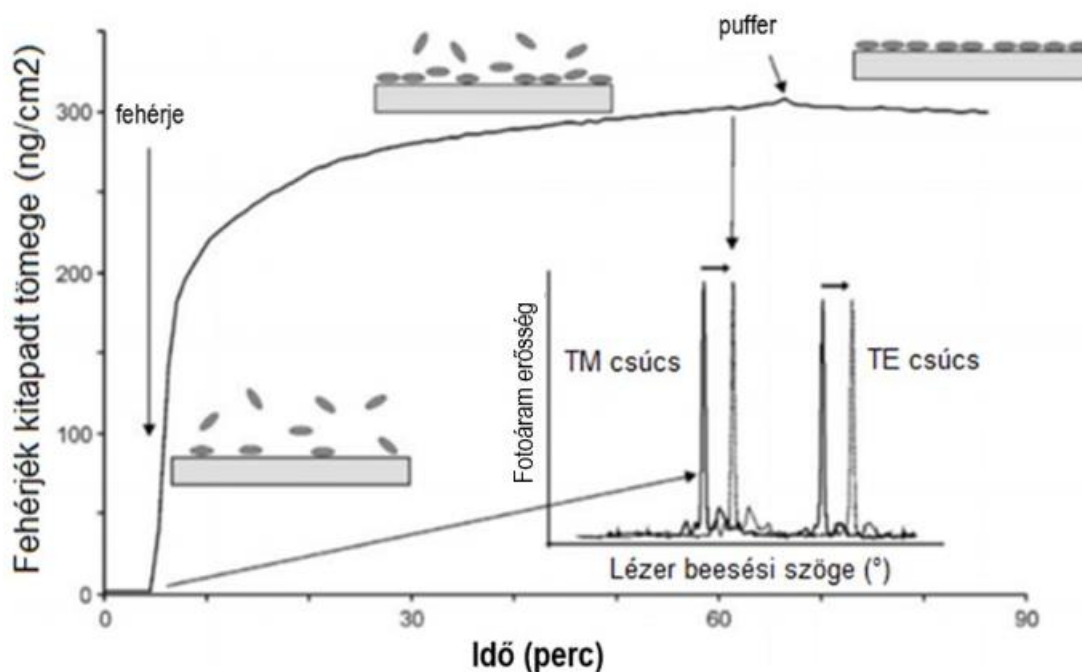
4.ábra A küvetta és a tartóegység felépítése [12]



5.ábra Az OWLS chip struktúrája [13]

3.2.3 A mérés menete

A mérések három fő részből állnak (5.ábra), amik ismétlődhetnek egy hosszabb mérés során. Az első egy alapvonal felvétele pufferben, aminek ideje alatt meg lehet határozni a tiszta chip, vagyis a hullámvezető réteg törésmutatóját (n_F) és vastagságát (d_F), így kiküszöbölhető a chippek közötti eltérés a mérésből. A második lépés, az ugyanebben a pufferben oldott anyag kitapadásának vizsgálata, ami szintén a törésmutatót (n_A) és rétegvastagságot vizsgálja (d_A), de a hullámvezető felületén lévő réteget (5.ábra). A harmadik lépés pedig mosás, ismét puffer felhasználásával, amivel nem stabil rétegek eltávolíthatóak, így a ténylegesen a felülethez tapadt réteg n_A és d_A értéke is mérhető. [5]



6. ábra OWLS mérés időbeni lezajlása és a rezonanciaszög eltolódása [11]

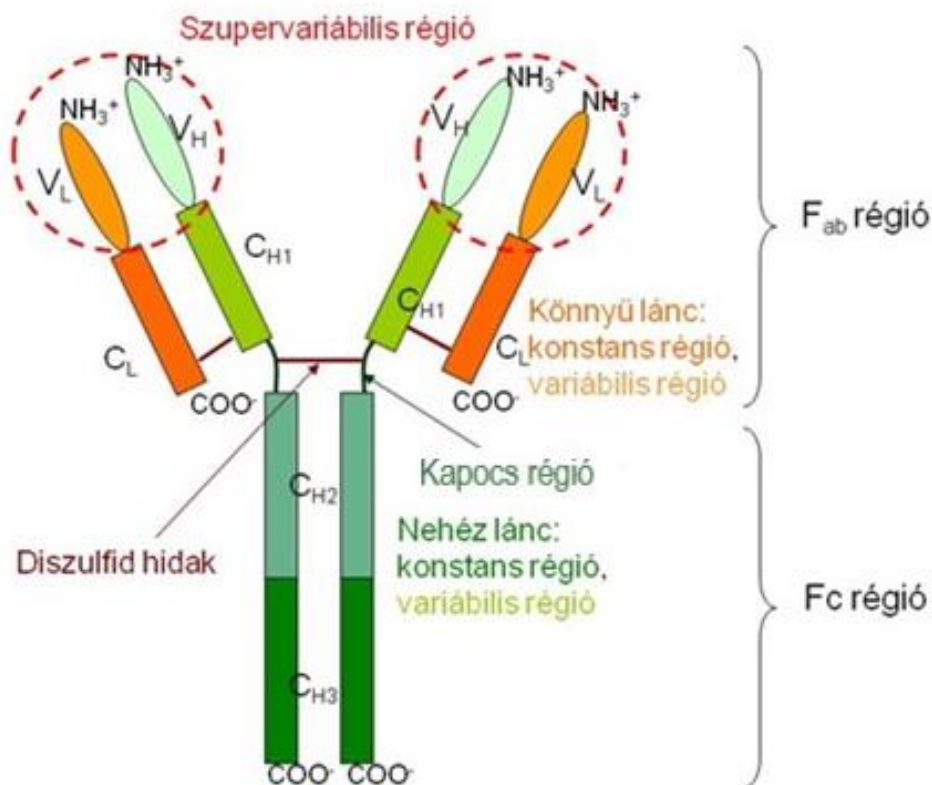
3.3 Antitestek

Az antitestek, más néven immunglobulinok (Ig) az immunrendszer fontos fehérjéi, szerepet játszanak az antigének (olyan anyagok, melyek immunválaszt váltanak ki pl.: baktériumok, vírusok, állati mérgek, toxinok) hatástalanításában, amit azok megkötésével érnek el. Az 'Y' alakú antitestek végén lévő kötőhelyek tökéletesen felismerik és kapcsolódnak az antigének egy jellemző részletéhez, az epitópjukhoz. Ez a kapcsolódás reverzibilis, melyet nem kovalens kötések hoznak létre, hanem az elektrosztatikus vonzás, hidrogénhíd-kötések, Van der Waals-kötőerők és hidrofób kölcsönhatások. Felépítésüket tekintve az antitesteknek két fő részből állnak, nehéz- és könnyűlánc (7. ábra). Nagyrészt, a nehéz lánc határozza meg az antitest típusát a könnyűlánc pedig azt, hogy milyen antigént ismeri fel. Vagyis az 'Y' két felső csúcsán található szupervariábilis régió köti meg az antigéneket. Ezen kívül enzimes emésztéssel az antitesteket F_{ab} (fragment antigen binding) és F_c (fragment crystallizable) régiókra tudjuk bontani. F_{ab} régió az antitest kötésért és F_c régió effektor funkciókért és az antitest orientációjáért felelős.

Az antitesteket besorolhatjuk monoklonális és poliklonális antitestekként, attól függően, hogy milyen B-sejt termelte. Az ugyanazon B-sejt és klonjai által termelt azonos specificitású antitestek kötődnek a felismert antigén egyfajta epitópjához, az ilyen antitestet nevezzük

moniklonálisnak. Poliklonálisnak pedig az olyan antitesteket nevezzük, amelyek többféle B-sejtből származnak, eltérő specificitásúak és egy antigén több fajta epitópját tudják felismerni. (Ilyen az emberi antitest termelés is, hiszen egy egészséges felnőtt szervezet nagyjából 10^7 - 10^9 antigén felismerésre képes)

Az antitesteknek öt típusát különböztetjük meg a nehéz lánc, vagyis konstans régió alapján. Ezek az IgA, IgD, IgE, IgG és IgM amik különböznek formájukban, funkcióikban és abban is, hogy a szervezetben hol vannak leginkább jelen. [14] [15] [16] [17]

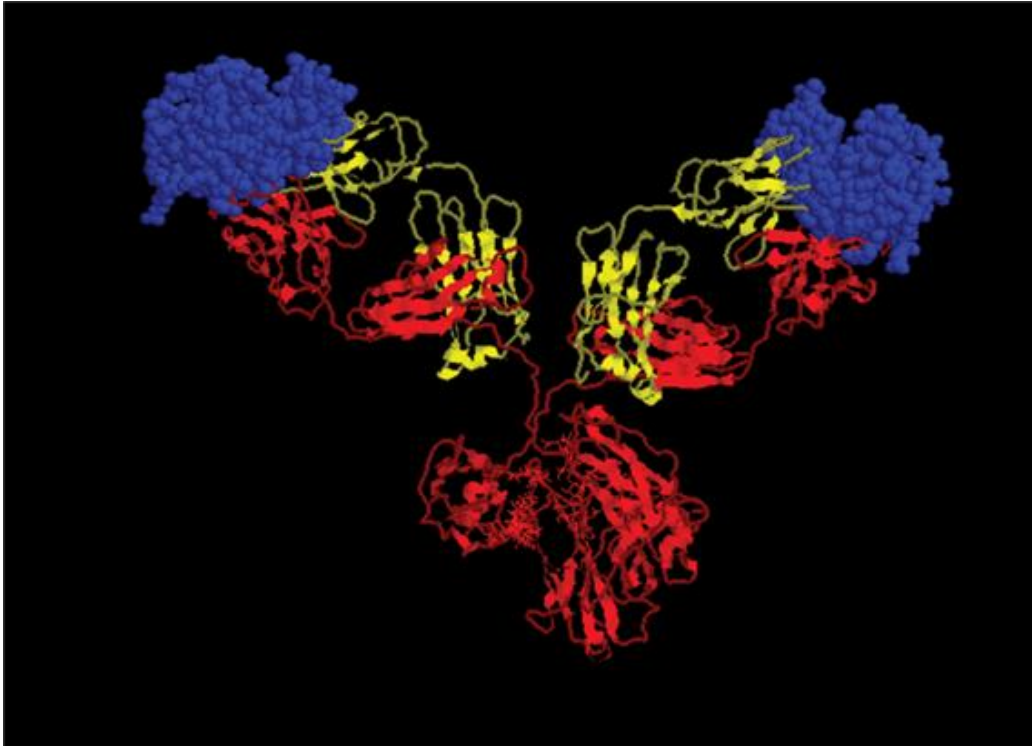


7.ábra IgG antitest általános szemléltető képe [18]

3.3.1 IgG

Ez az antitest a leginkább jelenlévő a vérben és az extracelluláris térben, vagyis a vérben lévő antitestek 80-85 százaléka IgG típusú. Ennek oka, hogy a felezési ideje ennek az antitestnek a legnagyobb, ami nagyjából 21-23 nap. Ebből következik az is, hogy Az IgG antitestek hozzájárulnak a tartós immunitáshoz különböző antigének ellen, vagyis ebbe az osztályba tartozik a legtöbb antibakteriális, számos vírusellenes és az Rh-vércsoportfaktorral reagáló antitestek. Az IgG antitest két darab kötőhellyel rendelkezik, továbbá klasszikus úton képes beindítani a komplement rendszert, ami az immunrendszer szélesebb körű bevonását jelenti, például

gyulladáscsökkentő molekulák felszabadítását, láz vagy ödémák kialakulásához is vezethet. Ez az egyetlen antitest típus, ami képes a méhlepényen átjutni, így az anya immunitásait átadni a magzatnak. [14] [19] [17]



8.ábra Az IgG antigénkötése [17]

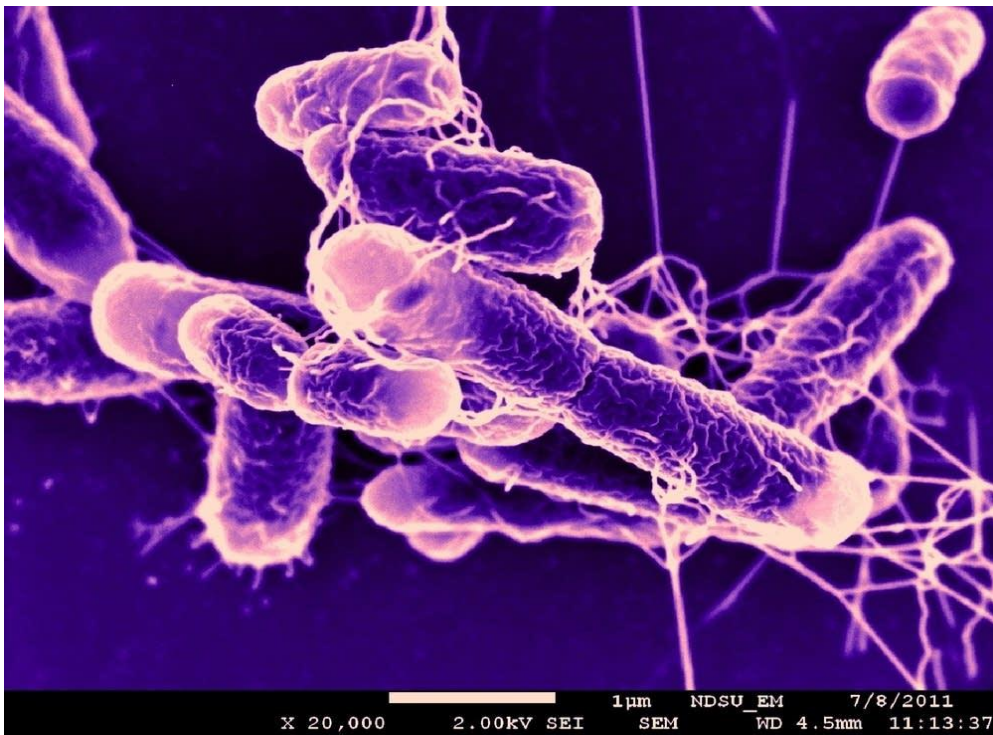
3.4 Baktériumok

A baktériumok egysejtű mikroorganizmusok, a Földön megjelenő első életformák egyikei. Méretük pár mikrométerben mérhető, formájuk lehet pálcika-, spirál- vagy gömb alakú. A közvetlen környezetünkben nagy mennyiségben megtalálhatóak, földben, vízben és a szervezetünkben is, főleg a bőrön és a bélrendszerben. Ebből következik, hogy nagy részük nem okoz megbetegedést, mégis vannak életveszélyes bakteriális fertőzések, mint például a TBC, *E. coli* vagy *Salmonella*. Éppen ezért fontos kimutatásuk, diagnosztikai és fertőzés megelőzési szempontból is. [20] [21]

3.4.1 *Escherichia coli*

Az első feljegyzés az *E. coli* baktériumról 1885-ben történt, amikor egészséges emberek ürülékében mutatta ki egy német-osztrák orvos. Azóta kiderült, hogy gyakori baktérium mind emberek mind állatok bélrendszerében. Legtöbb fajtája ártalmatlan, viszont néhány szerotípus komoly ételmérgezést okozhat, amihez akár 10 db baktérium is elég lehet, továbbá az *E. coli* a leggyakoribb húgyúti fertőzést okozó patogén. Jellemzőit tekintve, Gram-negatív, pálcika

alakú, fakultatív anareob baktérium, vagyis képes oxigén jelenlétében és hiányban is ATP előállítására. A sejt hossza nagyjából 2 μm , átmérője pedig 0.25-1 μm közötti. Bizonyos típusai ostorral (flagella) rendelkeznek, amik képessé teszik a mozgásra. Korai felfedezése, elterjedtsége és könnyű manipulálhatósága miatt egy sokat kutatott baktérium törzs, így genomja és DNS szekvenciája is teljesen feltérképezett, hiszen már több évtizede intenzíven vizsgálják. Például az *E. coli* volt az egyik első baktérium, ami segítségével emberi inzulint állítottak elő, illetve a léteznek már a labor körülményeket jól viselő, gyenge fertőzőképességű fajtái, valamint ideális körülmények között akár 20 perc alatt képes osztódni, így ideális kísérletek lefolytatására. Ebből kifolyólag az *E. coli*, egy gyakran használt, elterjedt modell organizmus, az élelmiszerbiztonság, a gyógyszer ellenőrzés és víztisztítási ellenőrzések területén. [22] [23] [24] [25]



9.ábra *E. coli* baktérium elektronmikroszkóppal készült képe [26]

3.5 Felületi adszorpció

A baktériumok szenzorra való kitapadását elő lehet segíteni úgynevezett bioreceptorokkal, amelyek lehetővé teszik, hogy ligandum-receptor kölcsönhatásokon keresztül a baktériumok könnyebben megtapadjanak a felületen így felerősítve a mérhető jelet (10.ábra). Ezek a receptorok a baktériumok estében a legtöbbször antigén specifikus antitestek. Ezek alkalmazása azért indokolt, mert az adott baktériumokra érzékeny antitestek megnövelhetik a rendszer szelektivitását, specifikusságát. A felületre kikötött antitestek és a hozzájuk kapcsolódó baktériumok felületi adszorpciója változtatja meg esetünkben a törésmutatót, de más fizikai

tulajdonságokat is (pl.: ellenállást, a mérőeszköz tömegét), amiből a mintában lévő baktériumok mennyiségére és koncentrációjára, illetve az antigén-antitest kölcsönhatás erősségére és a kitapadt minta felületarányos tömegére lehet következtetéseket levonni. [1]



10.ábra A felületi adszorpció szemléltetése [27]

3.6 Eddigi eredmények szakirodalom alapján

4 Anyagok és protokollok

A kísérletekkel egy olyan polimer bevonatú OWLS chip létrehozása a cél, amelyen a polimer réteg 1-5 nm közötti felületi érdességgel, és 10-50 nm rétegvastagsággal rendelkezik, hogy vizsgálni lehessen baktériumok adszorpciós képességét az adott polimereken. Az ehhez használt anyagokat, módszereket, rétegfelviteli és ellenőrzési lépéseket szeretném ismertetni ebben a fejezetben Két fajta polimer felvitelét és ellenőrzését végeztük el, hogy vizelet és baktérium adszorpcióhoz is optimális réteget tudjunk kialakítani a felületen. Ez a két polimer a polikarbonát (PC) és a ciklikus olefin polimer (COP)

4.1 Alkalmazott oldatok

- Polikarbonát gyöngyök (77elektronika Kft.), amik xilolban (VWR), illetve tetrahidrofuránban (THF) oldva
- Ciklikus olefin polimer (COP, Zeonor 1060 R) először xilolban, majd későbbi mérés során ciklo-hexánban (VWR) oldottuk fel.
- Művizelet (77 elektronika)
- MQ víz
- 2% APTES (Sigma-Aldrich), pH 7,0-ra állítva ecetsavval
- Metanol (VWR)
- 1× PBS (foszfát pufferes sóoldat) (Sigma-Aldrich)
- Az antitestek rögzítésére Mix&Go Biosensor (Anteo technologies Pty Ltd., Australia) nevű immobilizáló reagens. Ez az anyag a bioszenzor chipre történő felvitele után (30

perc) képes a biomolekulákat fixálni a felületen, ráadásul az antitesteket orientálva tudja megkötni. [33]

- Ezenkívül egy másik antitest rögzítési módszert is kipróbáltunk, ahol gliciloxipropil-trimetoxiszilánnal (GOPS; Sigma-Aldrich) kötöttük a ProteinA fehérjét (Sigma-Aldrich) a felülethez. A ProteinA orientálva tudja megkötni az antitesteket. A méréseinkben 0,5 mg/ml ProteinA fehérje oldatot használtunk, amelyet MES pufferben oldottunk.
- A 25 mM MES (2-(N-morfolino)-etánszulfonsav) puffert MES hidrátból (Sigma-Aldrich) és MES sóból (Sigma-Aldrich) állítottuk össze és 6,00 pH-ra állítottuk.
- Antitestek: Szabó Dóra (SOTE) által kiválasztott *DH5α E. coli* baktérium törzsre tesztelt antitesteket használtuk (ELISA teszt). Az egyik ilyen poliklonális antitest (ThermoFischer, 7213) és a másik (BioRad, nyúl, 4329-4906). A monoklonális antitest pedig (BioRad, egér, OBT0749). Mind a három antitestet MES pufferben oldottuk és 150 µg/ml koncentrációt használtunk a méréseinkhez.
- *DH5α E. coli* (SOTE) baktérium törzset használtuk 4McFarlandos és 10^8 sejt/ml koncentrációban. A baktériumokat fiziológiás sóoldatban tároltuk és hígítottuk.
- PBS-Tween 0,05%(m/m) oldata

4.2 Felületkezelés

4.2.1 Tisztítás

Mivel a legkisebb felületi szennyeződés is befolyásolhatja a kialakult réteget és az OWLS mérés hitelességét, így a chipet fontos a rétegfelvitel előtt megtisztítani minden nemű szennyeződéstől, ezért erre egy króm-kénsavat alkalmazó protokollt használtunk. Az első lépés a lapkák tömény króm-kénsavban áztatása volt 3 percig, majd Milli-Q (MQ) vizes öblítés 20 másodpercig, majd 5 ml kálium-hidroxidot oldottunk 100 ml MQ-ba, amelyben 3 percig voltak a lapkák, hogy semlegesítsük a króm-kénsavat. Ezután a MQ vízzel leöblített chipet szonikáltuk 10 alkalommal 1 percig MQ vízben és a szonikálások között MQ vízzel öblítettünk, végül az OWLS chipet nitrogéngázzal szárítottuk.

4.2.2 Szilanizálás GOPS használatával

Az első lépésben 150°C-on vákuum alatt, 1 órán keresztül szárítjuk a tisztított szubsztrátot vákuumos szárító szekrényben. Ezután következik a gázfázisú szilanizáció, ami során 100 ml xilolt töltünk a reaktoredénybe, és a fűtést a xilol forrásához állítjuk be. A xilol forrása után, 5 ml GOPS-t óvatosan az edénybe pipettázunk, majd 5 órát várunk, hogy a reakció végbe menjen. Mivel a xilol egy illékony oldószer, ezért ez idő alatt pótolni kell az oldathoz. Mosással

távolítjuk el a nem specifikusan adszorbeálódott szilán molekulákat a felszínről. Intenzíven mossuk (xilol, metanol, xilol) és végül metanolban 5 percig szonikáljuk. A szubsztrátot 110°C-on vákuum alatt 1 órán keresztül vákuumszáritószekrényben szárítjuk. Végül, ha nem használjuk fel azonnal a kezelt lapkát, exikátorban tároljuk maximum 1 hétig.

4.2.3 Szilanizálás APTES használatával

A krómkénsavval tisztított OWLS chipet felületét hidrofóbbá tettük APTES-sel, annak érdekében, hogy a PC és COP réteg homogéne és nem túl vastag rétegben borítsa a felszínt. Ehhez 3-aminopropil-trietoxiszilán (APTES) 2%-os oldatát készítettük el MQ vízben, majd ecetsav segítségével a pH értéket, titrálással 6,8-7,2 tartományba állítottuk. Ezután az APTES oldatot pipettával felvittük a lapkákra úgy, hogy teljesen fedje a felületet és egy órán át állni hagytuk, majd lemostuk a felületről többszörös mosással, metanol-MQ víz-metanol-MQ víz sorrendben és nitrogéngázzal megszáritjuk. Végül vákuumkemencében 120°C-on hőkezeltük a réteget két órán át. Idáig a lépések a két bevonat esetén megegyeznek.

4.2.4 Oldatkészítés

A PC és a COP polimereket szilárd gyöngyök formájában bocsátotta rendelkezésre a 77Elektronika Kft., ezért első lépésként a polimerekből felvihető, folyékony oldatot kellett készítenünk. Ehhez először a gyöngyöket vákuumkemencében szárítottuk 40°C-on három órán át. A PC gyöngyöket ezután tetrahidrofuránban (THF) oldottuk 0,36 mg/ml töménységben. A teljes oldódáshoz egy napra volt szükség. A COP gyöngyöket ugyanilyen szárítás után, xilolban oldottuk fel 5; 7, illetve 10 mg/ml töménységben. Az oldódás ebben az esetben több mint egy napig tartott, de ennyi idő után sem oldódott fel teljesen az anyag, mivel ez idő elteltével is csapadékot lehetett megfigyelni szabad szemmel az oldatban.

4.2.5 Polimer rétegek leválasztása

A COP esetében a felvitel előtt szonikálásra volt szükség, hogy a csapadékot feloldjuk az oldatban. Az elkészített oldatok felvitelét forgótárcsás rétegleválasztás (angolul spin coating) segítségével végeztük, mely során a készülék vákuummal tartja helyén a kezelni kívánt mintát, majd a beállított fordulatszám szerint a tengelye körül pörgeti. Két fordulatszámot és időtartamot kell meghatározni a rétegfelvitelhez, egy előpörgetést, amely azért szükséges, hogy a felesleges anyagot lelökje a felszínről. Ez 500 RPM és 5 másodperc volt minden lapka esetén. A másik a felpörgetési fordulatszám és időtartam, amely a rétegvastagságot állítja be. Ezek az értékek 2000RPM 20 másodperc volt a kísérletek során. Az értékek beállítása után, pipetta segítségével csepegtettük fel az oldatot úgy, hogy az oldat teljesen fedje a felületet, majd

elindítottuk a felpörgetést. A réteg tulajdonságainak változtatásához a felcsepegtetések (felpörgetések) számát változtattuk, és ellenőriztük milyen hatással van a kialakult felületre.

4.3 Mérési protokollok

Ebben a fejezetben azt szeretném ismertetni, milyen beállításokkal, illetve lépésekkel végeztük a méréseket.

4.3.1 Atomerő mikroszkóp

A mérésekhez μ Masch szilícium tűt használtunk, aminek a paraméterei a következők: a hegy sugara 8 nm, rezonancia frekvenciája 325 kHz, rugóállandója pedig 40 N/m. A műszert a mérésekhez az $50 \times 50 \mu\text{m}$ -es képek készítéséhez 512×512 pixel felbontásra állítottuk, 0,2 Hz túmogatási frekvencia mellett. A $15 \mu\text{m} \times 15 \mu\text{m}$ méretű képekhez szintén 512×512 pixeles felbontást alkalmaztunk, 0,3 Hz frekvencia mellett. Az $1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$ területen is 512×512 pixel felbontást, és 1,5 Hz frekvenciát állítottunk be.

4.3.2 *E. coli* adszorpció PC rétegen

Az alapvonal felvétele fiziológias sóoldattal történt $1 \mu\text{l/s}$ sebességű áramlás mellett (0-175 min). Ezután a baktérium injektálása következett (175-235 min). Végül pedig ismét fiziológias sóoldatos mosás $1 \mu\text{l/s}$ sebeséggel (235-310min).

4.3.3 *E. coli* adszorpció COP rétegre

Első lépés a MES puffer alapvonal felvétele volt, hogy meg tudjuk határozni az üres, de beáztatott chip tulajdonságait (0-28 min). Ez után következett a M&G injektálása, $400 \mu\text{l}$ mennyiségben (28-62 min). A következő lépés a nem stabilan kikötött M&G eltávolítására a felszínről MES pufferes mosással (62-100 min). A negyedik lépésben injektáltunk a rendszerbe $400 \mu\text{l}$ MES pufferben oldott 7213 nyúl antitestet (100-131 min). Ezt a lépést is MES pufferes követte a nem kikötött antitestek eltávolítása érdekében (131-189 min). Ezután puffer csere következett MES-ről fiziológias sóoldatra, hogy fel tudjuk venni a baktérium kitapadáshoz méréséhez szükséges alapvonalat (189-230 min). Az utolsó előtti lépés a 4 McFarland *E. coli* baktérium oldat áramoltatása volt $1 \mu\text{l/s}$ sebeséggel (230-245 min). Végül a nem adszorbeálódott baktériumok lemosása következett fiziológias sóval (245-300 min).

4.3.4 *E. coli* adszorpciója monoklonális antitestten

A mérést megelőzően a lapkát szilanizáltuk GOPS használatával, majd ProteinA oldatban hagytuk állni 9 órán át.

Az első lépés MES pufferes alapvonal felvétele (0-60min) pumpával áramoltatva az oldatot. A második lépésben $400 \mu\text{l}$ $33 \mu\text{g/ml}$ MES pufferben oldott antitestet injektáltunk a rendszerbe

(60-90 min). A következő lépés a mosás volt MES puffer segítségével, hogy eltávolítsuk a nem kikötött antitesteket pumpával áramoltatva (90-120 min). Ezután a puffert PBS oldatra cseréltük, hogy meg tudjuk határozni az új alapvonalat, szintén áramoltatva (120-210 min). Az ötödik lépésben PBS-Tween oldatot áramoltattunk, hiszen a baktériumok ebben oldva álltak rendelkezésre (210-300 min). A hatodik lépésben kezdtük meg a 10^8 sejt/ml *E. coli* baktérium áramoltatását (300-330 min). Végül pedig a fiziológias sóoldattal történő mosás következett, hogy csak a stabilan adszorbeálódott baktériumok maradjanak a felszínen (330-400 min).

4.3.5 *E. coli* adszorpciója poliklonális antitesten

A mérést megelőzően a lapkát szilanizáltuk GOPS használatával, majd ProteinA oldatban hagytuk állni 9 órán át.

Először MES puffer használatával az alapvonal felvétele történt (0-50 min) perisztaltikus pumpával áramoltatva. A második lépésben 400 µl 150 µg/ml sűrűségű MES pufferben oldott antitestet injektáltunk a rendszerbe (50-80 min). Ezután pedig ismét MES puffer használatával mosás következett (80-115 min). Negyedik lépésként a pufferoldatot fiziológias sóoldatra váltottuk, hogy azzal is meg tudjuk határozni az alapvonalat a baktérium kitapadáshoz (115-230 min). A 10^8 sejt/ml töménységű baktérium oldat hozzáadása következett ötödik lépésben áramlás mellett (230-260 min). Utolsó lépésként pedig fiziológias sóoldattal mostuk le a nem kitapadt baktériumokat a felületről (260-290 min).

4.3.6 *S. epidermidis* adszorpciója poliklonális antitesten

Az első lépés az alapvonal MES pufferrel történő felvétele volt (0-60 min). Második lépésben 400 µl poliklonális antitest injektálása következett, 150 µg/ml sűrűségben (60-90 min). A következő lépés a nem kitapadt antitest lemosása MES puffer használatával áramlás mellett (90-120 min). Negyedik lépéskeént puffercsere történt, fiziológias sóoldatra, amiben a baktériumok is oldva vannak (120-240 min). Az ötödik lépésben került a rendszerhez a 10^8 sejt/ml töménységű, *S. epidermidis* baktérium 1 µl/s sebességgel áramoltatva (240-270 min). Utolsó lépésként pedig a fiziológias sóoldattal történő mosás következett, hogy a nem kitapadt baktériumok lemosuk a felszínről (270-300 min).

5 Eredmények

5.1 A rétegek karakterizálása

Az ellenőrzés során az előzőekben ismertetett lépéseket figyeltük meg különböző módszerekkel. Arra voltunk kíváncsiak, hogy a felpörgetés paramétereinek, mint a fordulatszám, oldat-töménység, illetve a felpörgetésszám módosítása, hogyan befolyásolják a

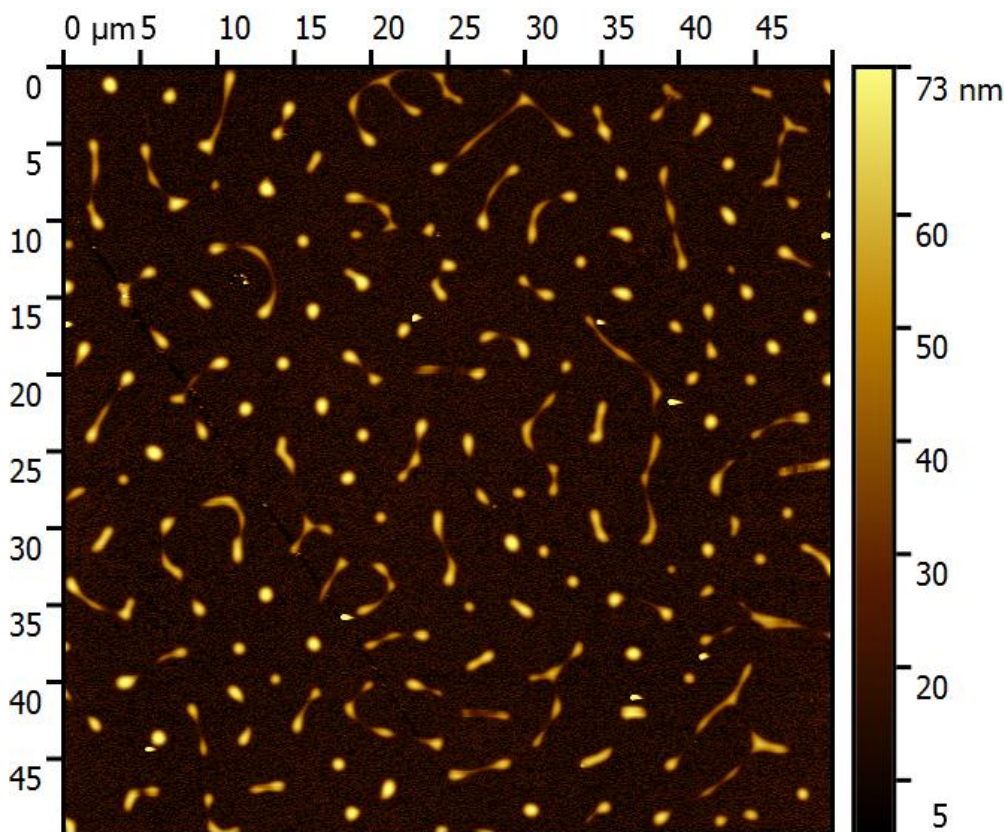
kialakult réteg vastagságát és felületi érdességét. Az ellenőrző mérések egy részét üveglapon végeztük, hiszen így is ugyanolyan információt kapunk a felületi topográfiáról és rétegvastagságról, de nem kellett használnunk értékes OWLS chipeket.

5.1.1 Atomerő mikroszkópos ellenőrzés

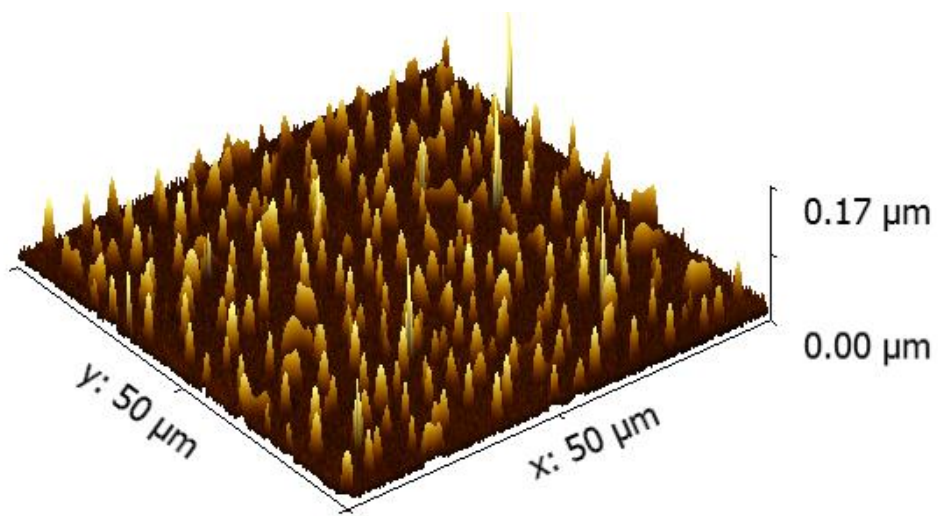
A lapkák felületi topográfiájáról részletesebb információra van szükség, mint amit az ellipszométer szolgáltatni tud, ezért AFM segítségével készítettünk képeket nem kontakt módban. Ezzel a módszerrel, már a felületi struktúrákról tudunk információt szerezni mind magasságban, mind pedig elhelyezkedésben, illetve a felületi érdességet is ki lehetett számolni a mérések alapján.

5.1.1.1 PC réteg

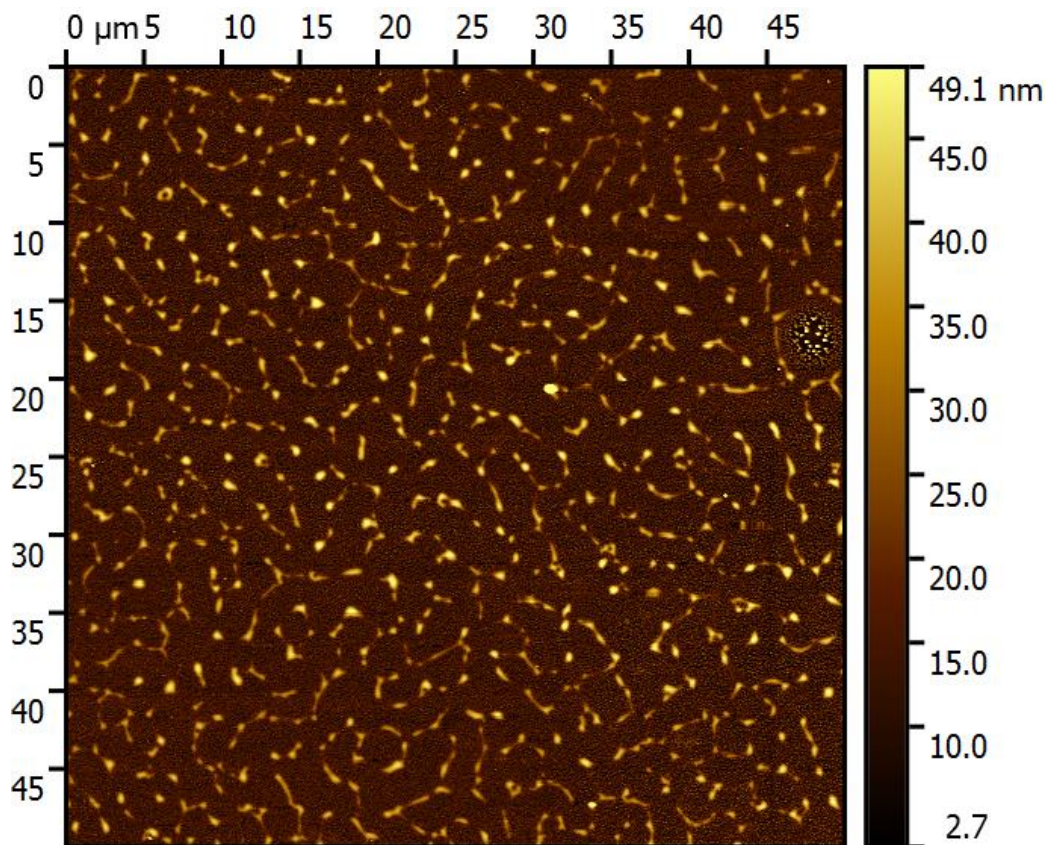
Minden felpörgetésszám mellett készített mintáról 3-3 képet készítettünk, a PC esetében $50 \times 50 \mu\text{m}$, $15 \times 15 \mu\text{m}$ és $1 \times 1 \mu\text{m}$ területeket pásztázva, hogy mikroszkópiusan is meg tudjuk vizsgálni a felületet. A mérésekhez ugyanazokat az üveglapkákat használtunk, hiszen a lapkán kialakult réteg felülete ebben az esetben sem lesz más, viszont így nem kellett drága OWLS chipet használni.



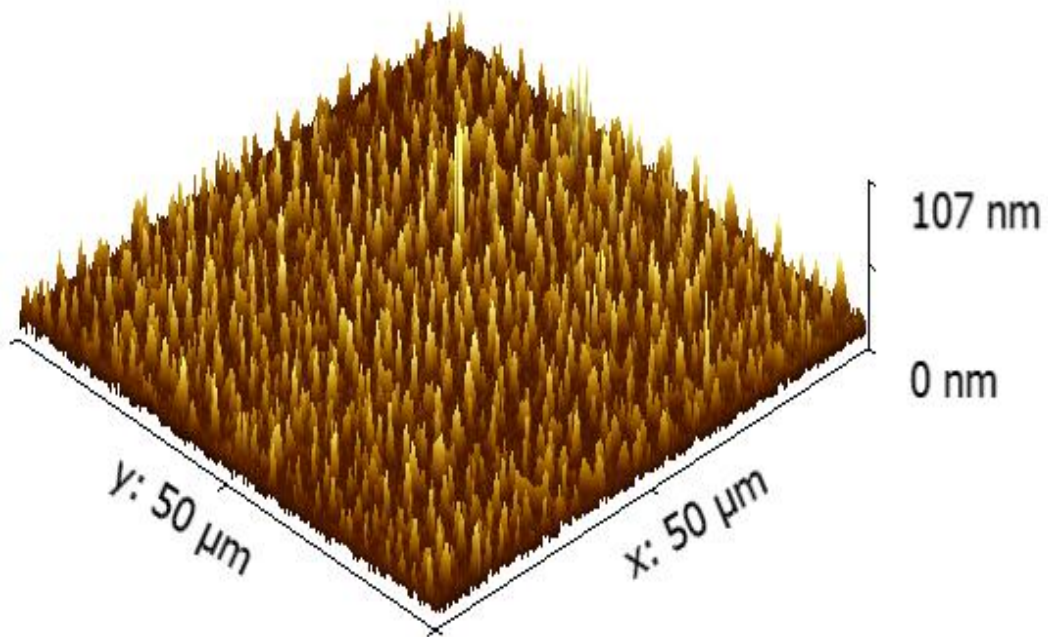
17.ábra Egyszeres PC felpörgetés $50 \times 50 \mu\text{m}$ -es AFM kép



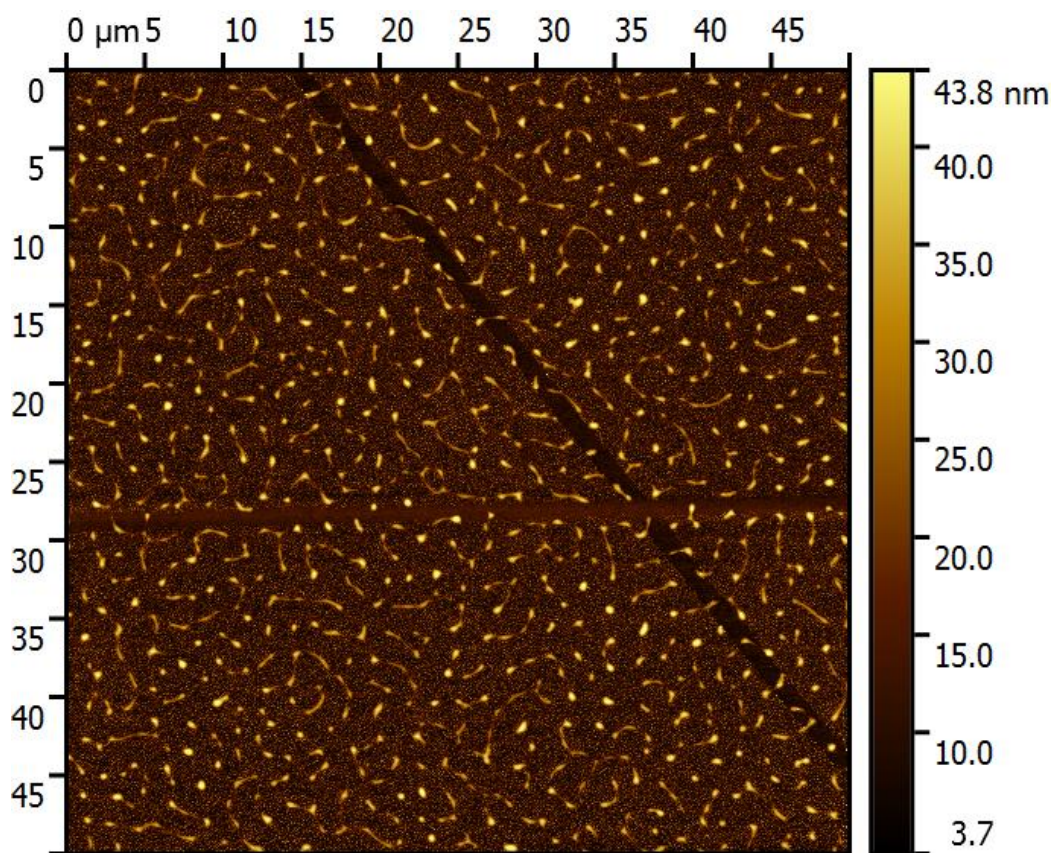
18. ábra Egyszeres PC felpörgetés 50×50μm-es topográfiája



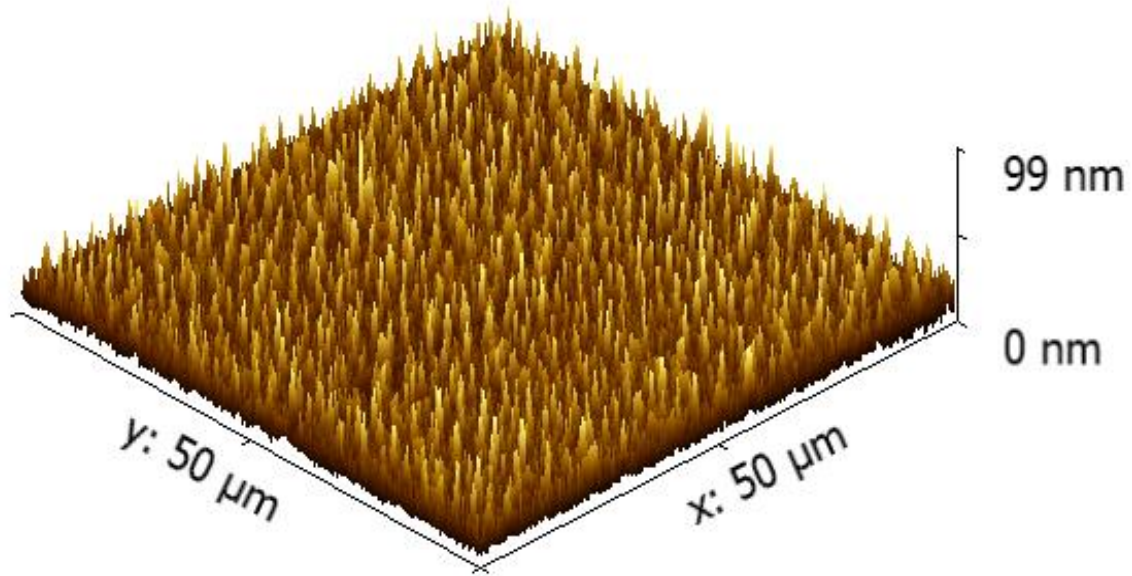
19. ábra Kétszeres PC felpörgetés 50×50μm-es AFM képe



20. ábra Kétszeres PC felpörgetés 50×50μm-es topográfiája



21. ábra Háromszoros PC felpörgetés 50×50μm-es AFM képe



22.ábra Háromszoros PC felpörgetés 50×50μm-es topográfiája

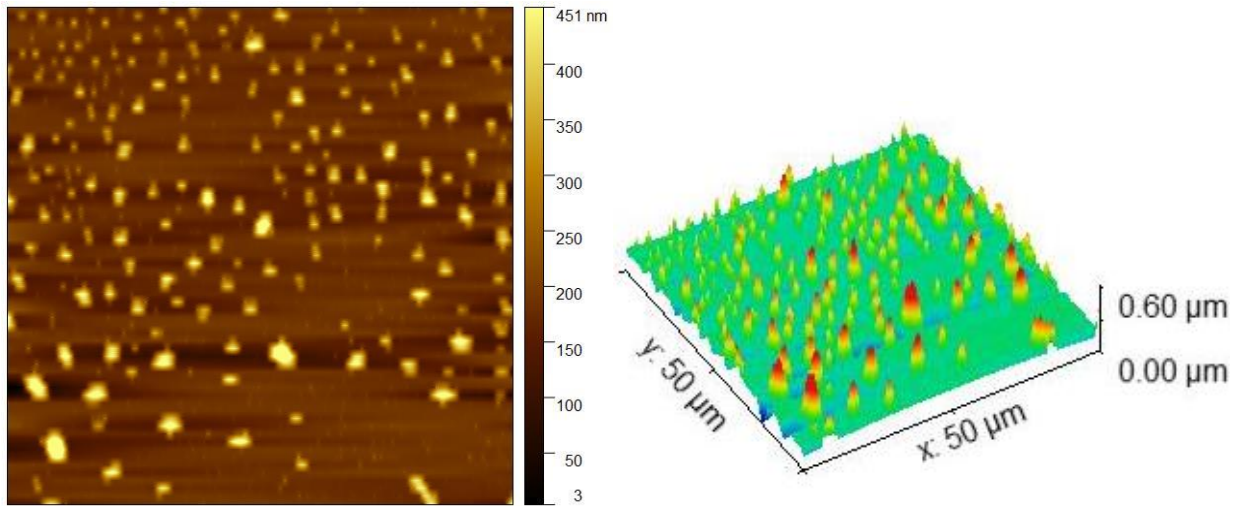
	Egyszeres felpörgetés	Kétszeres felpörgetés	Háromszoros felpörgetés
50×50 μm	10,6 nm	7,0 nm	6,7 nm
15×15 μm	10,4 nm	6,5 nm	7,5 nm
1×1 μm	2,0 nm	5,3 nm	6,5 nm

2.táblázat A felületi érdesség RMS értékei felpörgetésszám és a vizsgált terület szerint PC esetén

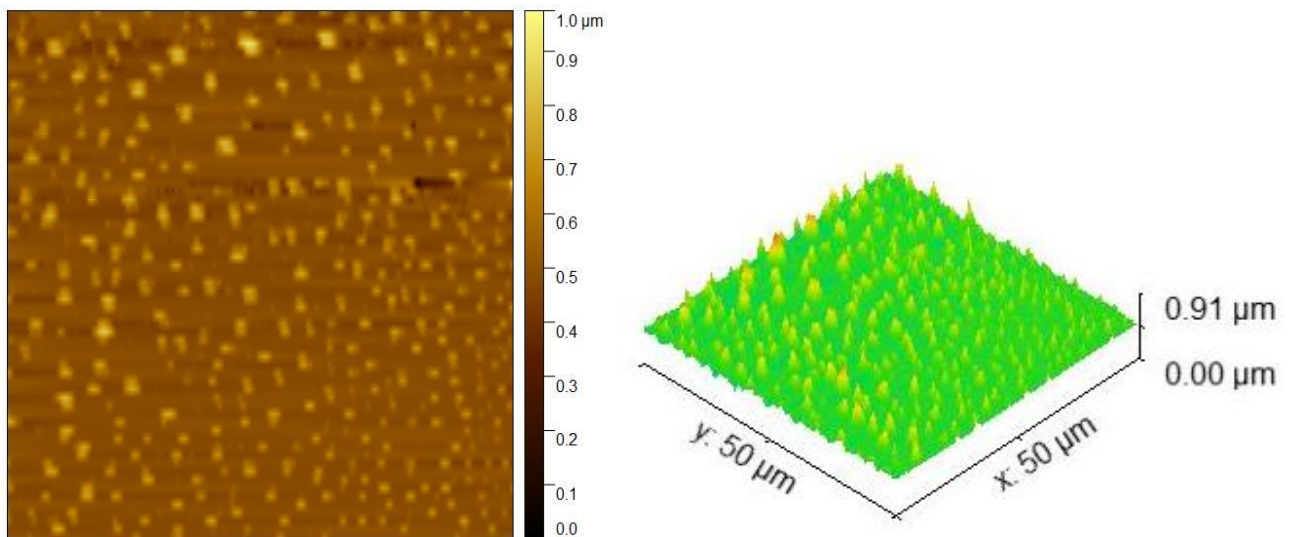
A mérések alapján látható, hogy a PC rétegnél hegyes struktúrák alakulnak ki. A felpörgetés számmal láthatóan egyre sűrűbben helyezkednek el, amivel a réteg is egyre inkább összefüggő lesz. A PC felszínek egyenletesnek mondhatók a kisebb és nagyobb felületek vizsgálata esetén is. Elmondható az is, hogy a PC-ből kisebb szemcsék keletkeznek a harmadik felpörgetés során. A felpörgetések száma befolyásolja a réteg érdességét (2.táblázat) és a maximális struktúra magasságát, vagyis a második és harmadik réteg felpörgetése simább és jobban fedő réteget produkál, mint egyszeres felpörgetésnél, de a felületen kialakult struktúrák elhelyezkedésének sűrűsége is nő a felpörgetés szám növelésével.

5.1.1.2 COP réteg

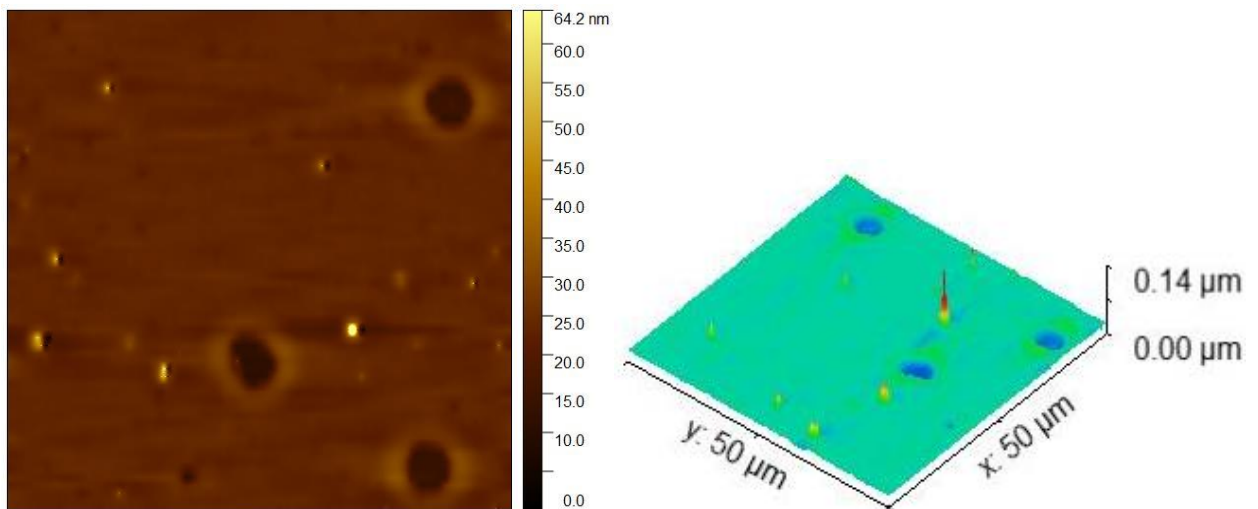
A COP oldattal kezelt lapkák felületét is ellenőriztük AFM-mel, hogy információt kapjunk a felületi alakzatok méretéről és elhelyezkedéséről. E méréseknél nemcsak üveglapkán, hanem használt OWLS chipeken is ellenőriztük a COP réteget. A készített képek az AFM prescan üzemmódjában készültek.



23. ábra COP 7mg/ml, egyszeres felpörgetés üveglapra



24. ábra COP 5mg/ml, egyszeres felpörgetés üveglapra



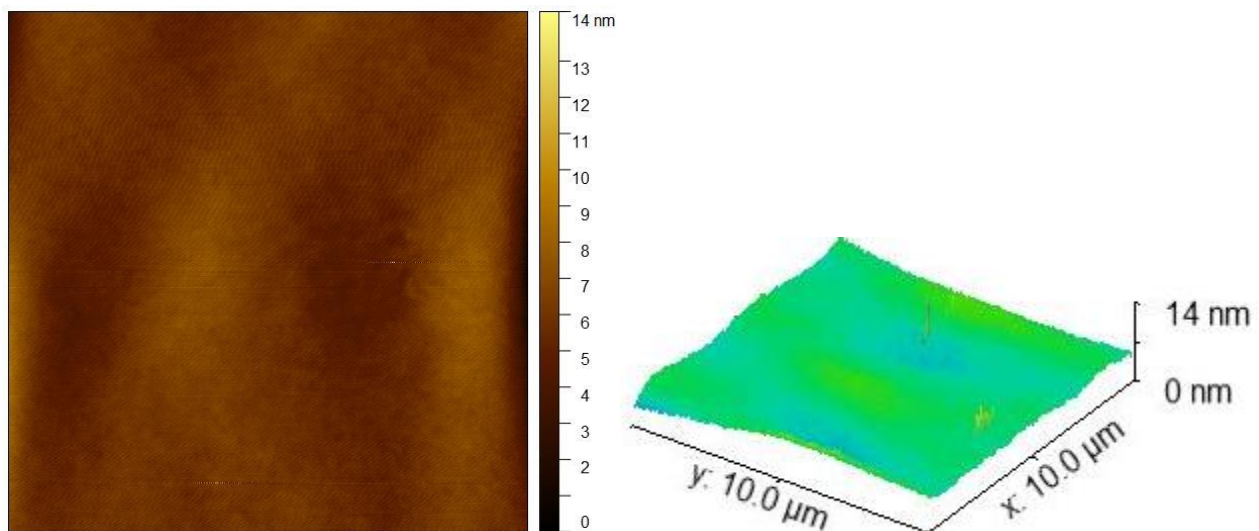
25. ábra COP 7mg/ml egyszeres felpörgetés OWLS chipre

	Egyszeres felpörgetés üvegen		Háromszoros felpörgetés üvegen	Egyszeres felpörgetés OWLS chipen		Háromszoros felpörgetés OWLS chipen
	5 mg/ml	7 mg/ml	5 mg/ml	7 mg/ml	5 mg/ml	5 mg/ml
50×50 μm	49,5 nm	85,9 nm	45,4 nm	2,2 nm	4,3 nm	4,2 nm
10×10 μm	26,4 nm	39,7 nm				

3.táblázat COP oldattal kezelt lapkák felületi érdességének RMS értékei felpörgetések száma és az oldat töménysége szerint

Az eredmények alapján jól látható, hogy COP oldat is rögöket képez a felületen, viszont azok egymástól távolabb helyezkednek el és nagyobb méretűek is, mint a PC esetében. Továbbá megfigyelhető volt, hogy a felpörgetések száma és a töménység nem befolyásolja érdemben sem a rétegen kialakult struktúrák magasságát, sem a felület érdességét olyan egyértelműen, mint a PC-nél. Érdekes viszont, hogy az OWLS chip felületén simább réteget képzett az oldat, mint az üvegen. Későbbi ellenőrzések során kiderült, hogy a nagyobb rögök oka lehet a nem megfelelő oldószer használta, amire a felvitel előtti szonikálás szükségessége is utalt már.

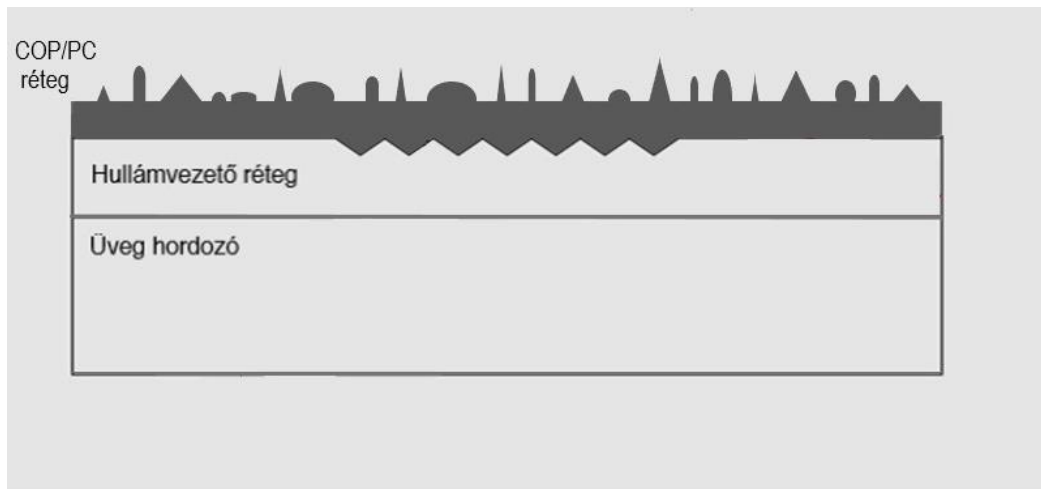
Ezért ciklohexánban való oldással is kísérleteztünk. Ami során azt tapasztaltuk, hogy a COP jól oldódik ebben az oldószerben, és 5-10 mg/ml koncentrációban jól borítja a felszín, illetve sima rétegeket tud létrehozni mind üveg mind APTES-sel kezelt felületen.



26.ábra 5mg/ml Ciklohexánban oldott COP egyszeres felpörgetés üveglapra

5.1.2 A karakterizált rétegek modellje

Az ellipszometriával a rétegvastagsárgól kapott információk alapján, olyan polimer réteget sikerült létrehozni, ami egybefüggően fedi a felületet PC esetén 50-60 nm vastagságban, COP esetén viszont 1-50 nm között alakulhat a rétegvastagság a felviteli paramétereiktől függően. Továbbá atomerőmikroszkópos mérések alapján megjelennek a felszínen különböző formájú és méretű struktúrák, amik hatására a felületi érdesség RMS értéke PC esetén 2-11 nm között alakult, COP használatával pedig 2-86 nm tartományban a felviteli paraméterek függvényében.



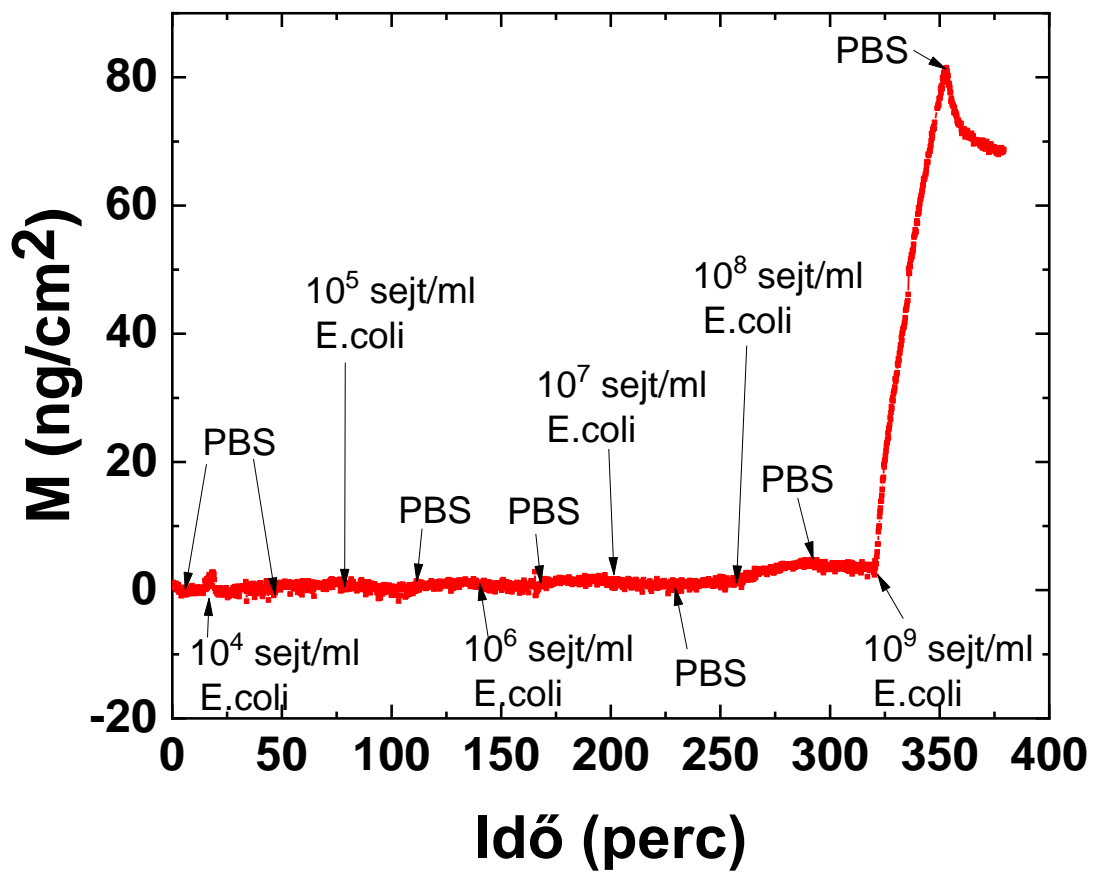
27.ábra Az elkészített PC/COP réteg sematikus ábrája

5.2 OWLS mérések

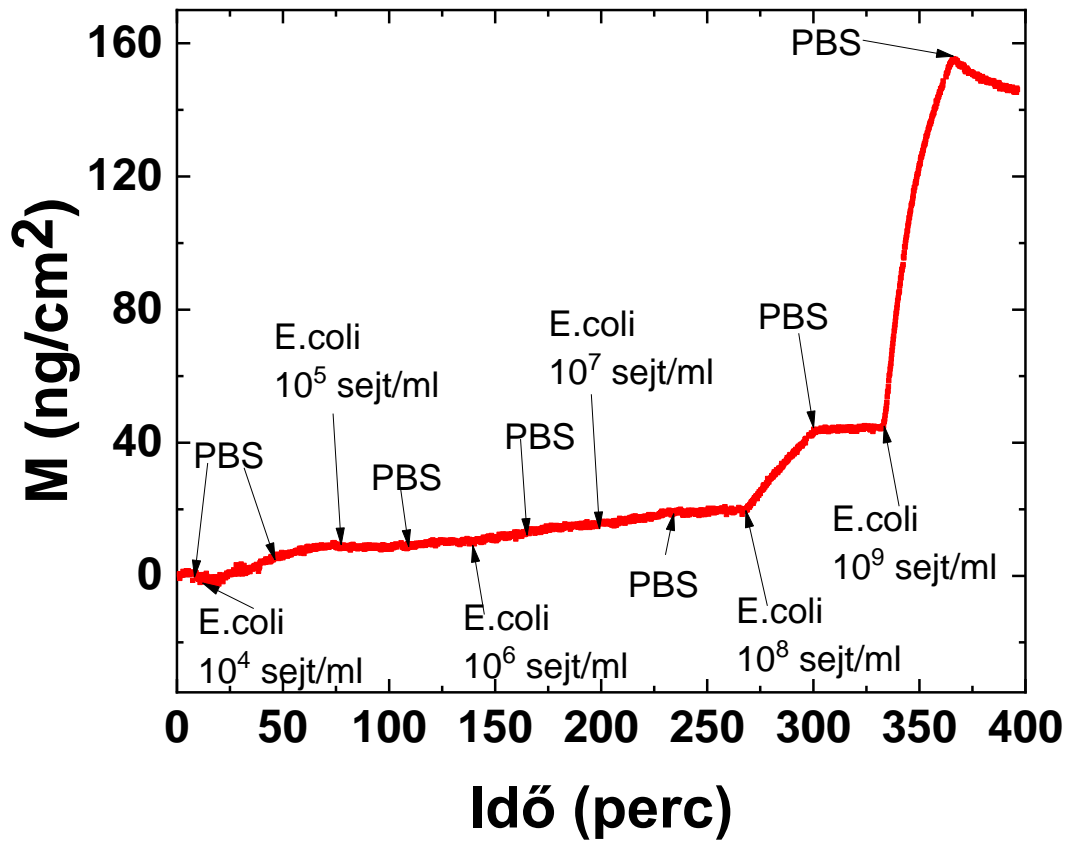
Az eddigi lépések és eredmények hitelesítésére, adszorpciós méréseket végeztünk OWLS műszer használatával, hogy lássuk valóban sikerült-e olyan réteget létrehozni a felületen, amivel mérhető a kitapadás. Továbbá a megfelelő antitest kiválasztásához is végeztünk méréseket, hogy megtudjuk melyik típusú antitesttel lehet a legnagyobb mennyiségű baktériumot megkötni a felületen. A szenzor chipet is a leírtak szerint kezeltük, viszont az ellenőrzési lépéseket nem végeztük el a mérés előtt.

5.2.1 *E. coli* aspecifikus kimutatása

A mérés során azt vizsgáltuk, milyen baktérium koncentrációnál kapunk jól mérhetően kitapadt baktérium mennyiséget 10^4 - 10^9 sejt/ml koncentrációk között, az oldatokat egymást követően a felszínre juttatva. Fél óra baktérium áramlás, majd fél óra pufferes mosás követte egymást minden koncentráció estén, a mérést ismételtük, hogy össze tudjuk hasonlítani az eredményeket.



28.ábra Aspecifikus *E. coli* adszorpció tiszta OWLS chipen



29.ábra 28.ábra Aspecifikus *E. coli* adszorpció tiszta OWLS chipen ismétlés

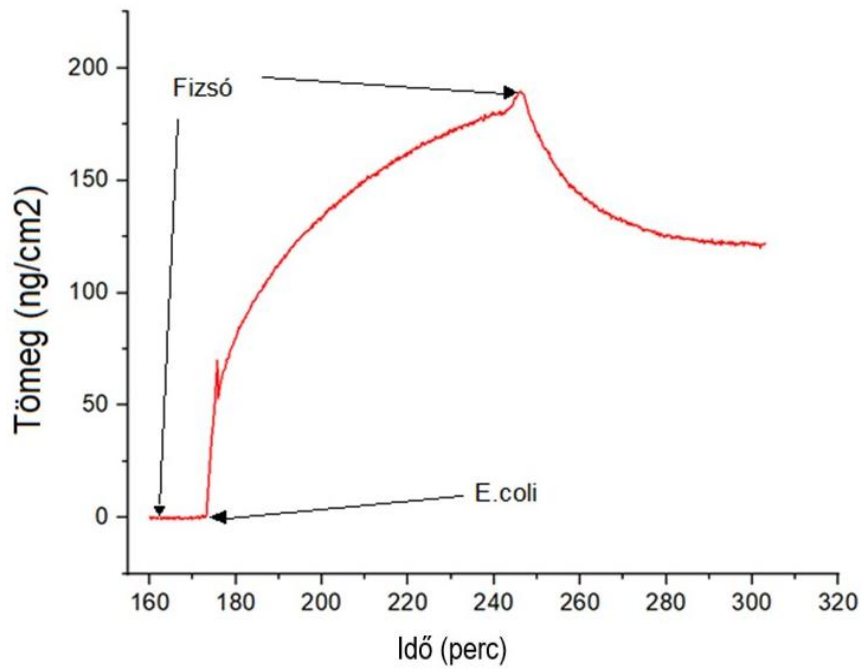
Felhasznált anyagok	Felületre kitapadt tömeg (10⁴ sejt/ml)	Felületre kitapadt tömeg (10⁵ sejt/ml)	Felületre kitapadt tömeg (10⁶ sejt/ml)	Felületre kitapadt tömeg (10⁷ sejt/ml)	Felületre kitapadt tömeg (10⁸ sejt/ml)	Felületre kitapadt tömeg (10⁹ sejt/ml)
E.coli	0	0	0	0	5	77
Maximális jelnél	6	0	3	6	24	111
E.coli	0	0	0	0	4	64
Lemosás végén	9	0	4	6	24	102

. táblázat A kitapadt tömegek összehasonlítása (Felül az első, alul pedig a második méréshez tartozó értékek olvashatók)

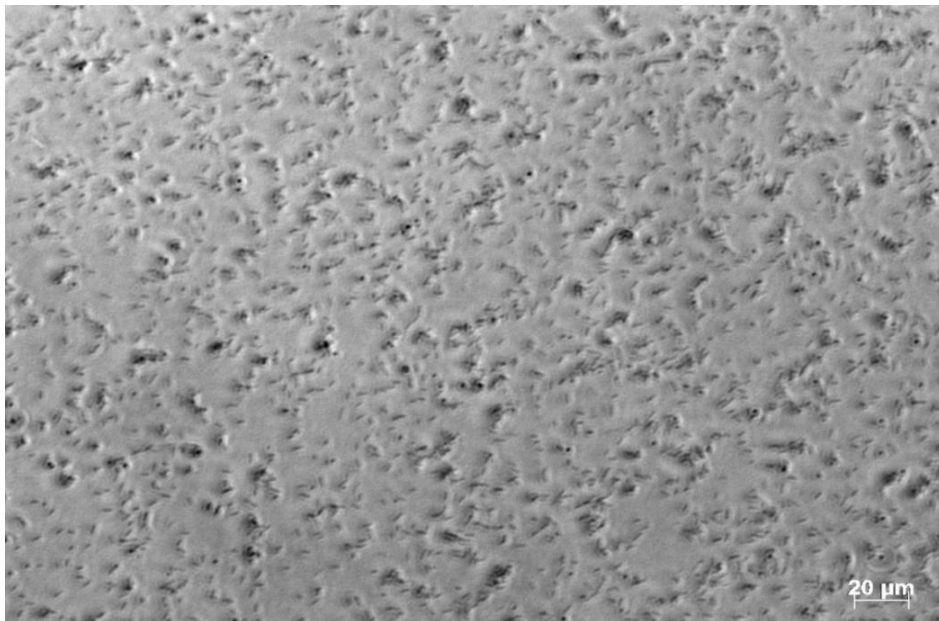
A mérések alapján elmondható, hogy 10⁸-10⁹ sejt/ml koncentrációknál mérhető jól karakterizálható jel, kisebb koncentrációknál a jel összemérhető a zajjal, illetve mérési hibákkal, hőmérsékleti eltéréssel. A két mérés közötti eltérést, a kapott baktérium oldatok, és a chippek közötti különbségek okozhatták.

5.2.2 E. coli adszorpciója PC rétegen

A méréshez egyszer felpörgetett 0.36 mg/ml töménységű THF-ben feloldott PC oldattal készült OWLS chipet használtunk. Az alapvonalat fiziológias sóoldat segítségével vettük fel, majd a 10⁸ sejt/ml töménységre hígított E. coli baktérium oldatot fecskendővel juttattuk a fluidikába, majd egy óra várakozás után elindítottuk a fiziológias sóoldattal történő mosást.



31.ábra A mérés során a chipre kitapadt baktériumok felületi tömegsűrűsége

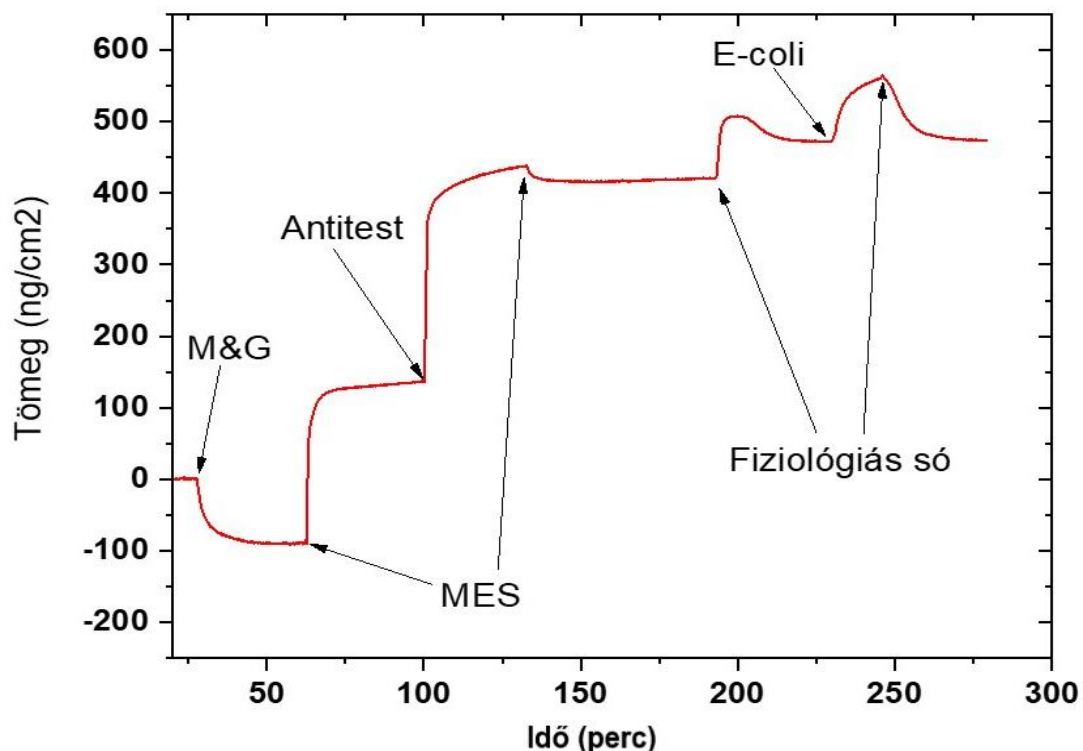


32.ábra A baktériumok mikroszkópos képe a kiömlő csőnél (40× nagyítás)

A mérés során a felületen maximálisan megjelent baktérium mennyisége 276 ng/cm^2 volt, aminek egy része lemosódott, de így is nagy mennyiségben (120 ng/cm^2) maradtak baktériumok a felszínen, amit a mikroszkóppal készült képek is igazoltak. A mérés alapján jól látható, hogy az elkészített, PC réteggel bevont szenzor chip alkalmas *E. coli* baktériumok megkötésére.

5.2.3 *E. coli* adszorpciója COP rétegen

A méréshez az 5 mg/ml töménységű, xilolban oldott COP-t használtuk, háromszor felpörgetve az OWLS chipre, mivel itt 4,2 nm felületi érdesség RMS értéket és 16-29 nm rétegvastagságot mértünk. A baktérium hozzáadása előtt a chipre, a kitapadást segítő anyagokat vittünk fel. Az első a Mix&Go (M&G) nevű felület aktiváló reagens, ami az antitestek orientált, és jobb kitapadását segíti elő a felületen, valamint a mérési időt is jelentősen rövidíti. [33] A baktérium esetén azért fiziológias sóoldat a hordozó közeg, mert ez tudja biztosítani az ozmotikus egyensúlyt a sejtfa két oldala között.



33.ábra *E. coli* baktérium kitapadásának mérése COP-n poliklonális antitesttel

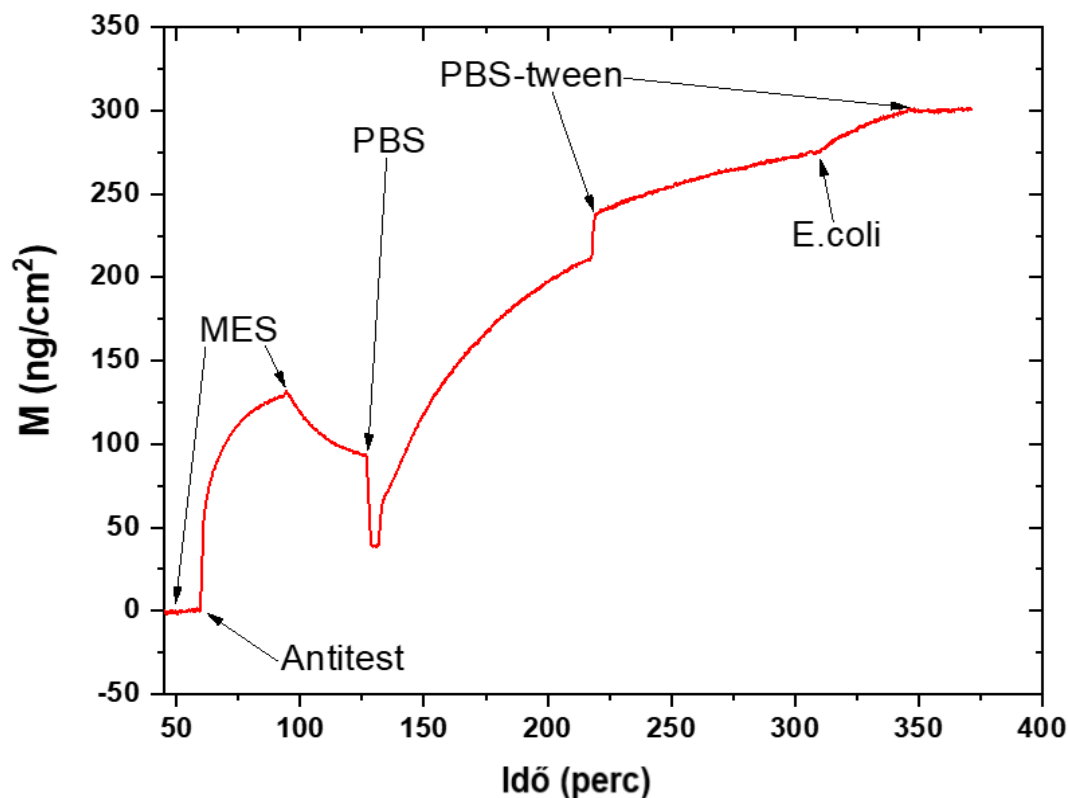
A mérés során a M&G 135 ng/cm² és az antitest (ThermoFischer, 7213) 281 ng/cm² nagy mennyiségben kitapadt a felszínre. A baktérium is láthatóan megjelent a felszínen (88 ng/cm²), viszont a mosást követően már csak nagyjából 1-2 ng/cm² maradt a felszínen *E. coli* baktériumból. Mivel ez a műszer érzékenységének a határa így a kitapadás igazolására további mérések szükségesek.

5.2.4 *E. coli* adszorpciója monoklonális antitesten

Mivel a COP réteg is legalább 20 nm vastag a felszínen, és erre visszük fel a nagyjából 10 nm vastag antitest immobilizáló réteg (M&G, ProteinA), majd az antitest réteget, így már az evanescens tér határára tudnak csak tapadni a baktériumok, ami befolyásolhatja az

érzékenységet, ezért COP réteg nélkül is végeztünk méréseket a megfelelő antitestek kiválasztására.

A mérés előtti éjszakán a chip ProteinA oldatban ázott, hogy segítse az antitestek kitapadást. A MES puffreben felvettük az alapvonalat, majd monoklonális antitestet (BioRad, egér, OBT0749) injektáltunk a rendszerbe. Az antitestek OWLS chipre kitapadt felületi tömegsűrűsége 93 ng/cm^2 volt. Ezután puffercsere következett, PBS oldatra, majd PBS-Tween oldatra, mivel ebben az esetben, a baktériumok ilyen pufferben oldva álltak rendelkezésre. *E. coli* baktérium felületre kitapadt tömege a maximális jelnél 28 ng/cm^2 , és lemosás után is 27 ng/cm^2 .



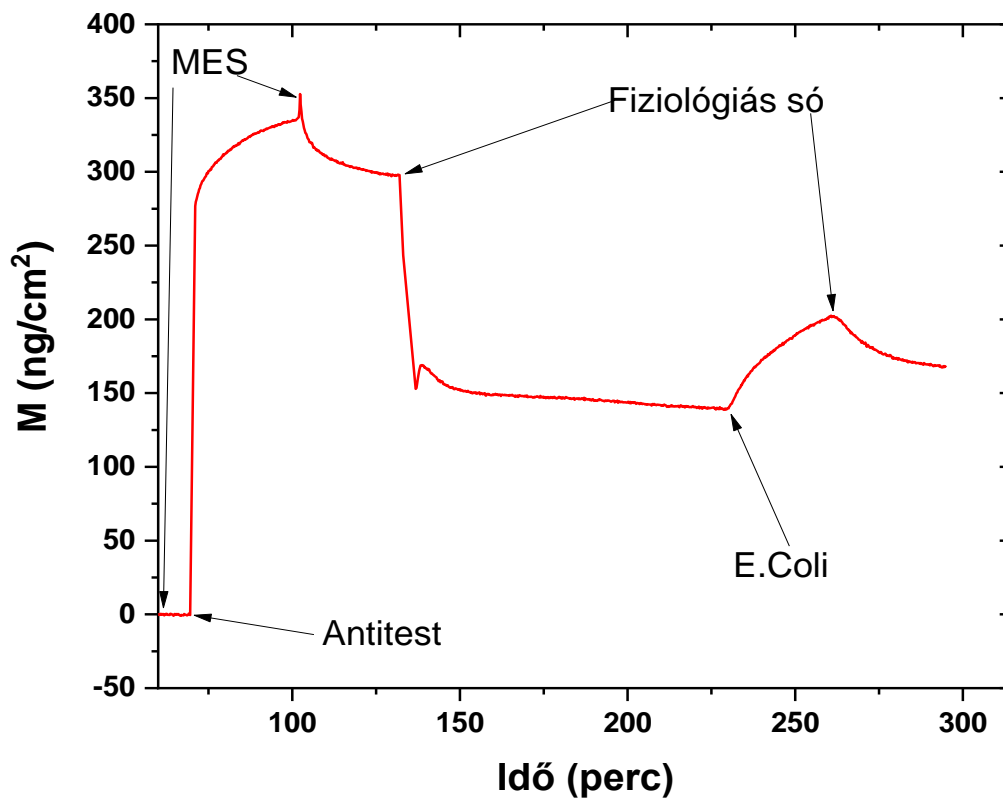
34. ábra *E. coli* adszorpció mérés monoklonális antitesten

Látható, hogy az antitest jelentős mennyiségben kitapadt a felületre (93 ng/cm). A PBS és PBS-Tween oldattal felvett alapvonal után, az *E. coli* baktérium felületre kitapadt tömege a maximális jelnél 28 ng/cm^2 , és lemosás után is 27 ng/cm^2 . Jól látható, hogy az antitestek a felületen megjelent baktériumokat gyakorlatilag teljes egészében megkötötték.

5.2.5 *E. coli* adszorpciója Bio-Rad poliklonális antitesten

Mivel a monoklonális antitest kitapadása esetén a kitapadt felületi tömegsűrűség nem tűnt nagy értéknek, illetve szokatlan volt, hogy nem történ baktérium lemosódás. Ezért, ugyanilyen mérést elvégeztünk poliklonális antitest (nyúl 4329-4906 Bio-Rad) használatával is.

A mérés előtti éjszakán a chip ProteinA oldatban ázott, hogy segítse az antitestek kitapadást. A MES puffreben felvettük az alapvonalat, majd poliklonális antitestet injektáltunk a rendszerbe. Ezután puffercsere következett, fiziológias sóoldatra, majd a 10^8 sejt/ml töménységű *E. coli* baktérium oldat hozzáadása végül pedig mosás fiziológias sóval.



35.ábra *E. coli* baktérium felületi adszorpciója poliklonális antitesten (A mérést konzulensem Farkas Enikő végezte)

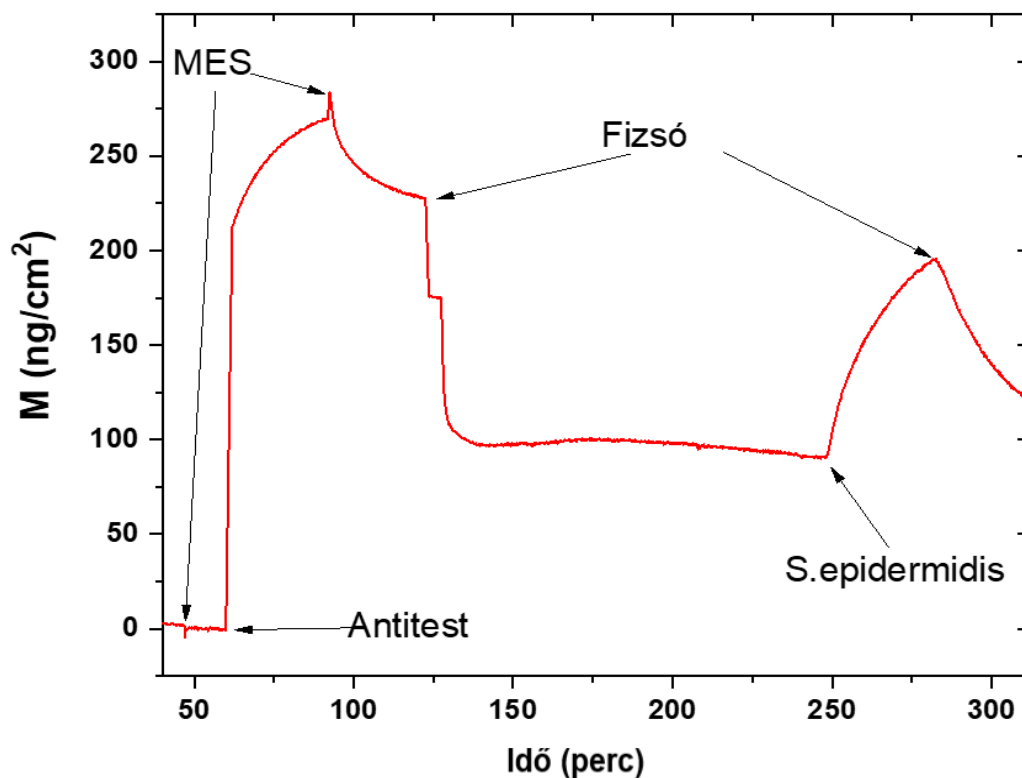
Az antitest injektálása és lemosás után 297 ng/cm^2 mennyiségben kötött ki a felszínre. Majd az áramlás mellett hozzáadott baktérium maximálisan mért felületi tömegsűrűsége 62 ng/cm^2 volt, amiből mosás után 28 ng/cm^2 kötött a felszínhez. Vagyis elmondható, hogy a poliklonális antitest valamivel jobban köti meg az *E. coli* baktériumot, továbbá nagyobb mennyiségben köt a felületre, mint az előző fejezetben ismertetett monoklonális antitest.

5.2.6 *E. coli* adszorpciója Thermofischer poliklonális antitesten

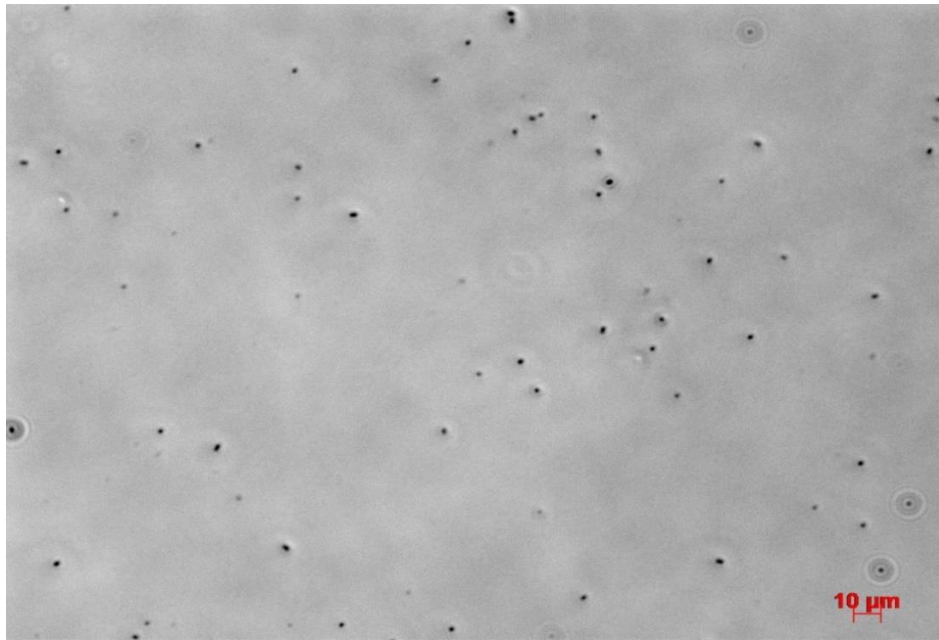
5.2.7 *S. epidermidis* adszorpciója poliklonális antitesten

A poliklonális antitest szelektivitásának vizsgálatához, egy olyan baktériummal is végeztünk mérést amire az antitest nem specifikus.

Az antitestek rögzítéséhez a chipet ProteinA oldatban áztattuk egy éjszakán át. A MES pufferrel felvett alapvonal után injektáltuk antitestet (nyúl 4329-4906 Bio-Rad), amiből 228 ng/cm^2 tapadt ki a felszínre, MES pufferes mosás után. Ezután fiziológiás sóoldatra cseréltük a puffert, majd hozzáadtuk az *S. epidermidis* baktériumot áramlás mellett. A maximálisan mért felületi tömegsűrűség 94 ng/cm^2 volt, míg fél óra mosás után 26 ng/cm^2 felületre kötődött mennyiséget mértünk (A mosást az összehasonlíthatóság miatt állítottuk le fél óra után).



36.ábra *S. epidermidis* baktérium adszorpciója *E. coli* specifikus poliklonális antitesten



37.ábra Baktériumok a kivetta közepénél (40× nagyítás)

Az adszorbeálódott felületi tömegsűrűséget, illetve az optikai mikroszkópos képeket is figyelembe véve elmondható, hogy a polikloniális antitest hasonlóan jól köti meg az *S. epidermidis* baktériumot, mint az *E. coli*-t, illetve a kitapadt mennyiség a monoklonális *E. coli* antitesttel is hasonló értéket mutat. Vagyis megállapítható, hogy a poliklonális antitest és a rá nem specifikus baktérium között van keresztreakció.

6 Összefoglalás

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek, **Dr. Bonyár Attilának** támogatásáért, és **Dr. Horváth Róbertnek**, aki lehetőséget biztosított munkám sikeres elvégzéséhez, illetve dolgozatom megírásához.

Köszönettel tartozom konzulensemnek **Farkas Enikőnek** munkám felügyeltéért és a mérések elvégzésének biztosításáért.

Köszönet illeti **Nagy Ágoston Gábort**, hogy tevékenységemet tanácsokkal látta el és a tapasztalatért, amit átadott.

Szeretném még megköszönni **Saftics Andrásnak** az ellipszometriás méréseket, illetve a segítő tanácsokat.

Köszönöm az **EK-MFA Nanobioszenzorika** kutatócsoportnak a belém vetett bizalmukat, segítségüket és hogy már az első nap óta csapattagnak érezhetem magam közöttük.

Továbbá hálával tartozom a **77Elektronika Kft.** részére, illetve **Szabó Dórának** és csapatának is, akik a Semmelweis Orvostudományi Egyetemről az antitesteket biztosították.

7 Irodalomjegyzék

- [1] Asif Ahmed, Jo V. Rushworth, Natalie A. Hirst, Paul A. Millner, „Biosensors for Whole-Cell Bacterial Detection,” *Clinical Microbiology Reviews*, pp. 631-633, 2014.
- [2] Y. Fang, *Label-Free Cell-Based Assays with Optical Biosensors in*, ASSAY and Drug Development Technologies, 2006.
- [3] M. D. Lorenzo, „Use of microbial fuel cells in sensors,” *Microbial Electrochemical and Fuel Cells*, 2016.
- [4] Pavel Damborský, Juraj Svitel , Jaroslav Katrlík, „Optical biosensors,” *Essays in Biochemistry*, 2016.
- [5] J. Vörös, J.J. Ramsdenb, G. Csucs, I. Szendro, S.M. De Paul, M. Textor, N.D. Spencer, *Optical grating coupler biosensors*, *Biomaterials* 23 , 2002.
- [6] H.H. Chienl, K.J. Mal, Jeremy J. Ramsden, Y.P. Yeh, *Kinetic Study of Bacterial Adhesion on Biomaterials by Using Optical Waveguide Lightmode Spectroscopy*, International Conference on Electronic & Mechanical Engineering and Information Technology, 2011, pp. 1205-1206.
- [7] Róbert Horváth, Henrik C. Pedersen, and Nina Skivesen, Dávid Selmeczi and Niels B. Larsen, *Optical waveguide sensor for on-line monitoring of bacteria*, *Optics Letters*, 2003.
- [8] R. Horváth, G. Fricsovszky, E. Papp *, „Application of the optical waveguide lightmode spectroscopy to monitor lipid bilayer phase transition,” *Biosensors and Bioelectronics* 18 , pp. 415-428, 2003.
- [9] MICHAEL SANDER,* MICHAEL MADLIGER, REN E P. SCHWARZENBACH, „Adsorption of Transgenic Insecticidal Cry1Ab Protein to SiO₂,” *Environmental Science & Technology*, %1. kötet44, %1. szám23, p. 8870–8876, 2010.
- [10] B. C. E.-O. MEASUREMENTS és M. Ltd, „owls-sensors.com,” [Online]. Available: <https://www.owls-sensors.com/pdf/EC-OWLS.pdf>. [Hozzáférés dátuma: 15 10 2019].

- [11] O. 210 és M. Ltd, „<https://www.owls-sensors.com>,” MicroVacuum Ltd, [Online]. Available: https://www.owls-sensors.com/pdf/OWLS_Standard_System.pdf. [Hozzáférés dátuma: 15 10 2019].
- [12] S.-0. I. S. HOLDER és M. Ltd. [Online]. Available: <https://www.owls-sensors.com/pdf/SH-0812.pdf>. [Hozzáférés dátuma: 15 10 2019].
- [13] M. Ltd, „www.owls-sensors.com,” 07 05 2018. [Online]. Available: <https://www.owls-sensors.com/pdf/OWLS-210-4-pages.pdf>. [Hozzáférés dátuma: 5 10 2019].
- [14] Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, et al., „The distribution and functions of immunoglobulin isotypes & The destruction of antibody-coated pathogens via Fc receptors,” in *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition.*, New York, Garland Science, 2001, pp. 10-50/80-100.
- [15] Neil S. Lipman, Lynn R. Jackson, Laura J. Trudel, and Frances Weis-Garcia, „Monoclonal Versus Polyclonal Antibodies: Distinguishing Characteristics, Applications, and Information Resources,” *ILAR Journal*, %1. kötet46, %1. szám3, pp. 258-268, 2005.
- [16] C. J. v. Oss, „Nature of Specific Ligand-Receptor Bonds, in Particular the Antigen-Antibody Bond,” *Journal of Immunoassay*, %1. kötet21, %1. szám2-3, pp. 109-142, 2008.
- [17] Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, ABBAS - Basic Immunology Functions and Disorders of the Immune System, Philadelphia, PA: Elsevier, 2010.
- [18] Dr. Balajthy Zoltán, Dr. Aradi János, Dr. Balajthy Zoltán, Dr. Csósz Éva, Dr. Scholtz Beáta, Dr. Szatmári István, Dr. Tózsér József, Dr. Varga Tamás, „<https://regi.tankonyvtar.hu>,” Debreceni Egyetem, 05 06 2011. [Online]. Available: https://regi.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/0011_1A_Molekularis_terapiak_hu_book/ch05.html. [Hozzáférés dátuma: 20 04 2020].
- [19] Brian J. Booth, Boopathy Ramakrishnan, Kristin Narayan, Andrew M. Wollacott, Gregory J. Babcock, Zachary Shriver & Karthik Viswanathan, „Extending human IgG half-life using structure-,” mAbs, Taylor & Francis Online , 2018.

- [20] Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ , „Prokaryotes: the unseen majority,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, %1. kötet95, %1. szám12, p. 6578–83, 1998.
- [21] Woese CR, Kandler O, Wheelis ML , „Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya,” *Woese CR, Kandler O, Wheelis ML (June 1990). "Towards a natural system of organisms: proposal foProceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, %1. kötet87, %1. szám12, p. 4576–79, 1990.
- [22] Tenailon O, Skurnik D, Picard B, Denamur E , „"The population genetics of commensal Escherichia coli",” *Nature Reviews. Microbiology*, %1. kötet3, %1. szám8, p. 207–17, 2010.
- [23] S. P. „Bacteria in Biology,” *Biotechnology and Medicine*, %1. kötet5th ed. Wiley., %1. számISBN 978-0-471-98880-9., p. 444–454, 1999.
- [24] Tortora, Gerard, *Microbiology: An Introduction*, San Francisco, CA: Benjamin Cummings, 2010, p. 85–87.
- [25] Fux CA, Shirliff M, Stoodley P, Costerton JW, „Can laboratory reference strains mirror "real-world" pathogenesis?,” *Trends in Microbiology*, %1. kötet13, %1. szám2, p. 58–63, 2005.
- [26] L. Helal, „mrpnews,” NDSU Electron Microscopy Facility, 21 05 2014. [Online]. Available: <https://img.apmcdn.org/80be473732d36445fe2a035be5863329f1786057/uncropped/b955c2-20131010-ecoli.jpg>. [Hozzáférés dátuma: 18 05 2020].
- [27] Özlem Torun, Ismail Hakki Boyacı, Erhan Temur, Ugur Tamer, „Comparison of sensing strategies in SPR biosensor for rapid and sensitive,” *Biosensors and Bioelectronics*, 2012.
- [28] M. Tortonese, R. C. Barrett, and C. F. Quate, *Atomic resolution with an atomic force microscope using piezoresistive detection*, *Appl. Phys. Lett.*: American Institute of Physics. , 1993.

- [29] B. B. (Ed.), *Springer Handbook of Nanotechnology*, 4th szerk., Germany : Springer Nature , 2017.
- [30] Nirschl, M., Reuter, F., & Vörös, J, *Review of Transducer Principles for Label-Free Biomolecular Interaction Analysis. Biosensors*, Biosensors, 2011.
- [31] J. J. Ramsden, *Optical biosensors*, 1997.
- [32] Ogieglo, W., Wormeester, H., Eichhorn, K.-J., Wessling, M., & Benes, N. E. , „In situ ellipsometry studies on swelling of thin polymer films: A review.,” *Progress in Polymer Science*, %1. kötet42, p. 42–78., 2015.
- [33] A. T. P. Ltd, „<https://www.sigmaaldrich.com>,” Anteo Technologies Pty Ltd, [Online]. Available:
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/aplsc010?lang=hu®ion=HU>.
- [34] C.A.Brown*G.Savary, „Describing ground surface texture using contact profilometry and fractal analysis,” *Wear*, %1. kötetVolume 141, %1. számIssue 2, pp. 211-226, 1991.
- [35] N. Instruments, „Nanoscience.com,” 2017. [Online]. Available:
<https://www.nanoscience.com/techniques/optical-profilometry/stylus/>. [Hozzáférés dátuma: 5 10 2019].