

EGYEDI SEJTEK MANIPULÁCIÓI ROBOTIZÁLT MIKROPIPETTÁVAL

Szabó Bálint^{1,2}, Ungai-Salánki Rita^{1,2}, Francz Barbara², Gerecsei Tamás^{1,3}, Horváth Róbert³

¹ ELTE Biológiai Fizika Tanszék, Budapest

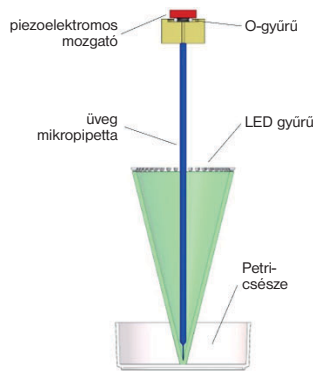
² CellSorter KFT, Budapest

³ ELKH EK MFA, Nanobioszenzorika Laboratórium, Budapest

A XX. század utolsó évtizedében a Humán Genom Projekt az emberi DNS feltérképezését tűzte ki célul. Az ekkor és ezt követően kifejlesztett DNS-szekvenáló (bázissorrendeket meghatározó) technikák forradalmasították a molekuláris biológiát, és széleskörű felhasználást nyertek számos tudományágban, a régészettől kezdve a kriminalisztikán át a családkutatásig. Ugyanakkor a diagnosztikában és a gyógyászatban még mindig kevésbé terjedt el a DNS- vagy RNS-szekvenálás alkalmazása.

Az egyedi sejtek DNS és RNS állományai bázissorrendjeinek meghatározása az utóbbi 10 évben vált lehetővé a második és harmadik generációs szekvenáló technikák kifejlesztését követően. A rákkutatásban, a daganat (tumor) diagnosztikában és a daganatos betegségek terápiajában egyaránt fontos volna ismerni a betegség molekuláris hátterét az egyedi sejtek szintjén. A vérben keringő, igen ritka tumorsejtek genetikai vizsgálata nagy áttörést jelentene. Az általunk fejlesztett és a címben szereplő technológia, valamint mérési eljárás (1. ábra) egyik célja éppen ez.

Bár a mikroliteres térfogatú folyadékok kézi pipettával történő kezelése rutinfeladat, a nanoliteres mennyiségek pipettázása számos technikai nehézség, többek között a felületi feszültség, a tapadás (adhézió) és a párolgási hatások miatt kihívást jelent. Kifejlesztettünk egy teljesen automatizált piezoelektromos mikropipettát (2., 3. ábra), aminek pontossága 1 nanoliter alatti [1]. Ezzel az egyedi sejtek robotizált elkülönítésének (izolálásának) hatékonyságát 90% fölé sikerült emelni (4. ábra), ami kulcsfontosságú a ritka vagy értékes sejtek kiválogatásakor, különösen az orvosi alkalmazásokban. A kis méretű, kompakt piezoelektromos mikropipetta különböző (bio)kémiai munkafolyamatokba illeszthető. Kiküszöböli a műanyag csöveket, szelepeket, fecskendőket és nyomástartályokat. A minta, például sejtek vagy apró cseppek fázis-

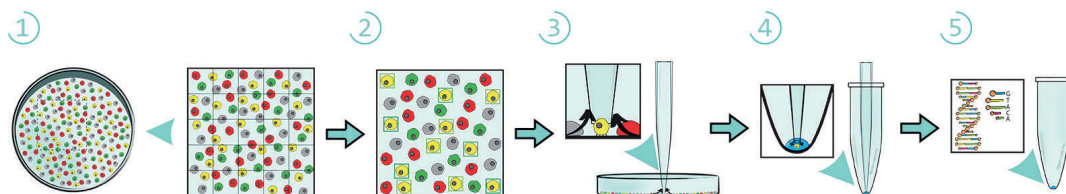


2. ábra. A piezoelektromos mikropipetta vázlatja. Az elrendezés tetején lévő (piros) piezo mozgató szerkezet (aktuátor) egy (fekete) O-gyűrűt nyom. A (kék) üveg mikropipetta egy függőleges csatornán keresztül kapcsolódik az O-gyűrű belső térfogatához. Ezek mindegyike vízzel van feltöltve. A fáziskontraszt megvilágítást a mikropipettával koncentrikusan elhelyezett LED-ek gyűrűje biztosítja. Ezt az elrendezést szabadalmak védik (forrás: [1])

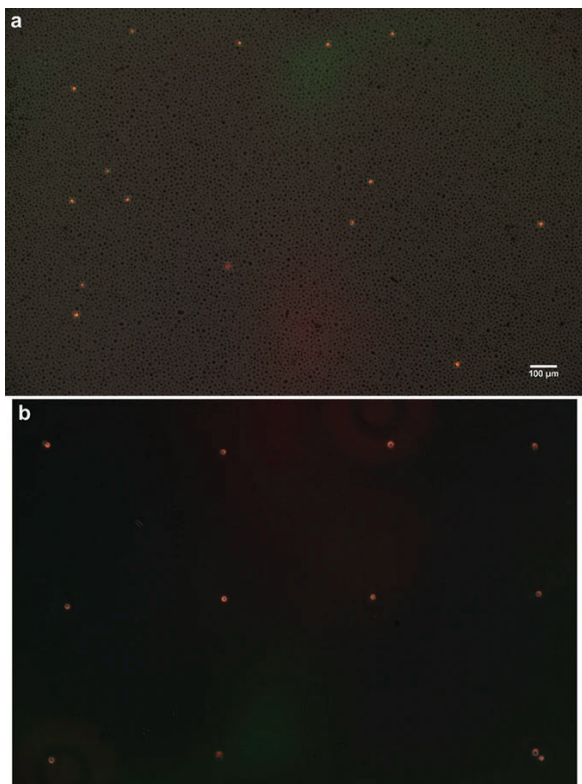


3. ábra. A CellSorter (sejtválogató) piezoelektromos mikropipetta egy fluoreszcens mikroszkópon, amint egy Petri-csészéből különít el egyedi sejteket PCR-csővekbe (forrás: www.cellsorter-scientific.com)

kontraszt megvilágításához a mikropipettával koncentrikusan elhelyezett világító diódákból (LED) álló gyűrűket építettünk. Ugyanez az eszköz könnyen használható



1. ábra. 1) A Petri-csészében lévő sejtek képét beszkenyeljük egy mikroszkóppal. A képkockákból nagyfelbontású digitális térkép készül. 2) A nagyszámú sejtről készült képeket szoftverrel elemezzük a ritka célsejtek felismerése érdekében. 3-4) A detektált ritka sejteket automatikusan felismeri a szoftver, és a robot egy üveg mikropipettával PCR-csővekbe helyezi őket, amelyekben polimeráz-láncreakció (angolul: Polymerase Chain Reaction) megy végbe. 5) A ritka sejtek genomjának (DNS) és/vagy transzkriptomjának (mRNS-molekulák összességének) elemzése (forrás: www.cellsorter-scientific.com)



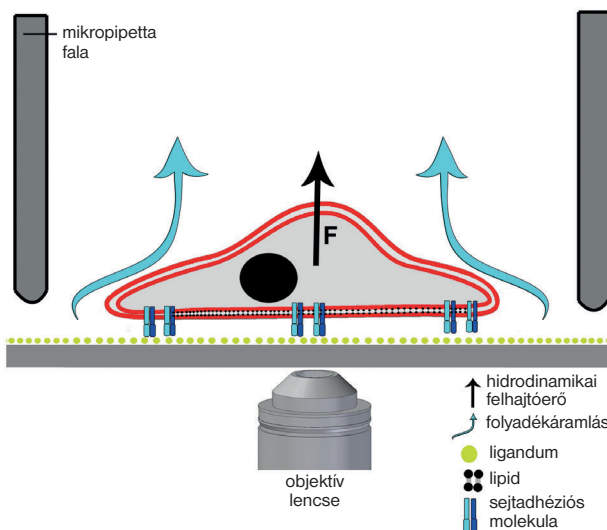
4. ábra. Egysejtes izolálás sűrű szuszpenzióból. Módszerünk képes egyetlen jelölt sejtet elkülöníteni sűrű sejt kultúrákból, amelyek 1000-szer több nem jelölt sejtet tartalmaztak. Az (a) panel a vörös fluoreszcens és a szürkeárnyaltos fáziskontraszt képek kombinációja/montázsa. A szoftver által detektált 15 jelölt sejtet zöld négyzetek jelzik a ~17 000 jelöletlen sejt között. A válogatási folyamat 3 egymást követő lépésben történő megismétlésével a legtöbb kiválasztott célsejtet sikerült izolálnunk. A (b) panel (hasonlóan az (a)-hoz) a fluoreszcens és fáziskontraszt képek montázsa, amely az elkülönített 12 fluoreszcens sejtet mutatja egymástól 500 μm-re elhelyezve. A végleges kultúra nulla nem jelölt sejtet tartalmaz. Az utolsó 2 sejtet ugyanarra a helyre injektáltuk, mivel a 11. sejt lerakása nem sikerült, amikor a tervezett helyen próbáltuk (forrás: [2])

egyetlen sejtet nanoliter térfogatú cseppekben történő nyomtatásához is. Elképzeléseink szerint az új technológia az orvosi diagnosztikában alkalmazott egysejtes manipulációk, például a keringő tumorsejtek izolálásakor is hasznosítható lesz.

A milliliteres (ml) vagy mikroliteres (μl) skálán történő kézi pipettás folyadékkezelés rutinfeladat a laboratóriumokban. A 0,1 μl alatti térfogatok kezelése azonban kihívást jelent. Az apró cseppek dinamikáját a felületi feszültség uralja a gravitációval szemben, ha a csepp mérete kisebb, mint a kapilláris hossz. A víz-levegő határfelületen normál hőmérsékleten és nyomáson a kapilláris hossz ~2 mm. A kis csepp és a pipetta szilárd felülete közötti tapadási erő szintén döntő jelentőségű ezen a méretskálán. A parányi vízcsepp gyors elpárolgása további nehézséget jelent. Amikor azonban a reagensek térfogata korlátozott, például egysejtes méréseknél, a nanoliter (nl) vagy pikoliter (pl) térfogatú folyadékkezelés nagy előnyt jelent.

Mikrofluidikai chip. A legerjedtebb megoldás kis folyadékmennyiségek kezelésére mikrométeres szélességű csatornákkal rendelkező mikrofluidika alkalmazása. A mikrofluidika integrálása összetett chipbe nagyon ígéretes, ennek egyik célja az úgynevezett *lab-on-a-chip* rendszerek megvalósítása. A cseppalapú mikrofluidika olajos környezetben szuszpendált szubnanoliteres vízcseppekkel dolgozik. A jelenleg rendelkezésre álló mikrofluidikáknak azonban számos technikai hátránya van: a chippek nagyon érzékenyek a közeg szilárd szennyeződésére. A stabil emulzió fenntartásához speciális és drága olajokra van szükség, megfelelő felületaktív anyagokkal. A legtöbb esetben nagyon nehéz az áramlási sebesség megfelelő stabilitásának elérése, nem is beszélve a szükséges stacionárius áramlás kialakítása előtti és utáni átmeneti (tranziens) hatásokról. Nagy előnyük, hogy a cseppek belsejében csapdázott egyedi sejtek külön-külön DNS-vonalkóddal jelölhetők meg, és a cseppek összeolvadása után együtt szekvenálhatók. Az egyes sejtek fenotípusának információi azonban elvesznek ebben a folyamatban. Így a DNS/RNS-szekvencia nem hozható összefüggésbe az adott sejt daganatban vagy fejlődő szövetben betöltött pontos szerepével.

Az egyedi sejtek elkülönítése mikropipettával a sejt mikroszkópos képe alapján jól bevált módszer. A műszerek áteresztőképességének növelése és a hatékonyság javítása érdekében az elmúlt években megjelentek a motorizált mikroszkópokat és mikromanipulátorokat alkalmazó félautomatizált technikák. Mi is egy mikropipettán alapuló eszközt optimalizáltunk és alkalmaztunk, hogy minimalizáljuk a sejtek felvételéhez szükséges folyadéktérfogatot, és maximalizáljuk a pontosságot. Kifejlesztettünk egy teljesen automatizált, kompakt piezoelektromos mik-



5. ábra. A sejttapadás mérése. A mikroszkóp objektívjével leképezett sejt mikrométeres pontossággal megcélozható az üveg mikropipettával. A beszívott folyadék áramlása hidrodinamikai erőt fejt ki a sejtre. Abból, hogy mekkora áramlási rátánál (térfogatáramnál) válik le a sejt a felületről, kiszámolható a tapadási (adhéziós) erő, amit a sejtdhéziós molekulák közvetítenek (forrás: [6])

ropipettát, amely a nagy felbontású képpalkotást 1 nanoliternél jobb folyadékkezelési pontossággal kombinálja. Előnye a kis méret és egyszerű működés. Érzékeny vagy ritka sejteket képes 90%-nál nagyobb hatékonysággal izolálni. Alkalmazható nanoliteres cseppek nyomtatásához, beleértve az egysejtes nyomtatást is.

A jelenleg folyó kutatásaink egyik célja a piezoelektromos mikropipetta alkalmazása a sejttapadás vizsgálatára (5. ábra). A sejtszintű, specifikus fehérjék által biztosított adhézió jobb megértése [3] segíthet az immunológia [4], a rákos betegségek kialakulásának mélyebb megismerésében, és új terápiás célpontok is remélhetők tőle [5]. Ugyanis a sejtek egymáshoz vagy a sejtközötti mátrixhoz való tapadásának erőssége és dinamikája megszabja a sejtek vándorlását a szövetekben, amely kulcsfontosságú a rákos áttétek kialakulásakor. A mikropipettában kialakuló folyadékáramlást fluidikai szimulációkkal [6] modelleztük és kísérletesen mikroyöngyökkel vizsgáltuk [7]. A folyadékáramlási szimulációk lehetővé teszik a pipettával felszívott sejtre ható erő kiszámolását, és így a sejtheadhézió mérését.

Másik célunk a vérben keringő daganatossejtek izolálása az azt követő molekuláris vizsgálatok céljából. A folyékony sejt/szövet mintavételezés (biopszia) egy új irány a daganatos betegségek diagnosztikájában és monitorozásában, amely a vérben szabadon keringő tumor-DNS (ctDNS) vagy a vérben keringő tumorsejtek (CTC) elemzésén alapul. A ctDNS a vérplazmából különíthető el. A sejtmagos CTC-k sűrűsége a fehérvérsejtek sűrűségének tartományába esik, mivel sűrűbbek a plazmánál és kevésbé sűrűek a vörösvértesteknél. Egy néhány milliliteres vér-

mintából a DNS és RNS molekulák vizsgálatával információt nyerhetünk ki a kezdődő vagy kezelés alatt álló daganatról. A vérben keringő tumorsejtek detektálása és izolálása azonban nehéz feladat, mert sok millió normál fehérvérsejt között kell megtalálni a beteg sejteket. Úgy gondoljuk, hogy módszerünk rövidesen alkalmas lesz erre a feladatra is, amin jelenleg aktívan dolgozunk. Műszerünket világszerte jelenleg ~20 kutatólaboratóriumban használják, köztük az MIT-n Bostonban és a Karolinska Intézetben Stockholmban.

IRODALOM

1. Francz B, Ungai-Salánki R, Sautner É, Horváth R, Szabó B (2020) Subnanoliter precision piezo pipette for single cell isolation and droplet printing. *Microfluidics and Nanofluidics* 24: 12
2. Ungai-Salánki R, Gerecsei T, Fürjes P, Orgován N, Sándor N, Holczer E, Horváth R, Szabó B (2016) Automated single cell isolation from suspension with computer vision. *Scientific Reports* 6: 20375
3. Gerecsei T, Chrenkó P, Kanyó N, Péter B, Bonyár A, Székács I, Szabó B, Horváth R (2021) Dissociation constant of integrin-RGD binding in live cells from automated micropipette and label-free optical data. *Biosensors* 2021 (11): 32
4. Lukácsi S, Gerecsei T, Balázs K, Francz B, Szabó B, Erdei A, Bajtay Z (2020) The differential role of CR3 (CD11b/CD18) and CR4 (CD11c/CD18) in the adherence, migration and podosome formation of human macrophages and dendritic cells under inflammatory conditions. *PLoS One* 15 (5): e0232432
5. Ungai-Salánki R, Haty E, Gerecsei T, Francz B, Béres B, Sztilkovichs M, Székács I, Szabó B, Horváth R (2021) Single-cell adhesion strength and contact density drops in the M phase of cancer cells. *Scientific Reports* 11: 18500
6. Salánki R, Hős C, Orgován N, Péter B, Sándor N, Bajtay Z, Erdei A, Horváth R, Szabó B (2014) Single cell adhesion assay using computer controlled micropipette, *PLoS One* 9 (10): e111450
7. Ungai-Salánki R, Csippa B, Gerecsei T, Péter B, Horváth R, Szabó B (2021) Nanonewton scale adhesion force measurements on biotinylated microbeads with a robotic micropipette. *Journal of Colloid and Interface Science* 602: 291-299