

課題番号 : F-20-WS-0150
利用形態 : 機器利用
利用課題名(日本語) : 不均一に出現する抗菌薬抵抗性細菌のメカニズム解明
Program Title (English) : The mechanism underlying heterogeneous antibiotic persister cells
利用者名(日本語) : 山本尚輝
Username (English) : N. Yamamoto
所属名(日本語) : 1)早稲田大学大学院 先進理工学研究科
Affiliation (English) : 1) Graduate School of Science and Engineering, Waseda Univ.,
キーワード/Keyword : persister、リソグラフィ・露光・描画装置、プラズマ処理、マイクロ流体デバイス

1. 概要(Summary)

近年、同じ遺伝子を持ったクローナルな集団内に全く異なる表現型を持つ亜集団が存在することが明らかとなってきた。特に、細菌集団では一部で形成される後述の persister が感染症治療を困難にしているため、早急な問題となっている。本研究室では、特に抗菌薬抵抗性を有する persister と呼ばれる集団に注目し、シングルセルレベルで遺伝子発現の挙動を追跡することによって persister の形成メカニズムを明らかにすることを目的とした。本研究では、これまで当研究室で明らかにした乳酸脱水素酵素 ldhA の発現挙動や細胞内の ATP 濃度を評価することのできる蛍光タンパク質 QUEEN などを大腸菌に発現させて persister 形成との関係性を調べる。本研究では、抗菌薬添加および長時間のタイムラプス観察を必要とするため、最適なマイクロ流体デバイスを開発する必要がある。

2. 実験(Experimental)

【利用した主な装置】

両面マスクアライナ、プラズマ処理装置、簡易 SEM (キーエンス)、クリーンルーム×2、表面極微細構造測定装置(テンコール)

【実験方法】

まず、Φ25mm のカバーガラス表面をプラズマ処理装置で 5 min プラズマ処理した。その後、スピンドーターを用いて SU-8 2000.5 を各回転速度 (500, 750, 900, 1000 rpm) で塗布した。その後、95°C で 1 min 加熱処理し、マスクアライナで目的のパターンに UV 露光させた。また、95°C で 1 min 加熱処理した後、SU-8 developer で現像した。作成したカバーガラスは、明視野顕微鏡でパターンを確認した後、テンコールで膜厚を測定した。

3. 結果と考察(Results and Discussion)

0.7-0.9 μm の膜厚を形成させるため、SU-8 2000.5 を用いて、スピンドーターを各回転速度で塗布し、最終的に形成されたカバーガラスの膜厚を測定した。その結果、750 rpm 付近で最も目標に近い膜厚が測定された (Fig. 1(a))。さらに、本プロトコルの再現性を確認するため、作成したカバーガラスの膜厚のばらつきを確認したところ、0.1 μm 程度の誤差は見られたものの目標の膜厚を安定して作成することができた (Fig. 1(b))。

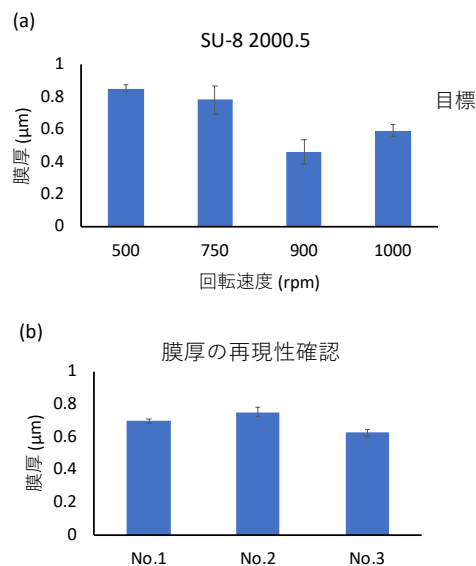


Fig. 1 Film thickness measurement results (a) Rotation speed examination (b) Reproducibility confirmation

4. その他・特記事項(Others)

なし

5. 論文・学会発表(Publication/Presentation)

なし

6. 関連特許(Patent)

なし