

Generator izmenične napetosti za elektroformacijo orjaških fosfolipidnih veziklov

Marin Gazvoda de Reggi¹, Urban Malavašič¹, Marko Jeran^{1,2}, Samo Penič¹

¹ Laboratorij za fiziko, Fakulteta za elektrotehniko, Univerza v Ljubljani, Tržaška cesta 25, SI-1000 Ljubljana

² Laboratorij za klinično biofiziko, Zdravstvena fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zdravstvena pot 5, SI-1000 Ljubljana

E-pošta: samo.penic@fe.uni-lj.si, marko.jeran@fe.uni-lj.si

Voltage source for electroformation of giant unilamellar vesicles

Cells are the main building blocks of all living organisms and are therefore subject of intensive research. Cell membranes are their vital components as their structure and properties influence many important functions of the cell. Due to the complicated structure of the cell membrane, researchers use simpler structures that resemble the membrane, called unilamellar vesicles, especially giant unilamellar vesicles, due to their size. There are many methods for acquiring the vesicles using their main building blocks – phospholipids, electroformation being the most commonly used.

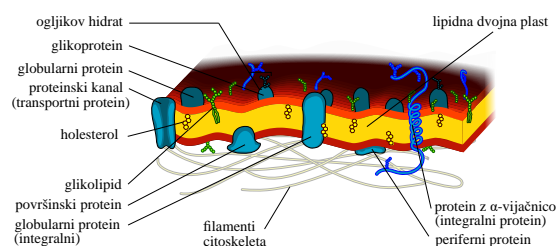
In this work, an open-source sinusoidal voltage source designed for electroforming giant unilamellar vesicles will be presented. The device has been successfully used to produce vesicles from the phospholipid POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) and a mixture of POPC and cholesterol (4/1).

1 Uvod

Celica je temeljna gradbena in dejavna enota živih bitij. Njeno zunanost in notranost ločuje tanka plast, imenovana celična membrana, skozi katero prehajajo snovi v celico in iz nje. Celično membrano primarno sestavljajo molekule fosfolipidov, ki so organizirane v dvojno plast [1], v sami membrani pa najdemo veliko različnih makromolekul, od različnih beljakovinskih molekul in holesterola do drugih biološko pomembnih gradnikov (slika 1).

Najpomembnejši nalogi membrane sta zaščita notranjosti celice pred zunanjimi vplivi in kontroliran prenos snovi v celico in iz nje. Struktura membrane tako določa specifične funkcije delovanja celice. Tudi v notranjosti celice najdemo podobno zgradbo membran, ki delujejo kot ločnice med dvema področjema (npr. membrane, ki obdajajo celične organele) [2].

Preučevanje lastnosti celične membrane na modelu živih celic predstavlja izziv, saj so lastnosti in delovanje membrane pogojeni s številnimi celičnimi mehanizmi in zapleteno biološko zgradbo. Zaradi tega se v raziskavah pogosto uporabljajo poenostavljeni modeli celic. Priljubljen nadomestek celic so liposomi ali orjaški enoplastni vezikli GUV (angl. *giant unilamellar vesicles*) velikosti od 1–200 µm. Sestavlja jih dvojna plast fosfolipidov, ki se pod vplivom hidrofobnih interakcij v vodni raztopini



Slika 1: Celična membrana je kompleksna struktura, katere osnovni gradnik je fosfolipidna dvojna plast. Rdeče obarvani plasti sta sestavljeni iz množice polarnih glav fosfolipidov, medtem ko rumeno obarvan pas predstavlja nepolarne repe fosfolipidnih molekul. Povzeto po [3].

začnejo združevati v lipidne dvojne sloje [4, 5, 6, 7]. Zaradi ustrezne velikosti jih lahko neposredno opazujemo pod svetlobnim faznokontrastnim mikroskopom. Običajno raziskovalci vezikel ali manjšo skupino osamijo, jo izpostavijo spremembi okolice in skozi daljše časovno obdobje spremljajo spremembe [8, 9, 10].

Za pripravo orjaških unilamelarnih (enoplastnih) fosfolipidnih veziklov uporabljamo več metod, kot so hidracija lipidnega filma, elektroformacija, emulgiranje lipidov, mikrofluidne metode (usmerjanje hidrodinamičnega toka) in druge [11]. Natančnejši pregled metod priprave veziklov opisujejo Walde in sodelavci [12].

Elektroformacija je v laboratoriju najpogostejše uporabljen postopek priprave veziklov iz fosfolipidnih komponent, saj je hiter (v povprečju 1–3 ure) in učinkovit. V znanstveni literaturi sta metodo prvič opisala Angelova in Dimitrov leta 1986 [13]. Predlagani postopek elektroformacije se izvede tako, da se na platinasti elektrodi nanese lipidno raztopino. Ko topilo izhlapi, se na elektrodah tvori lipidni film. Elektrodi se preneseta v vodno raztopino sladkorja ali soli, izmenično električno polje med elektrodama pa spodbudi in pospeši proces tvorjenja lipidnih veziklov.

Kot vir izmenične napetosti sinusne oblike se najpogostejše uporablja funkcijski generator. Elektroformiranje veziklov poteka v šibkem električnem polju (< 100 V/m), ki ga pri majhni razdalji med elektrodama dobimo že pri nizkih napetostih (1–5 V) in se harmonično spreminja s frekvencami 1–10 Hz, zato lahko za postopek uporabimo preprostejše, cenejše in manjše naprave. V prispevku bomo predstavili pristop zamenjave funkcijskega genera-

torja z mikrokrmilnikom in uporabo filtriranega pulzno-širinsko moduliranega (PWM, angl. *pulse-width modulation*) digitalnega izhoda. Tako je lahko celoten protokol za elektroformacijo zapisan v pomnilniku mikrokrmilnika in ga sprožimo s pritiskom na gumb, brez potrebe po nastavljanju vira.

Ključni del študije zajema izdelavo prototipa izmeničnega generatorja in končno verifikacijo delovanja naprave. Vezje smo zgradili okoli odprtokodnega mikrokrmilniškega sistema Arduino. Vezje in programsko kodo smo objavili pod odprtokodno licenco MIT. Z namenom da je končni izdelek majhen in tako prenosljiv, preprost za uporabo ter se v celoti napaja prek vodila USB, smo uporabili le lahko dobavljive in cenovno ugodne elektronske komponente. Dokumentacija za izdelavo izmeničnega vira za elektroformacijo je na voljo na strani GitHub [14].

2 Protokol elektroformacije veziklov

Protokol za pripravo enoplastnih orjaških veziklov določimo vnaprej, da dosežemo ponovljivost rezultatov eksperimentalnega dela. V tem razdelku se bomo omejili le na del protokola, ki je neposredno povezan z virom električne napetosti med elektrodama, neodvisno od izbire lipidov, raztopin, tipa elektrod in drugih dejavnikov.

Osnovni protokol postopka elektroformacije zajema tri faze. V prvi fazi med elektrodama postopoma povečujemo amplitudo električne poljske jakosti do največje vrednosti (tipično $E_{\max} < 100 \text{ V/m}$). Tej fazi sledi opcijska faza nabrekanja veziklov, kjer določen časovni interval vzdržujemo amplitudo poljske jakosti na največji vrednosti. Sledi zadnja faza, kjer praviloma zmanjšamo frekvenco in vzpodbudimo, da se fosfolipidna dvojna plast sklene v sferične vezikle [15]. Oblika elektrod, predvsem pa njuna medsebojna razdalja, sta pomembna dejavnika, ki določata napetost generatorja, da je dosežena pravilna električna poljska jakost v raztopini. Napetost med elektrodama, frekvenca in čas trajanja posamezne faze skupno lahko vplivajo na velikost in mehanske lastnosti nastalih veziklov [16].

Delovni protokol lahko ustrezno spremenimo tudi ob dodatku ali zamenjavi različnih reagentov, kot na primer uporaba raztopine soli namesto sladkorja [15]. V aplikativnih študijah ponavadi prvi delovni fazi združimo v eno [17].

V rutinskih laboratorijskih poskusih proces elektroformacije najpogosteje izvajamo v vodnih raztopinah glukoze. V nadaljevanju sledimo ključnim korakom, ki so jih opisali Stein in sodelavci [8]. Platinasti žični elektrodi premera $\approx 2 \text{ mm}$ sta na medsebojni razdalji 5 mm. Delovni parametri sistema elektroformiranja veziklov so zajeti tudi v tabeli 1.

Postopno zmanjševanje frekvence in napetosti električnega polja povzroči, da se nabrekli lipidni vezikli počasi odlepijo od površine elektrod in ostanejo prosto plavajoči v raztopini.

3 Opis vezja generatorja

Z uporabo mikrokrmilniške platforme Arduino Uno smo generirali PWM signal s frekvenco 31,4 kHz. Delovno

Tabela 1: Parametri napetostnega vira.

Časovni interval [min]	Napetost [V _{pp}]	Frekvenca [Hz]
120	10,0	5,0
15	5,0	2,5
15	2,5	2,5
15	1,0	1,0

razmerje posameznega cikla je bilo določeno na podlagi predhodno izračunane tabele sinusnih vrednosti. Signal smo filtrirali z nizkoprepustnim filtrom prvega reda, ki je utišal frekvence nad 150 Hz, da smo dobili želeni sinusni signal.

Izhod nizkoprepustnega filtra je povezan z neinvertirajočim vhodom operacijskega ojačevalnika, ki smo mu nastavili ojačanje za faktor 2. Uporabljen operacijski ojačevalnik LM358 podjetja Texas Instruments ima v DIP-8 ohišju dve enoti. Drugo enoto smo uporabili kot invertirajoči operacijski ojačevalnik. S potenciometrom RV1 smo nastavili ojačanje na faktor 2,5; s potenciometrom RV2 pa smo nastavili offset napetost operacijskega ojačevalnika, da ga signal ni spravil v nasičenje.

Zaradi enojnega napajanja operacijskega ojačevalnika smo priklop elektrod izvedli diferencialno med izhodoma obeh operacijskih ojačevalnikov.

Kalibracijo smo izvedli z osciloskopom. Najprej smo nastavili ojačanje s potenciometrom RV1 tako, da smo pri nastavljeni največji amplitudi izhoda mikrokrmilnika dobili med izhodnima sponkami napetost vršne vrednosti 10 V_{pp}, sledilo je izničenje enosmerne komponente napetosti s potenciometrom RV2.

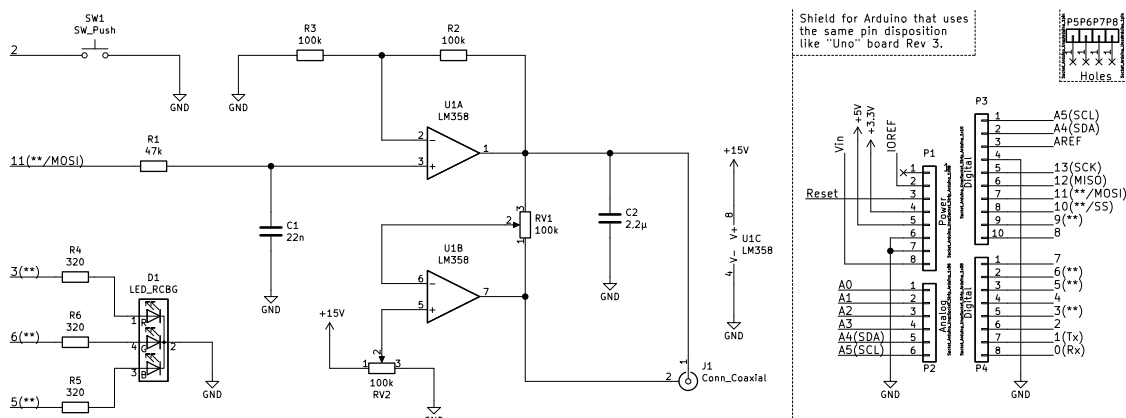
Operacijski ojačevalnik smo napajali z napetostjo 15 V, ki smo jo iz napajalne napetosti mikrokontrolniškega sistema Arduino dobili s preklopnim pretvornikom navzgor (angl. *boost converter*). Uporabili smo modul na osnovi konverterja SX1308 proizvajalca Sunrom.

Največja dopustna frekvenca na izhodu je omejena na približno 150 Hz, napetost na 10 V_{pp}. Tokovna zmogljivost izhoda je omejena s karakteristiko izbranega operacijskega ojačevalnika in je $\approx 40 \text{ mA}$, kar pri visokoohm-skem bremenu, ki ga predstavlja viala z elektrodama in raztopino, ne predstavlja praktičnega problema (slika 2).

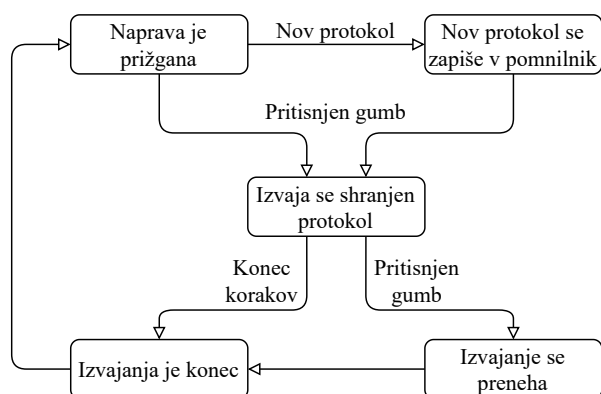
4 Potek izvajanja programske kode

Na napravi so v električno izbrisljivem programirljivem bralnem pomnilniku EEPROM (angl. *electrically erasable programmable read-only memory*) shranjeni parametri za izvedbo protokola priprave veziklov (tabela 1). Po vklopu naprave se barvna svetleča dioda prižge in obarva svetlo modro.

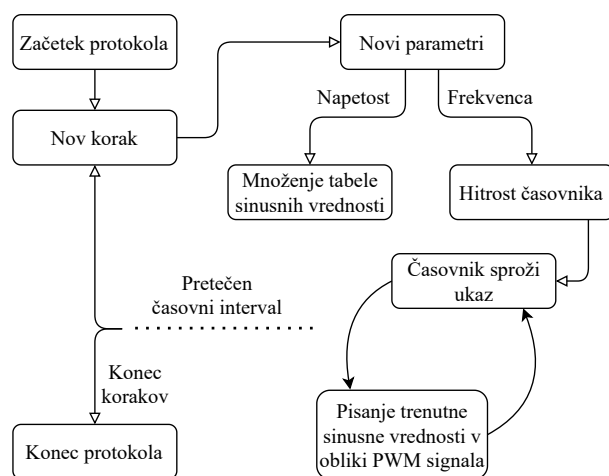
S pritiskom na gumb se prične izvajati shranjen protokol, dioda pa se obarva vijolično. Ko se protokol zaključi, se dioda obarva zeleno. Izvajanje protokola lahko med delovanjem prekinemo s pritiskom na gumb, pri čemer se dioda obarva rdeče. Diagram poteka delovanja naprave je predstavljen na sliki 3.



Slika 2: Shema električnega vezja.



Slika 3: Diagram poteka delovanja generatorja napetosti.



Slika 4: Diagram poteka izvajanja protokola elektroformacije.

V pomnilniku naprave je vedno shranjen zadnji uporabljen protokol, ki ga lahko spremenimo s priklopom naprave prek vodila USB na računalnik in uporabo aplikacije, razvite v programskem jeziku Python. Naprava sprejema novo navodilo za izvajanje protokola prek serijskih vrat pri hitrosti 115 200 Bd. Navodilo sestavljajo z vejico ločeni parametri električnega polja, posamezne korake pa med seboj ločuje podpičje. Začetek in konec navodila omejujeta znaka "<" in ">". Ko ga naprava sprejme, star protokol prepíše z novim, dioda pa se obarva temno modro. Shematski prikaz izvajanja protokola elektroformacije je predstavljen na sliki 4.

5 Rezultati in zaključek

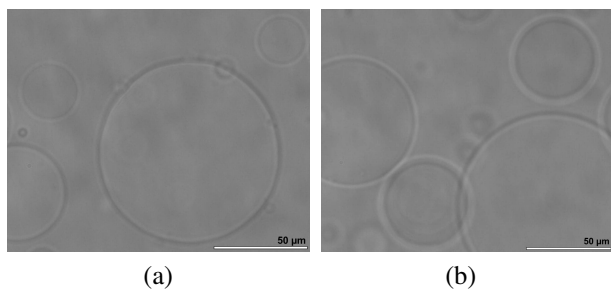
Harmonični vir napetosti smo preizkusili v laboratoriju, kjer smo sledili navodilom za pripravo po literaturi [8]. Orjaške fosfolipidne vezikle smo z elektroformacijo najprej pripravili iz sintetičnega lipida POPC (1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfoholina) in nato še iz njegove mešanice s holesterolom (proizvajalec obeh: Avanti Polar Lipids). Na vsako platinasto žično elektrodo smo s polzenjem kapljice nanесли 20 μ L omenjenega lipida razredčenega v mešanici kloroforma in metanola v volumskem razmerju 2:1 na koncentracijo 1 mg/mL. Nanos na elektrodah smo 45 minut sušili v eksikatorju pri konstantnem vakumu. Po sušenju smo elektrodi vstavili v 2 mL

plastično vialo z 1,8 mL 0,3 M raztopine saharoze.

Elektrodi smo priključili na sponki harmoničnega vira napetosti ter sprožili program po protokolu, opisanem v razdelku 2. Po skupno 165 minutah smo odklopili elektrodi in vsebino vialo previdno prenesli v 3,60 mL 0,3 M glukoze (vol. razmerje saharoze in glukoze v končni mešanici je znašalo 1:2). Po 200 μ L suspenzije smo odpipeptirali v eksperimentalne kamrice (proizvajalec Grace Bio-Labs), ki omogočajo kvantitativno analizo polj in enakomeren zajem slike pod mikroskopom. Kamrice smo postavili pod mikroskop in počakali 30 minut, da se je vsebina posedla na dno. Pregled s svetlobnim mikroskopom (Nikon Eclipse TE2000-S) smo opravili s pomočjo imerzijskega olja pri 100-kratni povečavi.

Predstavnika orjaških fosfolipidnih veziklov obeh formacij smo zajeli z mikroskopsko kamero (model UI-3280CP proizvajalca IDS Imaging). Na sliki 5a je predstavljen vezikel, katerega membrana sestavlja le fosfolipid POPC brez dodanega holesterola, medtem ko je na 5b skupek veziklov, katerih membrane vsebujejo njuno mešanico. Zaradi dodatka holesterola je membrana tudi nekoliko debelejša, kar mikroskopija lepo poudari.

Količini nastalih veziklov v obeh primerih formacije sta bili primerljivi s količinama, pridobljenima z uporabo



Slika 5: Posnetek orjaških fosfolipidnih veziklov pri 100-kratni povečavi. Na slikah so membrane s fosfolipidi POPC brez (a) in z dodanim holesterolom v razmerju 1:4 (b).

komercialnega funkcijskega generatorja. Postopek elektroformacije ne zahteva natančne sinusne oblike signala, zato je konstrukcija signala z uporabo modulacije PWM zadovoljiva. Protokoli, ki jih zasledimo v literaturi celo navajajo druge oblike signalov. Méléard v preglednem članku [15] omenja uporabo izmeničnega vira pravokotne ali sinusne oblike, pri posebnih pogojih pa določeni avtorji (npr. [18]) uporabljajo protokole, ki kombinirajo oba signala – tako sinusne kot tudi pravokotne oblike.

Predstavljen generator sinusne napetosti nastavlja amplitude in frekvence predstavlja mobilno ter cenovno ugodno rešitev za elektroformacijo orjaških fosfolipidnih veziklov. Dodatna prednost je popolna avtomatizacija postopka elektroformacije in enostavna uporaba generatorja, saj so koraki protokola zapisani v pomnilniku ter se po vrsti samodejno izvajajo, zato naprave med izvajanjem protokola ni potrebno dodatno nastavljanje. Generator ne potrebuje dodatnega električnega napajanja, saj lahko za njegovo delovanje uporabimo kar računalniški izhod USB. Dodatna prednost povezave z računalnikom je tudi možnost implementacije komuniciranja z računalnikom in obveščanja prek internetne povezave o samem stanju izvajanja protokola. Z namenom širše uporabe generatorja smo načrt in programsko kodo objavili pod odprtokodno licenco MIT.

Literatura

- [1] G. Cevc and D. Marsh, *Phospholipid bilayers: physical principles and models*. Wiley, 1987.
- [2] Ü. Coskun and K. Simons, “Cell membranes: the lipid perspective,” *Structure*, vol. 19, no. 11, pp. 1543–1548, 2011.
- [3] Wikipedia contributors, “Celična membrana – Wikipedia, the free encyclopedia.” https://sl.wikipedia.org/wiki/Celična_membrana, 2021. [Na spletu; dostopano 20. julij 2021].
- [4] U. Seifert, “Configurations of fluid membranes and vesicles,” *Adv. Phys.*, vol. 46, no. 1, pp. 13–137, 1997.
- [5] S. A. Safran, “Curvature elasticity of thin films,” *Adv. Phys.*, vol. 48, no. 4, pp. 395–448, 1999.
- [6] J. F. Nagle, “Introductory lecture: Basic quantities in model biomembranes,” *Faraday Discuss.*, vol. 161, pp. 11–29, 2013.
- [7] R. Dimova, “Recent developments in the field of bending rigidity measurements on membranes,” *Adv. Coll. Interf. Sci.*, vol. 208, pp. 225–234, 2014.
- [8] H. Stein, S. Spindler, N. Bonakdar, C. Wang, and V. Sandoghdar, “Production of isolated giant unilamellar vesicles under high salt concentrations,” *Frontiers in physiology*, vol. 8, p. 63, 2017.
- [9] J. Zupanc and D. Drobne, “Populacije orjaških lipidnih veziklov kot model za studij bio-nano interakcij/giant lipid vesicle populations as a model for bio-nano interaction studies,” in *Informatica Medica Slovenica*, vol. 16, p. 1, Slovenian Medical Informatics Association (SIMIA), 2011.
- [10] S. Penič, L. Mesarec, M. Fošnarič, L. Mrówczyńska, H. Hägerstrand, V. Kralj-Iglič, and A. Iglič, “Budding and fission of membrane vesicles: A mini review,” *Frontiers in Physics*, vol. 8, p. 342, 2020.
- [11] V. Pereno, D. Carugo, L. Bau, E. Sezgin, J. Bernardino de la Serna, C. Eggeling, and E. Stride, “Electroformation of giant unilamellar vesicles on stainless steel electrodes,” *ACS Omega*, vol. 2, no. 3, pp. 994–1002, 2017.
- [12] P. Walde, K. Cosentino, H. Engel, and P. Stano, “Giant vesicles: preparations and applications,” *ChemBioChem*, vol. 11, no. 7, pp. 848–865, 2010.
- [13] M. I. Angelova and D. S. Dimitrov, “Liposome electroformation,” *Faraday discussions of the Chemical Society*, vol. 81, pp. 303–311, 1986.
- [14] “Repozitorij na strani GitHub.” <https://github.com/umalavasic/electroformation>.
- [15] P. Méléard, L. A. Bagatolli, and T. Pott, “Giant unilamellar vesicle electroformation: From lipid mixtures to native membranes under physiological conditions,” *Methods in enzymology*, vol. 465, pp. 161–176, 2009.
- [16] D. Drabik, J. Doskocz, and M. Przybyło, “Effects of electroformation protocol parameters on quality of homogeneous guv populations,” *Chemistry and physics of lipids*, vol. 212, pp. 88–95, 2018.
- [17] P. Santhosh, J. Genova, A. Iglic, V. Kralj-Iglic, and N. P. Ulrih, “Influence of cholesterol on bilayer fluidity and size distribution of liposomes,” *Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences*, vol. 73, no. 7, 2020.
- [18] M. Breton, M. Amirkavei, and L. M. Mir, “Optimization of the electroformation of giant unilamellar vesicles (guvs) with unsaturated phospholipids,” *The journal of membrane biology*, vol. 248, no. 5, pp. 827–835, 2015.