

Razvoj avtonomnega sistema za merjenje električnih lastnosti ravninskih lipidnih dvoslojev

Jaša Montani, Peter Kramar

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za elektrotehniko, Tržaška 25, Ljubljana
E-pošta: peter.kramar@fe.uni-lj.si

Development of an autonomous system for measuring electrical properties of planar lipid bilayers

Abstract. Lipid molecules are an essential part of cell membranes. Studying the properties of lipid bilayers as models of cell membrane is important in electroporation research. Planar lipid bilayers are electrically accessible from both sides and can be represented as a resistor and a capacitor wired in parallel. That makes them appropriate for studying electrical properties. Constructing planar lipid bilayers and taking measurements manually is a time consuming exercise. Therefore, we developed an autonomous automated system, which constructs the bilayer, takes measurements and stores them for further analysis in a hands free manner. We introduced programmable syringe pumps in the place of manual operation of syringes. Planar lipid bilayer is built in a Teflon chamber using Montal-Muller method. Furthermore we develop circuitry for measuring voltage and current over the planar lipid bilayer using the technique of voltage clamping and we develop a modular user interface in MATLAB based on SCPI standard, which enables researchers to create custom measuring protocols, store measurements and/or track the data in real time.

1 Uvod

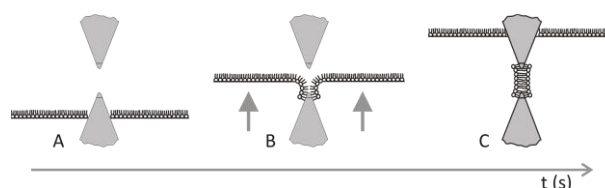
V naravi so lipidne molekule poglavni del celične membrane tako živalskih kot rastlinskih celic. Celična membrana in membrane celičnih organelov so v večini sestavljene iz lipidnih dvoslojev, ki vsebujejo tudi proteinske molekule. Izpostavitve celice električnemu polju ustrezne jakosti in trajanja povzroči povečano prepustnost celične membrane. Ta pojav imenujemo elektroporacija. Elektroporacijo se danes rutinsko uporablja v biomedicini in biotehnologiji [1]. Opravljene raziskave nakazujejo, da se spremembe v membrani – pore zaradi vsiljenega električnega polja pojavijo v lipidnih predelih celične membrane.

Ravninski lipidni dvosloj si lahko predstavimo kot infinitezimalno majhen košček membrane. Njegova poglavna prednost je, da je električno dostopen iz obeh strani in da lahko njegovo kemično sestavo izbiramo poljubno in s tem preučujemo vpliv posameznih molekul. Električno ravninski lipidni dvosloj predstavimo kot vzporedno vezan upor in kondenzator [2].

Ravninske lipidne dvosloje pripravimo v posebni komori, ki je sestavljena iz dveh prekatov. Med prekatoma je teflonska folija, ki vsebuje majhno luknjico

s premerom od 0,1 do 1 mm. Na luknjico napnemo ravninski lipidni dvosloj z metodo barvanja ali dvigovanja gladine [3,4].

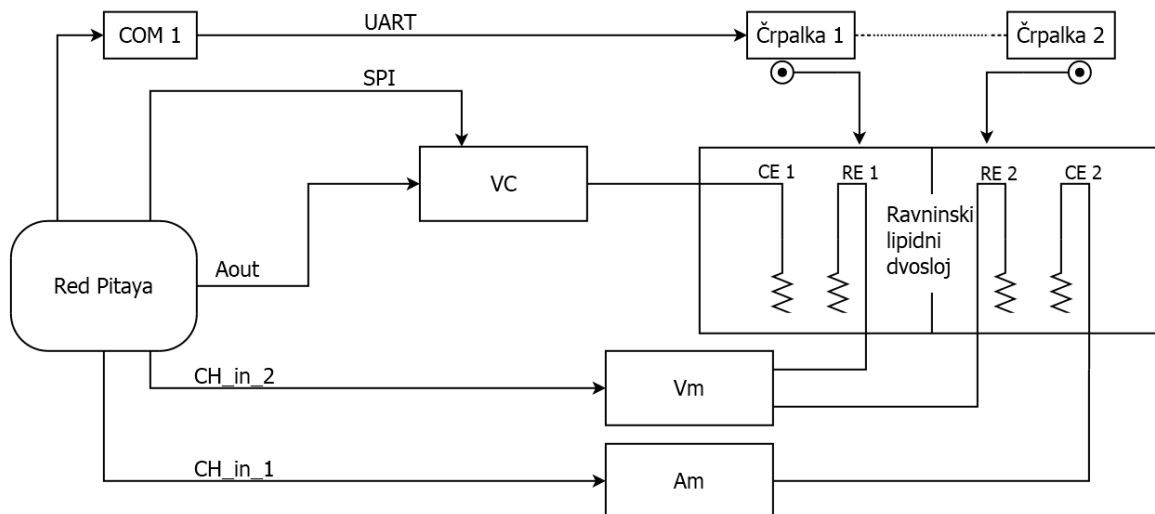
Metoda dvigovanja gladine (ang. *folding bilayer*) oziroma Montal – Mullerjeva metoda je ena od najpogosteje uporabljenih metod za tvorjenje ravninskih lipidnih dvoslojev pri preučevanju elektroporacije. Pod nivojem teflonske folije napolnimo oba prekata z vodno raztopino soli. Lipide naneseemo na gladino raztopine v obeh prekatih in počakamo, da se enakomerno porazdelijo po gladini (slika 1A). Nato istočasno dvignemo gladino v obeh prekatih nad luknjico (slika 1B). Lipidni dvosloj nastane na luknjici v teflonski foliji, ki je sedaj potopljena v tekočini (slika 1C). Prednost te metode je v tem, da lahko s spuščanjem in dviganjem gladine raztopine tvorimo lipidne dvosloje enega za drugim, brez daljšega čakanja.



Slika 1: Metoda Montal-Muller za tvorjenje ravninskih lipidnih dvoslojev. A) Na gladino raztopine naneseemo lipidne molekule in počakamo, da se razporedijo. B) Dvignemo nivo raztopine preko luknjice v teflonski foliji. C) Zgradimo ravninski lipidni dvosloj.

Ravninski lipidni dvosloj z makroskopskega vidika opišemo z lastnostmi, kot so: kapacitivnost, debelina, upornost oziroma prevodnost in porušitvena napetost. Vsaka izmed teh lastnosti potrebuje svoj princip merjenja. Meritve omenjenih lastnosti večinoma temeljijo na tokovnem oziroma napetostnem vzbujujanju ravninskega lipidnega dvosloja in merjenju njegovega napetostnega oziroma tokovnega odziva [5].

Postopki priprave lipida so časovno in tehnično zahtevni. Po postavitvi ravninskega lipidnega dvosloja preverimo ali smo ravninski lipidni dvosloj zgradili z merjenjem toka ob vzbujujanju s 100 μ s pulzom amplitude 100 mV. Če je tok zanemarljivo majhen, izmerimo kapacitivnost po metodi razelektritve pulza ter ocenimo kvaliteto zgrajenega lipidnega dvosloja. Za tem ravninski lipidni dvosloj lahko preučujemo na različne načine, merimo njegovo upornost in kapacitivnost skozi čas z impedančno metodo ali pa uporabimo linearno naraščajoč signal, da ravninski lipidni dvosloj porušimo



Slika 2: Prikaz povezav med elementi sistema. Osrčje sistema je razvojna platforma Red Pitaya. Komora za tvorjenje lipida vsebuje 4 Ag-AgCl elektrode. Elektrodi RE1 in RE2 merita napetost preko ravninskega lipidnega dvosloja. Elektrodi CE1 in CE2 uporabimo za napetostno vzburjanje (ang: *voltage clamp*, na sliki: VC) ter posredno merjenje toka preko ravninskega lipidnega dvosloja. V vsako polovico komore je povezana svoja črpalka, ki skrbi za dvigovanje in spuščanje gladine pri tvorjenju ravninskega lipidnega dvosloja po metodi Montal-Muller.

in izmerimo porušitveno napetost [6]. Poizkusi so lahko zelo zamudni saj trajajo tudi po več ur ali cel dan.

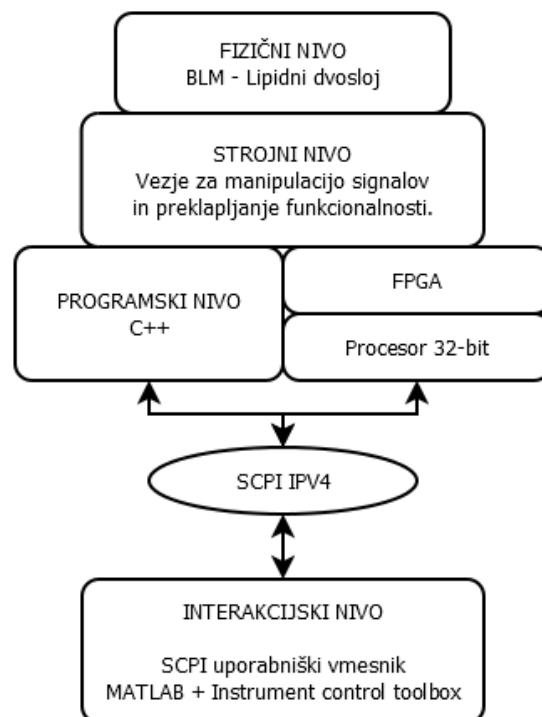
Namen študije je razvoj avtonomnega merilnega sistema, ki poenostavlja, avtomatizira postopke gradnje ravninskega lipidnega dvosloja in merjenja električnih lastnosti (slika 2).

2 Sistem za avtonomno merjenje električnih lastnosti ravninskega lipidnega dvosloja

Sistem je zastavljen več nivojsko (slika 3). Fizični nivo predstavlja sam ravninski lipidni dvosloj. Nad fizičnim nivojem je strojni nivo, ki predstavlja vezje za manipulacijo signalov in preklapljanje funkcionalnosti, kjer se nahajajo ojačevalniki in atenuatorji vzbujalnih signalov ter vezji za merjenje toka in napetosti. V srcu sistema je programski nivo z razvojno platformo Red Pitaya z 32-bitnim procesorjem DUAL CORE ARM CORTEX A9 in FPGA vezjem Xilinx Zynq 7010 SOC. Red Pitaya omogoča direktno izvajanje programskih skript preko SSH terminala ali pa lahko na njej postavimo SCPI IPv4 strežnik, do katerega nato lahko dostopamo iz oddaljene naprave.

Prav to lastnost izkorišča interakcijski nivo, ki predstavlja dejanski uporabniški vmesnik, namenjen končnim uporabnikom. Uporabnik s sistemom upravlja preko orodja MATLAB in dodatnega paketa Instrument Control Toolbox, za katerega smo izdelali enostaven uporabniški vmesnik na podlagi standardnih ukazov za krmiljenje programirljivih instrumentov – SCPI (ang: *Standard Commands for Programmable Instruments*). Prednost tovrstnega uporabniškega vmesnika je v

možnosti, da uporabnik lahko sam sestavi protokol merjenja iz osnovnih funkcionalnosti.



Slika 3: Shematski prikaz nivojev sistema.

2.1 Avtonomno tvorjenje ravninskega lipidnega dvosloja

Ravninski lipidni dvosloj tvorimo po metodi dviganja in spuščanja gladine z uporabo dveh neodvisnih laboratorijskih injekcijskih črpalk WPI ALADDIN-1000. Črpalke krmilimo preko RS-232 povezave po protokolu UART. Prečrpani volumen in hitrost črpanja črpalk sta programsko nastavljiva na C++ nivoju in sta trenutno nastavljeni na 1 ml s hitrostjo 1 ml/min. Uporabili smo injekcije volumna 5 ml.

2.2 Napetostno vzbujanje ravninskega lipidnega dvosloja

Lastnosti ravninskega lipidnega dvosloja merimo z metodo napetostnega vzbujanja (ang: *voltage clamp*), kjer ravninski lipidni dvosloj vzbujamo s poljubno napetostjo in merimo tok preko ravninskega lipidnega dvosloja.

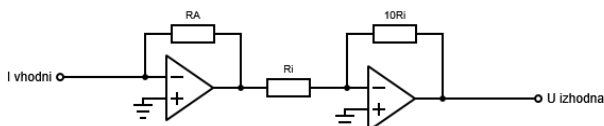
Sistem omogoča, da si uporabnik izbere amplitudo vzbujalnega napetostnega signala ter njegovo obliko (pravokotni impulz, rampa, sinusni signal). Signal na izhodu digitalno-analognega pretvornika Red Pitaya ima amplitudo ± 1 V. Ker potrebujemo amplitude od ± 50 mV do ± 5 V signal primerno ojačamo oziroma slabimo. V ta namen smo izdelali dodatno vezje z ojačevalnikom in atenuatorjem, ki omogočata napetostno slabljenje oz. ojačenje izbranega signala.

Med ojačenjem in atenuacijo izbiramo digitalno s CMOS stikalom MAX333ACUP. Vrednost ojačenja ali atenuacije nastavimo z dvema digitalnima potenciometroma, integriranimi v vezju AD5262BRU2.

Potenciometer ima razpon od 60Ω do $20 \text{ k}\Omega$. Omogoča 256 različnih vrednosti s korakom 78Ω . Krmilimo ga z 9-bitnim ukazom preko SPI vodila. Ukaz pošljemo v obliki dveh 8-bitnih besed, kjer prvih 7 bitov nastavimo na 0, čemur sledi naslovni bit za izbiro enega od dveh potenciometrov, temu sledi 8 bitov s številsko vrednostjo, ki odgovarja željeni upornosti. Pretvorbo med upornostjo in zahtevano številsko vrednostjo za nastavljanje potenciometra izvedemo v C++ programskem nivoju.

2.3 Merjenje toka in napetosti

Tok preko lipidnega dvosloja merimo posredno s sklopom dveh operacijskih ojačevalnikov in. Prva stopnja je tokovno napetostni pretvornik in uporablja ojačevalnik LMP7721, druga stopnja z ojačevalnikom OPA627 obrača fazo za 180° in vhodni signal deli z 10 (slika 4).



Slika 4: Vezava ampermetra. Z digitalno izbiro upora R_A izberemo želeno območje merjenja toka (tabela 1). V drugi stopnji merilnika signal fazno obrnemo, upora R_i in $10R_i$ sta v razmerju 1:10. S tem napetostni signal delimo z 10, da ne bi prišli v nasičenje operacijskih ojačevalnikov.

Z uporom R_A na prvi stopnji dosežemo različna območja merjenja toka (tabela 1). Izbiro izvedemo z izbirnikom 74HC4051D v C++ programskem nivoju.

Tabela 1: Območje merjenja toka v odvisnosti od izbrane upornosti R_A .

R_A [Ω]	Tok [A]
10 k	500 μ
10 k	50 μ
1 M	5 μ
10 M	500 n
100 M	50 n
1 G	5 n
10 G	500 p

Pravilno upornost določimo algoritemsko na programskem nivoju. Iz odčitane napetosti na izhodu druge stopnje in znanih upornosti R_i nato v programskem nivoju izračunamo vrednost toka.

Napetost na lipidnem dvosloju odčitamo neposredno preko elektrod RE1 in RE2 (slika 2) z integriranim instrumentacijskim ojačevalnikom AD8250ARMZ.

Red Pitaya omogoča nastavljanje frekvence vzorčenja merjenih signalov na 6 različnih vrednosti: 125 MSps, 15,62 MSps, 1,953 MSps, 122,070 kSps, 15,258 kSps ter 1,907 kSps. Celoten sistem Red Pitaya -> IPv4 -> MATLAB ima maksimalno uporabljeno frekvenco vzorčenja 15,62 MSps.

3 Krmiljenje sistema

Ciljni uporabnik našega sistema je raziskovalec v laboratoriju. Ročno izvajanje poskusov na ravninskih lipidnih dvoslojih je zamudno. Preko uporabniškega vmesnika, ki smo ga razvili, ima uporabnik možnost krmiliti sistem z orodjem MATLAB in standardnimi ukazi SCPI, kar omogoča hitrejše in avtomatizirano tvorjenje ravninskega lipidnega dvosloja, samodejno shranjevanje izmerjenih vrednosti in spremljanje meritev v realnem času. Na ta račun smo povečali časovno učinkovitost meritev, njihovo primerljivost ter zmanjšali čas, ki ga raziskovalec porabi za pripravo in izvedbo poizkusa.

3.1 Format ukazov SCPI

Standard SCPI (ang: *Standard Commands for Programmable Instruments*) je definiran kot dodatek k standardu IEEE 488.2-1987. Določa sintakso ukazov za krmiljenje programirljivih instrumentov. Prvič je bil predstavljen leta 1990.

SCPI ukazi so lahko bodisi nastavitve (*set*), bodisi povpraševanja (*query*). V prvem primeru nastavimo določeno lastnost instrumenta (npr.: izberemo obliko ter amplitudo vzbujalnega signala, nastavimo območje merjenja, pošljemo signale, ...), v drugem pa iz instrumenta preberemo številsko vrednost (npr.: odčitamo izmerjeno napetost in tok).

Medsebojno podobni in povezani ukazi so velikokrat organizirani v drevesno strukturo. Med posameznimi besedami v ukazu je dvopičje. Ukazi za povpraševanje se zaključijo z vprašajem.

3.2 SCPI paradigma na Red Pitayi

Red Pitaya ima že izdelan sistem SCPI ukazov, ki krmilijo osnovne funkcije sistema, kot so prižiganje led diod ali postavljanje digitalnih izhodov. To nam daje iztočnico za razvoj novih ukazov. Cilj je namreč, da bi preko SCPI uporabili tudi funkcije iz C++ programskega nivoja.

Strežniški program, ki izvaja SCPI komunikacijo, `scpi-server`, je del C++ programskega nivoja. Zato je potrebno vse dodatne ukaze za nastavitve dodanih ojačevalnikov ter funkcijska zaporedja napetostnega vzbujanja ter merjenja toka ali napetosti dodati k kodi SCPI strežnika kot nove funkcije. Pri vsaki spremembi na C++ programskem nivoju moramo prevesti program z gcc prevajalnikom Red Pitaje. SCPI strežnik Red Pitaye posebej definirane podatkovne tipe in makre, ki jih moramo pri razvoju funkcij uporabljati.

3.3 SCPI in MATLAB

Za krmiljenje instrumentov iz okolja MATLAB potrebujemo poseben paket t.i. *Instrument control toolbox*. Komunikacija z instrumentom poteka preko LAN omrežja s protokolom IPv4. Komunikacijo vzpostavimo s sledečim delom kode:

```
IP = 'xxx.xxx.xx.xxx';
port = 5000;
tcpipObj=tcpip(IP, port);
fopen(tcpipObj);
tcpipObj.Terminator = 'CR/LF';
```

IP naslov Red Pitaye uporabnik pridobi s pomočjo ukaza `arp -a` in MAC naslova, ki je podan na sami Red Pitayi.

Ukaze za nastavitve pošiljamo s funkcijo `fprintf()`, ukaze za povpraševanja pa s funkcijo `query()`. Primer:

```
fprintf(tcpipObj, 'LBK:TESTPUMP WDR');
txt = query(tcpipObj, 'LBK:ASK1?');
```

S prvim ukazom prožimo črpanje črpalk v smeri iz komore (ang: WDR - withdraw), z drugim pa prebere tekstovno vrednost iz pomnilnika na Red Pitayi.

Vsi ukazi, ki smo jih izdelali se začnejo s končnico LBK. V trenutni različici sistema uporabnik lahko izmeri odziv toka in napetosti na ravninskem lipidnem dvosloju na napetostno vzbujanje s tremi vrstami signalov. Izmeri kapacitivnost ravninskega lipidnega dvosloja in z meritvijo oceni njegov obstoj in kvaliteto. Uporabnik ima na voljo seznam funkcionalnosti, njihove odgovarjajoče SCPI ukaze, možnost izrisa in shranjevanja delnih rezultatov, ter spremljanja meritev v realnem času. S kombiniranjem funkcionalnosti, ki jih omogoča MATLAB (skriptanje, shranjevanje v razne tekstovne in slikovne formate) in SCPI ukazov, ki smo jih razvili, si lahko uporabnik zastavi poljuben protokol merjenja.

4 Diskusija

Sistem smo razširili z avtonomnim tvorjenjem ravninskih lipidnih dvoslojev s pomočjo laboratorijskih injekcijskih črpalk ter vzbujanjem ravninskega lipidnega dvosloja z napetostjo in merjenjem toka in napetosti. Z uporabniškim vmesnikom na podlagi SCPI ukazov in orodja MATLAB smo omogočili razvoj poljubnih merilnih protokolov.

Modularnost sistema omogoča kasnejšim razvijalcem dodajanje novih funkcionalnosti, ki bi jih raziskovalci lahko potrebovali. Zanimiv dodatek bi bili denimo spremljanje temperature, v namen preučevanja temperaturne odvisnosti električnih pojavov na ravninskem lipidnem dvosloju. Morebitne razširitve sistema bomo lahko enostavno vključili v SCPI vmesnik.

V prihodnosti moramo preučiti možnosti, da komunikacijo izvedemo brez uporabe programa MATLAB, saj ni vedno nujno, da je le-ta kot licenčni programski paket tudi dostopen. Red Pitaya omogoča podatkovno povezavo in krmiljenje preko SSH (ang: *Secure Shell*) iz brskalnika, kar pa omogoča le izvajanje programov na Red Pitayi in ne omogoča uporabe SCPI. Ena or možnosti je tudi uporaba programskega jezika Python, vendar pa bomo morali v prihodnosti sprogramirati funkcije za krmiljenje sistema za merjenje lastnosti ravninskih lipidnih dvoslojev.

Zahvala

Raziskovalni program št. P2-0249 je sofinancirala Javna agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije iz državnega proračuna.

Literatura

Napaka! Vira sklicevanja ni bilo mogoče najti. Miklavčič, Damijan (ed), Springer International Publishing 2017, **Handbook of electroporation – chapter 1** (pp 1 - 259)

[2] Kotnik T, Kramar P, Pucihar G, Miklavčič D, Tarek M. **Cell membrane electroporation – Part 1: The phenomenon.**

IEEE Electr. Insul. M. 28(5): 14-23, 2012.

[3] P. Mueller, D.O. Rudin, H.T. Tien, W.C. Wescott, **Methods for the formation of single bimolecular lipid membranes in aqueous solution**, J. Phys. Chem. 67 (1963) 534–535.

[4] Montal M, Mueller P., **Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and study of their electrical properties**, Proc Natl Acad Sci U S A. 1972 Dec;69(12):3561-6

[5] Kramar P, Miklavčič D, Kotulska M, Maček-Lebar A. **Voltage- and current-clamp methods for determination of planar lipid bilayer properties.** In Iglic A (ed.), *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*, Volume 11, Elsevier, Amsterdam, 2010, pp. 29-69.

[6] Sabotin I, Maček Lebar A, Miklavčič D, Kramar P. **Measurement protocol for planar lipid bilayer viscoelastic properties.** IEEE T. Dielect. El. Insul. 15: 1236-1242, 2009.