بیستمین کنفرانس اپتیک و فوتونیک ایران
و ششمین کنفرانس مهندسی و فناوری فوتونیک ایران
۸ تا ۱۰ بهمن ماه۱۳۹۲ - دانشگاه صنعتی شیراز

Downloaded from opsi.ir at 7:52 +0330 on Thursday November 15th 2018

ساخت آبدانک‌های کروی به روش الکتروفرمیشن و بررسی فرایند برون رانی و بیگانه خواری غشا با استفاده از انبرک نوری

سجاد میدانلو [۱]، رسول حق‌جو[۱]، یونس فرهنگی باروجی[۱] و سید نادر سید ریحانی [۲]

[۱] مرکز تحصیلات تکمیلی در علوم پایه زنجان

[۲] دانشگاه صنعتی شریف

چکیده – در این مقاله مراحل طراحی و ساخت دستگاه الکتروفرمیشن برای تولید آبدانک‌های کروی شکل از مولکول‌های فسفولیپیدی ارائه شده است. خاصیت آبدوستی سر مولکول‌های فسفولیپیدی و آبگریزی دم آن‌ها باعث تشکیل یک سری ساختارهای خوداجتماع این مولکول‌ها در محلول‌های قطبی می‌شود. با اعمال میدان الکتریکی سینوسی متناوب مختلف، فرکانس و ولتاژ بهینه برای تولید آبدانک‌های میکرونی تا چند ده میکرونی کروی شکل بدست آمده است. در مرحله بعدی با استفاده از انبرک نوری ذرات میکرونی را درون این آبدانکها کرده‌ایم که این فرایند بیگانه‌خواری نامیده می‌شود و در سلول‌های زیستی نیروی لازم برای اینکار با استفاده از پروتئین‌ها صورت می‌گیرد.

کلید واژه- آبدانک فسفولیپیدی ، الکتروفرمیشن ، انبرک نوری ، شیشه‌های ITO

Formation of Spherical Vesicles by Electro-formation and considering endocytosis and exocytosis process on them by using optical tweezers

Sajad Meydanloo[۱] , Rasoul Haghjoo[۱], Younes Farhangi Baroji[۱] and Seyed Nader Seyed Reihani [2]

Institute for Advanced Studies in Basic Sciences(IASBS) [۱]

Sharif University of Thechnology [۲]

Abstract- In this paper the designing and fabricating procedure of electro-formation device to produce spherical phospholipid vesicles, is presented. The hydrophobic property of the tail of phospholipid molecules and the hydrophilic head of them form some self-assemble structures in polar solutions. By applying different alternative sinusoidal electrical fields, the optimum frequency and voltage for producing vesicles from a few microns to several ten microns, is obtained. In next step by using optical tweezers, micron size particle was forced inside the vesicle. This process is called endocytosis and in biological cells the force for this process is provided by proteins.

Keywords: Electro-formation, ITO coverslips, Optical tweezers, Phospholipid Vesicles

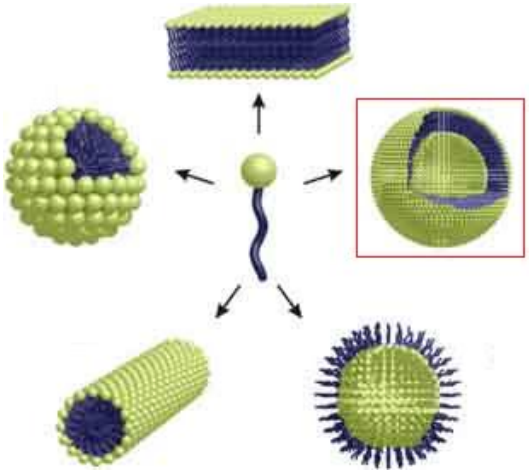
Downloaded from opsi.ir at 7:52 +0330 on Thursday November 15th 2018

۱- مقدمه

الکتروفرمیشن یکی از روش‌های تولید آبدانک-های(vesicles) تک دولایه‌ای کروی شکل از مولکول‌های فسفولیپیدی(phospholipids) می‌باشد. در روش الکتروفرمیشن با اعمال میدان الکتریکی متناوب خارجی می‌توان از این مولکول‌ها ساختارهای کروی شکل دولایه ایجاد کرد که آبدانک نامیده می‌شوند. این میدان متناوب توسط یک خازن با لایه نشانی ITO (indium tin oxide) به مولکول‌های فسفولیپیدی اعمال می‌شود.[۱]

مولکول‌های فسفولیپیدی دارای ساختاری با یک سر قطبی و یک دم غیرقطبی می‌باشند که سر قطبی آن‌ها اصطلاحا آبدوست(hydrophilic) و دم غیر قطبی آبگریز(hydrophobic) می‌باشد. لذا اگر این مولکول‌ها در یک محلول قطبی مثل آب یا سوربیتل (sorbitol) قرار گیرند ، یک سری ساختارهای خوداجتماع با اشکال مختلف تشکیل می‌دهند که شکل این ساختارها به میزان غلظت مولکول‌های فسفولیپیدی در محلول ، نوع آن‌ها و شرایط به کار رفته در روش تولید آن بستگی دارد. شکل ۱ ساختارهای مختلف مولکول‌های لیپیدی را نشان می-دهد که ساختار قرار گرفته در کادر قرمز رنگ آبدانک می‌باشد.[۳,۲] .

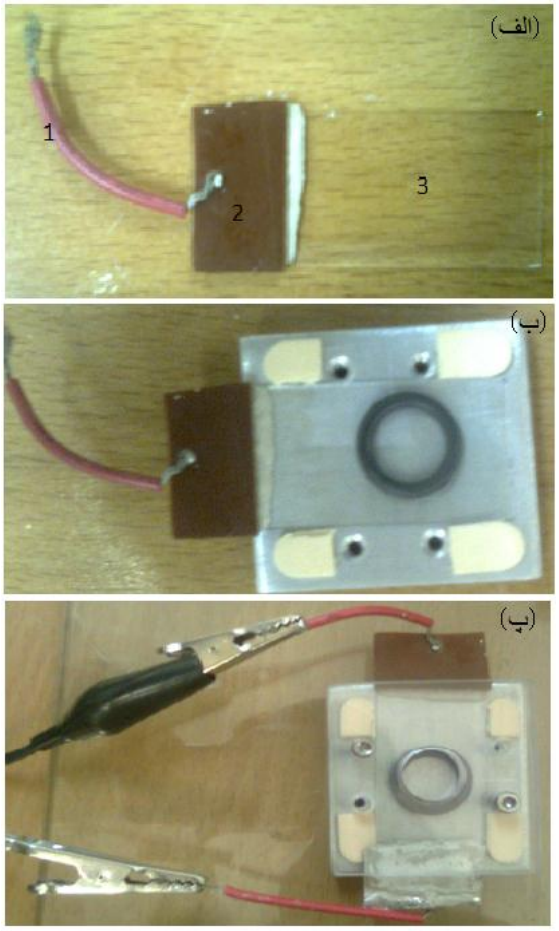
حال می‌توان از انبرک نوری استفاده کرد و غشای این ساختارهای خود اجتماع که مدل سلولی خوبی بشمار می‌آیند دستکاری کرده و خواص آنها را بدست آورد.



شکل ۱: اشکال مختلف ساختارهای خوداجتماع لیپیدی[۲]

۲- ساخت آبدانک

در تولید آبدانک‌ها به روش الکتروفرمیشن ، ابتدا یک لایه نازک مولکول‌های فسفولیپیدی روی سطح صفحات خازن که یک لامل لایه‌نشانی شده با ITO می‌باشد ، لایه‌نشانی می‌شوند.(شکل ۲ الف)[۵,۴]



شکل۲ : الف) صفحه خازن به کار رفته در چیدمان : سیم رسانا (۱) ، فلز رسانای متصل به سیم هادی جریان الکتریکی (۲)، لامل با لایه-نشانی ITO (۳) . ب) صفحه پایینی خازن به کار رفته که بر روی پایه پایینی محفظه نگهدارنده قرار گرفته است. واشر پلاستیکی که چمبر بوده بر روی آن قرار گرفته و محلول داخلش ریخته می‌شود. پ) چمبر قرار گرفته بین صفحات خازن که در محفظه نگهدارنده محکم شده و به منبع ولتاژ وصل شده است.

برای تولید آبدانک‌های تک‌دولایه‌ای ، تمیز بودن سطح شیشه‌ها و نازک بودن لایه فسفولیپیدی مهم می‌باشد.

مولکول‌های فسفولیپیدی به صورت محلول در کلروفرم می‌باشند که یک حلال فرار می‌باشد. در مرحله بعد برای اطمینان از خشک شدن کامل کلروفرم موجود ، سطح لایه‌نشانی شده با یک گاز بی اثر مانند گاز ازت کاملا

Downloaded from opsi.ir at 7:52 +0330 on Thursday November 15th 2018

خشک می‌شود. در مراحل دقیق‌تر ، لامل‌های لایه‌نشانی شده به مدت ۲۰ دقیقه در یک خلا نسبی در حدود ۶۰۰ میلیمترجیوه قرار می‌گیرند تا کاملا خشک شده و کلروفرم آن‌ها تبخیر شود.

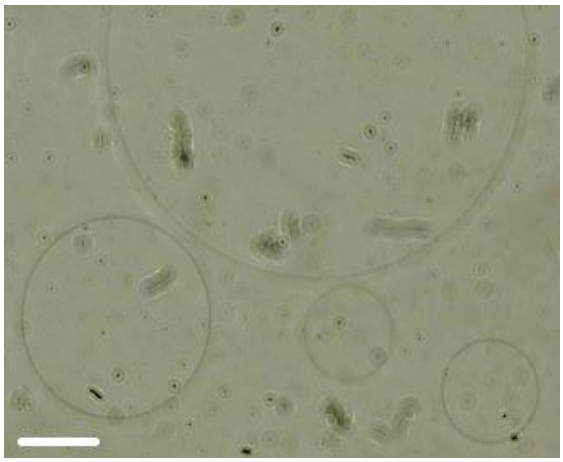
پس از لایه‌نشانی مولکول‌های فسفولیپیدی ، یک واشر پلاستیکی را روی این سطح به عنوان چمبر قرار داده و محلول سوربیتل ۲۰۰ میلی‌مولار را که محیط درون و بیرون آبدانک‌های تولید شده را تشکیل خواهد داد ، در داخل واشر می‌ریزیم. برای واشرهای به کار رفته در آزمایشگاه انبرک نوری گروه ما، حدود ۵۰۰ میکرولیتر از سوربیتل، کل فضای چمبر پلاستیکی را پر می‌کند که در شکل 2 ب نشان داده شده است. سپس صفحه بالایی خازن روی سطح چمبر پلاستیکی قرار داده می‌شود به طوری که واشر پلاستیکی (چمبر) بین دو سطح خازن قرار گرفته و سوربیتل یا محلول قطبی به عنوان الکترولیت بین صفحات خازن عمل می‌کند.

صفحات خازن به یک صفحه پایه پیچ می‌شوند تا در طی انجام الکتروفرمیشن ثابت مانده و از حرکت آن‌ها جلوگیری شود. سپس دو سر خازن را به یک میدان الکتریکی سینوسی متناوب با ولتاژ و فرکانس معین در مدت زمان معلوم وصل می‌کنیم(شکل ۲ پ).

ولتاژ و فرکانس بهینه برای دستگاه الکتروفرمیشن موجود در آزمایشگاه گروه انبرک نوری به شرح زیر بدست آمده است :

- اعمال میدان با ولتاژ ۲ ولت و فرکانس ۱۰ هرتز سینوسی به مدت ۲ ساعت و سپس تغییر ولتاژ به مقدار ۳ ولت با فرکانس ۵ هرتز مربعی به مدت نیم ساعت ، که میدان سینوسی برای تولید آبدانک‌ها و میدان مربعی برای جداسازی آبدانک‌ها از سطح لامل خازن اعمال می‌شوند.
- اعمال ولتاژ ۱.۵ ولت سینوسی با فرکانس ۱۰ هرتز به مدت ۲.۵ ساعت

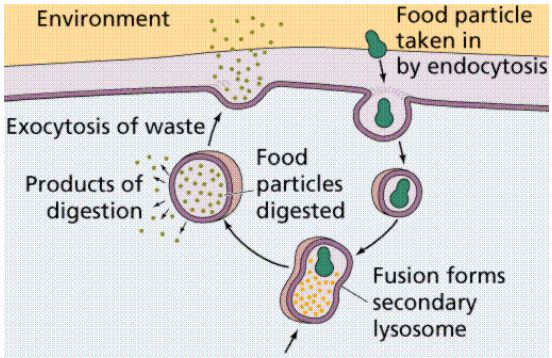
در هر دو روش بالا آبدانک‌های تک دولایه ای کروی شکل بدست آمده با این تفاوت که در روش دوم، آبدانک‌های بدست آمده خیلی بزرگ بودند (با قطر حدود۲۰ الی ۵۰ میکرومتر) که در شکل ۳ آورده شده است، در حالی که در روش اول، اندازه آبدانک‌ها تنوع بیشتری داشتند (با قطر حدود ۵ الی ۵۰ میکرومتر). این اندازه‌ها به مقدار زیادی به ضخامت لایه مولکول‌های فسفولیپیدی و نوع آن بستگی دارد. می‌توان یکی از دو صفحه بالایی و پایینی خازن و یا هر دو آن‌ها را با فسفولیپید لایه نشانی کرد.



شکل ۳ : آبدانک‌های کروی تولید شده با الکتروفرمیشن برای ولتاژ سینوسی ۲ ولت و فرکانس ۱۰ هرتز. مقیاس ۱۰ میکرومتر است.

۳- بررسی فرآیند برون رانی و بیگانه خواری با انبرک نوری

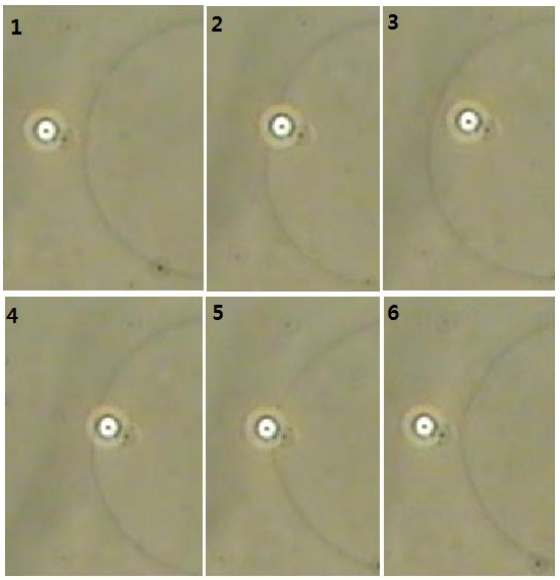
با استفاده از انبرک می‌توان ذرات میکرونی را تله کرد و سپس با استفاده از ذره‌ی تله شده نیروهای پیکونیوتنی مخصوصا به اجسام بیولوژیکی وارد کرد و نیروی لازم برای اینکار را محاسبه نمود. در این پروژه ما با استفاده از انبرک نوری و آبدانک‌های ساخته شده فرایند برون‌رانی و بیگانه‌خواری را که نقش اساسی در واکنش‌های حیاتی سلولی ایفا می‌کنند مورد مطالعه قرار دادیم. شکل ۴ شماتیکی از این فرایندها را که روی غشای سلول‌های بدن اتفاق می‌افتد نشان می‌دهد.



شکل ۴ : فرایند برون رانی و بیگانه خواری روی غشا

Downloaded from opsi.ir at 7:52 +0330 on Thursday November 15th 2018

نیروی لازم برای فرایندهای برون‌رانی و بیگانه خواری توسط یک سری از پروتئین‌ها صورت می‌گیرد. ما در اینجا این نیروها را بصورت تجربی با استفاده از وارد کردن ذره میکرونی به داخل (بیگانه‌خواری) و خارج (برون‌رانی) آبدانک اندازه‌گیری کردیم. شکل ۵ این دو فرایند را نشان می‌دهد. ماکزیمم نیروی لازم برای وارد ذره به داخل آبدانک حدود ۲۲ پیکونیوتن و ماکزیمم نیروی لازم برای خارج کردن همان ذره از داخل آبدانک به بیرون برابر ۱۶ پیکونیوتن بدست آمد. این نیروها می‌توانند مقیاسی از نیروهایی که پروتئینها برای فرایندهای برون رانی و بیگانه خواری بر روی غشای سلول زیستی وارد می‌کنند، باشند.



شکل ۵: ۱-۳: فرایند وارد کردن ذره میکرونی به داخل آبدانک (بیگانه خواری) و ۴_۶ : فرایند خارج کردن ذره میکرونی از داخل به خارج آبدانک.

۴- نتیجه‌گیری

آبدانک‌ها دارای کاربردهای وسیعی در پزشکی می‌باشند. از مهمترین کاربردهای آنها می‌توان به استفاده از آنها بعنوان حامل‌های دارویی در سیستمهای نوین دارورسانی و مطالعه روی خواص سلول‌ها اشاره کرد. با استفاده از انبرک نوری می‌توان خواص مختلف غشای سلول از قبیل کشش سطحی و سختی خمشی را مورد مطالعه قرار داد که این کار با کشیدن دنباله‌ای از غشای آبدانک توسط انبرک نوری و اندازه‌گیری نیروی وارده به ذره‌ی تله شده در تله‌ی نوری انجام می‌شود. همچنین می‌توان پدیده‌هایی از قبیل برون‌رانی و بیگانه‌خواری را که نقش اساسی در واکنش‌های حیاتی سلولی ایفا می‌کنند مورد مطالعه قرار داد.[۶,3]. ما در این پروژه با استفاده از انبرک نوری این دو فرایند را مورد مطالعه قرار دادیم و مشاهده کردیم که نیروی لازم برای فرایند بیگانه‌خواری (۲۲ پیکونیوتن) بیشتر از نیروی لازم برای فرایند برون‌رانی (۱۶ پیکونیوتن) است.

مراجع

[1] Rumiana, Alex; Nikolov, Vesselin, A practical guide to giant vesicles. Probing the membrane Nano regime via optical microscopy, J. Phys.: Condensed. Matter, 2006

[2] Njus, David, *Fundamental Principles of Membrane Biophysics*, p. 2.3 Wayne State University, 2000

[3] Boal, David H, *Mechanics of The Cell*, p. 144, Cambridge University Press, 2002

[4] Dopico, Alex, *Methods in Membrane Lipids*, p. 432, Humana Press, 2006

[5] Shimanouchi, Toshinori, *Kinetic Study on Giant Vesicle Formation with Electro formation Method*, American Chemical Society *Langmuir*, 2009

[6] Svoboda, Karel, *Biological Applications of Optical Forces*, Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct , 1994, 23:247-85