# استفاده از تله اندازی نوری برای مطالعه جابه‌جایی عرضی مولکول‌های لیپیدی

مهسا سلامی[۱]، فائقه حاجی زاده[۱]، یونس فرهنگی باروجی[۲]، سید نادر سید ریحانی[۳]

دانشکده فیزیک، مرکز تحصیلات تکمیلی علوم پایه زنجان، زنجان[۱]

موسسه نیلز بور، دانشگاه کوپنهاگ، دانمارک[۲]

دانشکده فیزیک، دانشگاه صنعتی شریف، تهران[۳]

**آبدانک غشای دولایه کروی فسفولیپیدی است که در ابعاد چند صد نانومتری تا چند ده میکرومتری در آزمایشگاه به صورت مصنوعی ساخته می‌شود و ابعاد بزرگ آن به عنوان مدل خوبی برای غشای سلولی به کار می‌رود. طبق مدل موزائیک سیال، غشای سلول را می‌توان به عنوان یک سیال دوبعدی در نظر گرفت که پروتئین‌ها و لیپیدها بر روی آن حرکت پخشی دارند. یکی از مهم‌ترین و محتمل‌ترین حرکت‌ها برای مولکول‌های لیپیدی پخش عرضی است که روش‌های بسیار محدودی برای بررسی آن وجود دارد. هدف این مقاله مطالعه حرکت جابه‌جایی عرضی مولکول‌های لیپیدی با استفاده از انبرک نوری است. انبرک نوری ابزار قدرتمندیست برای تله اندازی و میکرو دستکاری ذراتی با ابعاد میکرو و نانومتری. به منظور بررسی حرکت جابه‌جایی عرضی مولکول‌های لیپیدی در ابتدا با استفاده از یک ذره پلی استایرن با پوشش استرپتاویدین تله اندازی شده، از یک آبدانک دنباله تشکیل داده و پس از رسیدن سیستم به حالت پایدار یک تغییر ناگهانی در سیستم، با اعمال نیروی خارجی ایجاد شد. با بررسی مدت زمان لازم برای برگشت سیستم به حالت تعادل، می‌توان اطلاعات مفیدی در مورد جابه‌جایی عرضی مولکول‌های لیپیدی بدست آورد.**

کلید واژه- آبدانک، انبرک نوری، جابه‌جایی عرضی، غشا

# Optical trapping application for diffusion study of membrane lipids

Mahsa Salami[1], Faeghe Hajizade[1], Younes Farhangi[2], S.Nader S.Reyhani[3]

[1]Department of Physics, Institute for Advanced Studies in Basic Sciences (IASBS), Zanjan
[2]Niels Bohr Institute, University of Copenhagen, Denmark
[3]Department of Physics Sharif University of Technology, Tehran

Membranes are critical to the life of a cell because the structure and function of cell are dependent on membranes. Vesicle is a spherical bilayer phospholipid structure, which is known as a model for membrane of living cells. According to Fluid Mosaic Model, membranes can be considered as a two dimensional liquid in which lipids can freely diffuse on it. We are interested in studying lateral diffusion of lipids, for which there are a few reported methods to measure it. We propose a simple new method to study the lateral motion of lipid molecules based on temporal response of the lipids to an external force applied by optical tweezers. Optical tweezers are powerful tools to trap and manipulate at micro- and nano-scale using highly focused laser beam. In this research, first, a micro-spherical polystyrene bead was specifically attached to an artificial vesicle. Then a tether was formed from vesicle by applying a pulling force by optical tweezers. By applying an external force a sudden change was caused on the shape of the structure. This structure then relaxed to a final stable form. The diffusion coefficient of lipids can be experimentally investigate by studying the temporal relaxation of the deformed structure.

Keywords: Lateral diffusion, Membranes, Optical tweezers, vesicle



این مقاله در صورتی دارای اعتبار است که در سایت **www.opsi.ir** قابل دسترسی باشد.

## ۱- مقدمه

آبدانک ساختار دو لایه لیپیدی کروی است که به عنوان مدلی مصنوعی برای بررسی خواص و ویژگی‌های غشاهای طبیعی به کار می‌رود. در سال ۱۹۷۰ محققان برای اولین بار پی بردند که مولکول‌های لیپیدی به علت عدم وجود پیوندهای کووالانسی بین آن‌ها، می‌توانند آزادانه در سطح غشا جابه‌جا شوند [2-1].

طبق مطالعات متنوعی که در زمینه بررسی حرکت مولکول‌های لیپیدی انجام شده‌است، گونه‌ای از حرکت‌ها وجود دارد که در آن مولکول‌های لیپیدی می‌توانند به سرعت با مولکول‌های مجاور خود جابه‌جا شوند. بررسی این حرکت که پخش عرضی نام دارد، اطلاعات مفیدی در مورد دینامیک غشا بدست می‌دهد [3].

روش‌های محدودی برای بررسی پخش عرضی مولکول-های لیپیدی وجود دارد که بر پایه بررسی فلوئورسانسی نمونه‌های مورد نظر، یا اتصال یک نانوذره طلا به یک تک مولکول لیپیدی یا چند مولکول لیپیدی می‌باشند. این روش‌ها به دلیل ایراداتی که بر آنها وارد است، از جمله بزرگ بودن اندازه نانو ذره در مقایسه با اندازه مولکول‌های لیپیدی، از دقت کافی برخوردار نیستند[4].

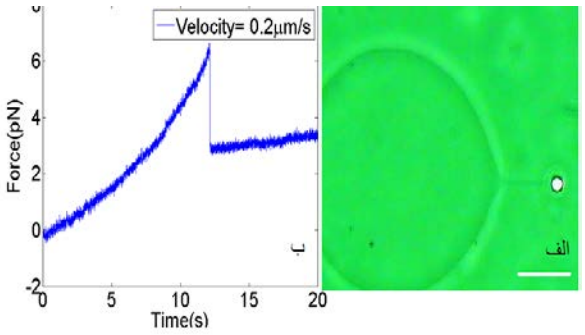
انبرک نوری ابزاریست که به دلیل توانایی‌اش در تله‌اندازی و دستکاری ذرات با ابعاد نانو و میکرو، اهمیت ویژه‌ای در فیزیک پیدا کرده است. چون نیروهای بین سلولی از مرتبه نیروهای انبرک نوری هستند، این ابزار در شناخت عملکرد این نیروها نقش مهمی دارد [5]. از جمله کارهایی که در این زمینه توسط انبرک نوری انجام شده-است می‌توان به تله‌اندازی باکتری‌ها و ویروس‌ها، اندازه-گیری نیروهای موتورهای مولکولی و بررسی ویژگی‌های آبدانک و مولکول‌های غشا اشاره کرد[6]. در این مقاله روشی برای بررسی حرکت براونی مولکول‌های لیپیدی، بر اساس پاسخ زمانی آبدانک به نیروی خارجی اعمال شده توسط انبرک نوری ارائه می‌دهیم.

## ۲- آزمایش

چیدمان آزمایش ما شامل یک لیزر Nd:Yag با طول موج 1064nm می‌باشد که با استفاده از یک عدسی (گشودگی :۱.۳، 100x ، فازی) روی نمونه، کانونی می-شود. به منظور اعمال جابه‌جایی‌های نانومتری، محلول نمونه روی یک پیزوالکتریک قرار می‌گیرد. برای ثبت مکان دقیق ذره در تله، یک فوتودیود چهارتایی در چیدمان انبرک نوری تعبیه شده و برای مشاهده نمونه از یک CCD استفاده شده است. اطلاعات بیشتر در مورد چیدمان را می‌توان در مقاله [7] یافت.

آبدانک‌ها با استفاده از روش الکتروفرمیشن در دمای $42^{\circ}c$ با استفاده از مولکول‌های POPC تشکیل شده‌اند [9]. به منظور اتصال آبدانک‌ها به میکروذرات با روکش استرپتاویدین، آبدانک‌ها از مولکول‌های لیپیدی ۱٪ بایوتین‌دار تشکیل می‌شوند. به منظور افزایش نمایانی تصویر، با استفاده از اختلاف ضریب شکست دو محیط، آبدانک‌ها در محیط ساکاروز (200mM) تشکیل شده و در محیط سوربیتول (300mM) رقیق می‌شوند. تله نوری قبل از اندازه‌گیری‌ها با استفاده از روش طیف توان درجه‌بندی می‌شود [8].

برای اعمال نیروی خارجی به آبدانک، یک ذره با شعاع= 1.2μm تله‌اندازی شده و یک آبدانک با اندازه مناسب به مجاورت آن آورده می‌شود. این عمل موجب چسبیدن ذره به آبدانک شده و با دور کردن آبدانک از ذره با سرعت ثابت یک نانو لوله لیپیدی به نام دنباله تشکیل می‌شود. که در شکل۲ الف نشان داده شده‌است.

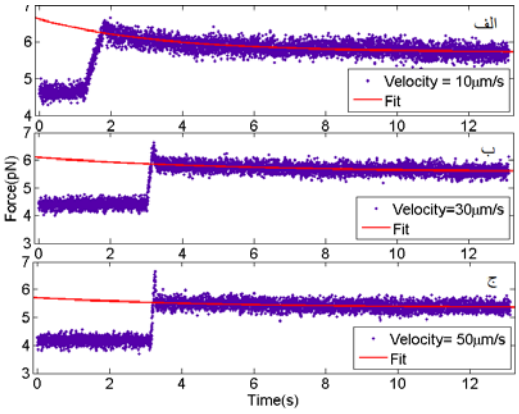



*شکل ۱: الف) تصویر میکروسکوپی تباین فاز آبدانک. دایره بزرگ سمت چپ آبدانک را نشان می‌دهد که با یک نانولوله به ذره در تله متصل است. مقیاس تصویر 10μm. ب) نمودار نیروی وارد شده بر ذره در تله، قطر آبدانک = 17μm سرعت جابه‌جایی آبدانک = 0.2μm/s*

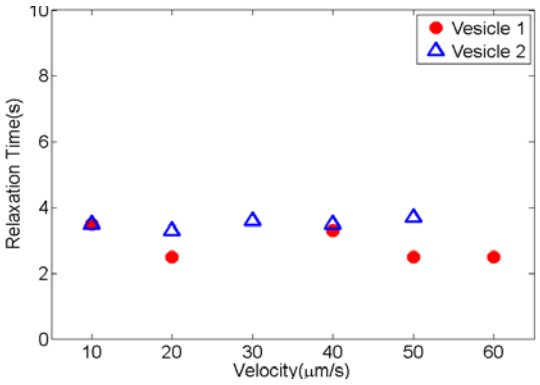
شکل ۲ب، نمودار نیروی اعمال شده توسط انبرک نوری برای تشکیل دنباله نشان می‌دهد. با توجه به این نمودار، ابتدا با افزایش فاصله بین آبدانک و ذره، نیرو افزایش می-یابد. بعد از مدت زمانی یک افت ناگهانی در نیرو اتفاق

می‌افتد و نیرو به مقدار ثابتی می‌رسد. این اتفاق مربوط به تغییر شکل آبدانک در محل اتصال دنباله است.

برای بررسی تاثیر نیروی خارجی بر آبدانک یک افزایش طول سریع به دنباله اعمال و زمان واهلش برگشت سیستم به حالت پایدار اندازه‌گیری شد. به این منظور طول دنباله به طور ناگهانی با ۵ سرعت مختلف افزایش داده و نیرو در حین و پس از جابه‌جایی ثبت شد. گراف-های نیروی مربوط به ۳ سرعت مختلف در شکل ۳ نشان داده شده اند. یک تابع نمایی به داده‌های پس از افزایش طول به منظور بدست آوردن زمان واهلش برازش شده است. زمان واهلش، زمانی تعریف می‌شود که تابع برازش شده به $1/e$ مقدار اولیه خود برسد. در اینجا به مدت زمانی اطلاق می‌شود که مولکول‌های لیپیدی از روی سطح غشا به دنباله منتقل می‌شوند.



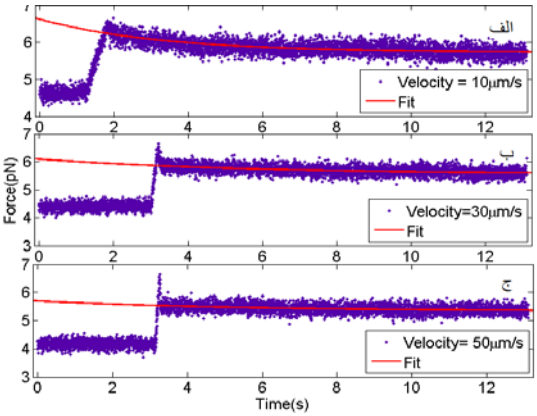

*شکل ۲: نیروی بازگداننده دنباله بعد از جابه‌جایی به اندازه 5μm سرعت جابه‌جایی‌ها الف) 10μm/s، ب) 30μm/s ج) 50μm/s بوده است. قطر آبدانک 10μm و کشش سطحی $0.17\times10^{-5}$ N/m است.*




*شکل ۳: نمودار زمان واهلش بر حسب سرعت‌های مختلف جابه‌جایی طولی. آبدانک 1: قطر آبدانک = 18μm/s ، طول دنباله = 10μm ، جابه‌جایی = 10μm ، کشش سطحی= $0.24\times10^{-5}$ N/m آبدانک 2: قطر آبدانک= 17μm ، طول دنباله= 10μm ، جابه‌جایی= 5μm کشش سطحی= $0.17\times10^{-5}$ N/m*

شکل ۴ زمان واهلش را برای دو آبدانک مختلف طی جابه‌جایی با سرعت‌های مختلف نشان می‌دهد. همانطور که در نمودار نشان داده شده‌است، زمان واهلش برای این جابه‌جایی از مرتبه ثانیه می‌باشد. هدف از انجام این آزمایش تخمین زمان مورد نیاز برای مولکول‌های لیپیدی برای انتقال از روی سطح آبدانک به دنباله بوده و به منظور مقایسه با کار انجام شده در مقاله[10] بوده که زمان واهلش برای ترکیبی از مولکول‌های DOPC و DOPG در حدود 0.52s بدست آمده است.

در مرحله بعد به منظور بررسی اثر جابه‌جایی عرضی، آبدانک با سرعت‌های مختلف در راستای عرضی جابه‌جا شد. در این آزمایش همه جابه‌جایی‌ها در جهت عمود بر راستای دنباله بوده‌اند. نتایج این آزمایش برای ۳ سرعت مختلف در نمودار شکل۵ نشان داده شده‌است.

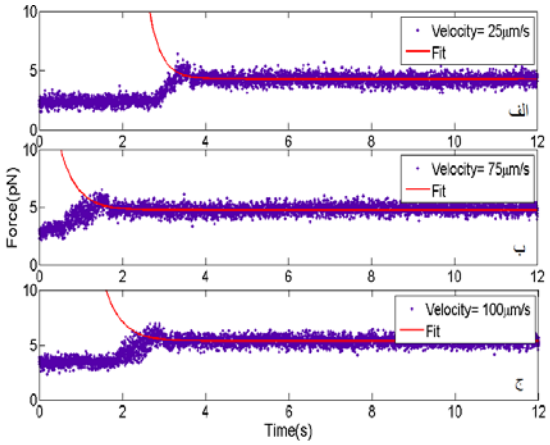



*شکل ۴: نیروی بازگداننده دنباله برای آبدانک با قطر 20μm و کشش سطحی $0.24\times10^{-5}$N/m 10μm با سرعت‌های: الف) 20μm/s ب) 30μm/s، ج) 50μm/s جابه‌جا شده است.*

وقتی آبدانک با سرعت بالایی در راستای عرضی جابه‌جا شود، یک آشفتگی در سیستم ایجاد می‌شود، ولی به علت تمایل سیستم به حالت کمترین مقدار انرژی، لیپیدها طوری در سطح آبدانک جابه‌جا می‌شوند که سیستم مجددا در حالت تعادل قرار بگیرد. در این حالت دنباله در محل اتصالش به غشا، عمود بر سطح غشا است. تاخیر زمانی که در این آزمایش بدست می‌آید، نشان دهنده مدت زمانی است که مولکول‌های لیپیدی روی سطح غشا جابه‌جا می‌شوند. این تاخیر زمانی که زمان واهلش عرضی نام دارد با برازش یک تابع نمایی روی داده‌های مربوط به پس از جابه‌جایی بدست می‌آید. این آزمایش برای ۳ آبدانک مختلف با کشش‌های سطحی مختلف انجام شد و

زمان واهلش گزارش شده برای آن‌ها از مرتبه صد میلی ثانیه و برای آبدانک فوق در حدود 150ms بدست آمد.

همانطور که در دو آزمایش قبل مشاهده شد، هم افزایش طول دنباله و هم جابه‌جایی عرضی آن روی سطح آبدانک موجب ایجاد آشفتگی در سیستم می‌شود در مرحله بعد، به منظور حذف اثر افزایش طول دنباله و افزایش مسافت طی شده توسط دنباله روی آبدانک، جابه‌جایی دایره‌ای به اندازه یک چهارم دایره بر آبدانک اعمال شده و داده‌های مربوط به آن ثبت شده‌است. در این آزمایش نیز، یک تابع نمایی روی دیتاهای پس از جابه‌جایی برازش شده و زمان واهلش بدست آمده، زمان مورد نیاز برای پخش عرضی مولکول‌های لیپیدی روی سطح آبدانک بدون تاثیر افزایش طول دنباله می‌باشد نمودار نیرو بر حسب زمان برای ۳ سرعت مختلف در شکل زیر برای آبدانکی به قطر 30µm نشان داده شده‌است. زمان واهلش بدست آمده از این آزمایش برای چند سرعت مختلف از مرتبه 0.5s و حدود 0.4s بدست آمده است.




شکل ۵: نمودار نیرو بر حسب زمان برای جابه‌جایی های مختلف با سرعت‌های: الف)25µm/s ب)75µm/s ، ج) 100µm/s. قطر آبدانک 30µm، طول دنباله 20µm و شعاع جابه‌جایی 35µm بوده است.

## ۳- نتیجه گیری

در این مقاله روشی برای مطالعه پخش عرضی مولکول-های لیپیدی با سه آزمایش مختلف ارائه و یک معیار زمانی دقیق برای حرکت مولکول‌ها روی سطح آبدانک گزارش شد که علیرغم روش‌های قبلی از دقت بالایی برخوردار است چون داده‌ها با دقت زمانی در حدود 0.04s ثبت شده اند که با توجه به نتایج بدست آمده، این بازه زمانی از زمان لازم برای جابه‌جایی مولکول‌های لیپیدی خیلی کمتر است. طبق آزمایشات انجام شده، زمان واهلش برای آزمایش افزایش ناگهانی طول دنباله از مرتبه ثانیه، برای جابه‌جایی عرضی از مرتبه صد میلی ثانیه و برای جابه‌جایی دایروی از مرتبه دهم ثانیه می باشد.

## ۴- تقدیر و تشکر

با تشکر از آقای سجاد میدانلو برای کمک در پیشروی این پروژه.

## ۵- مراجع

[1] T. Heimburg, Thermal Biophysics of membranes, Wiley, 2007.

[2] R. D. a. R. Dimova, "Inward and outward membrane tubes pulled from giant vesicles," *Journal of physics*, vol. 47, 2014.

[3] A. L. a. J.-F. T. J.-F. T. Laurence Dupou-Cezanne, "Lipid lateral diffusion and membrane organization," *FEBS letters*, vol. 257, no. 1, 1989.

[4] B. Y. K. J. Y. C. B Christoffer Lagerholm, "Methods to measure the lateral diffusion of membrane lipids and proteins," *Methods*, vol. 39, no. 2, 2006.

[5] S. N. S. R. F. Hajizadeh, "Optimized optical trapping of gold nanoparticles," *optics express*, vol. 18, no. 2, 2010.

[6] Karel Svoboda. Steven M Block, "Biological applications of optical forces," *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, vol. 23, no. 1, 1994.

[7] N. s. R. A. Samadi, "Optimal beam diameter for optical tweezers," *Optics letter*, vol. 35, no. 10, 2010.

[8] R. G. S. R. HR Khalesifard, "Measuring lateral efficiency of optical traps: the effect of tube length," *Optics communications*, vol. 259, no. 1, 2006.

[9] D. S. M. l.Angelova, "Liposome electroformation," *Faraday disscussion of the chemical society*, vol. 81, 1986.

[10] Y. F. B. S. N. S. R. D. S. L. B. O. P. M. B. P. Ramesh, FBAR Syndapin 1 recognizes andstabilizes highly curved tubularmembranes in a concentrationdependent manner, Scientific Reports, 2013.