

УДК 577.352.26 + 621.317

**ПРОГРАМНО-АППАРАТНИЙ КОМПЛЕКС ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ
ПРОВОДИМОСТИ И ЕМКОСТИ БИСЛОЙНЫХ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАН****В.П. БЕРЕСТ, П.В. АРЕНКИН***Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина, пл. Свободы, 4, 61077 Харьков*

Поступила в редакцию 2 марта 2009 г.

Принята 3 апреля 2009 г.

Измерение электрофизиологических параметров бислойных липидных мембран модифицированных белками или пептидами позволяет устанавливать механизмы ионного транспорта в биологических мембранах на уровне одиночных молекул. В работе описан разработанный действующий макет экспериментальной установки для изучения проводимости и емкости модифицированных модельных бислойных липидных мембран. Макет представляет собой микроконтроллерную систему управления и сбора данных, выполненную на современной элементной базе аналоговой и цифровой схемотехники. Программное обеспечение комплекса реализовано на ассемблере микроконтроллера семейства PIC18F4xx и отлаживалось в среде MPLAB IDE.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: бислойные липидные мембраны, электрофизиология, макет экспериментальной установки.

**HARDWARE AND SOFTWARE COMPLEX FOR STUDYING CONDUCTIVITY AND
CAPACITANCE OF BLACK LIPID MEMBRANES****V.P. Berest, P.V. Arenkin***Karazin Kharkiv National University, 4 Svobody Sq., Kharkiv 61077, Ukraine; berest@univer.kharkov.ua*

Measurement of electrophysiological parameters of black lipid membranes modified with proteins or peptides, allows to establish the mechanisms of ion transport in biological membranes at the level of single molecules. This paper describes the developed prototype of an experimental setup for studying the conductivity and capacity of the modified black lipid membranes. The prototype represents a microcontroller system of data management and acquisition, executed in modern analog and digital element base. The software is implemented in assembler for microcontroller of PIC18F4xx family and debugged in MPLAB IDE integrated development environment.

KEY WORDS: black lipid membranes, electrophysiological measurements, prototype.

**ПРОГРАМНО-АППАРАТНИЙ КОМПЛЕКС ДЛЯ ВИВЧЕННЯ ПРОВІДНОСТІ ТА
ЄМНОСТІ ДВОШАРОВИХ ЛІПІДНИХ МЕМБРАН****В.П. Берест, П.В. Арєнкін**

Вимірювання електрофізіологічних параметрів двошарових ліпідних мембран, модифікованих білками або пептидами, дозволяє встановлювати механізми іонного транспорту в біологічних мембранах на рівні поодиноких молекул. В роботі описано розроблений діючий макет експериментального устаткування для вивчення провідності та ємності модифікованих модельних двошарових ліпідних мембран. Макет є мікроконтролерною системою керування та збору даних, виготовленою з використанням сучасної елементної бази аналогової та цифрової схемотехніки. Програмне забезпечення комплексу реалізовано на асемблері мікроконтроллера сімейства PIC18F4xx й налагоджували в середовищі MPLAB IDE.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: двошарові ліпідні мембрани, електрофізіологія, макет експериментального устаткування.

Модели биологических мембран используют для выяснения принципов их функционирования с помощью современного арсенала физических и физико-химических методов, применение которых не всегда возможно при изучении живых объектов [1]. Плоские бислойные липидные мембраны (БЛМ) в водной среде позволяют в значительно более широких пределах, сравнительно с мембранами живых клеток, варьировать солевой состав сред, величины pH, температурные и осмотические

условия, что позволяет с большей точностью и надежностью исследовать электрохимические характеристики мембран, определять фазовое состояние и фазовые переходы в мембранах [2]. Эти мембраны являются удобной модельной системой для изучения поверхностных, электрохимических, биофизических, биохимических и биологических явлений и в первую очередь - ионного транспорта. Белковые или пептидные ионные каналы могут встраиваться в искусственные бимолекулярные липидные слои для детального изучения свойств этих функциональных систем [3]. Измерение электрофизиологических параметров БЛМ модифицированных белками или пептидами позволяют устанавливать механизмы ионного транспорта в липидных мембранах на уровне одиночных молекул [4].

При помощи метода БЛМ, анализируя записи токов через мембрану при разных трансмембранных напряжениях, можно извлечь информацию о функциях и структуре ионного канала [4, 5] – о кинетике транспорта (насыщение, ингибирование, ионная селективность); о конформационных изменениях в ответ на внешние воздействия (трансмембранный потенциал, связывание с лигандами, ковалентные модификации).

Коммерчески производимые компоненты или интегрированные БЛМ лаборатории (Warner Instruments, Eastern Scientific), а также программные продукты (pClamp, Clampfit) для анализа данных БЛМ эксперимента не всегда доступны отечественным исследователям, поэтому мы задались целью создать экспериментальный комплекс для изучения проводимости и емкости бислойных липидных мембран.

Для достижения этой цели необходимо было разработать аппаратно-программную систему, выполняющую следующие функции [6, 7]:

- регистрация малых токов в диапазоне от 0,1 до 100 пА;
- формирование прямоугольных импульсов напряжения в диапазоне от -200 до +200 мВ с дискретностью в 1 мВ;
- подача на мембрану импульсов напряжения программируемой формы в диапазоне от -50 до +50 мВ в диапазоне частот от 0,01 до 1000 Гц;
- оцифровка и передача в компьютер величины проходящего через мембрану тока;
- определение емкости мембраны.

Структурная схема установки

Разработанный нами программно-аппаратный комплекс предназначен для измерения проводимости и емкости БЛМ и записи токов одиночных ионных каналов. Регистрация получаемых данных производится их передачей через USB или COM порт компьютера.

Установка состоит из следующих блоков: преобразователь ток-напряжение (I/U); аналого-цифровой преобразователь (АЦП); микроконтроллер (МК); формирователь входного напряжения (ФВН); приемо-передатчик в стандарте RS232 (RS232); блок индикации (БИ); блок питания (БП) (рис. 1).

Преобразователь ток-напряжение расположен внутри клетки Фарадея и служит для преобразования тока, проходящего через мембрану в напряжение с коэффициентом преобразования 10 мВ/пА. Аналого-цифровой преобразователь преобразует аналоговый сигнал в цифровой код для дальнейшей передачи его в микроконтроллер. Микроконтроллер выдает сигналы управления на все блоки схемы. Формирователь входного напряжения может работать в двух режимах. В первом режиме на биологическую мембрану подаются импульсы напряжения заданной амплитуды и длительности для определения потенциал зависимости мембраны. Второй режим служит для определения целостности мембраны в измерительной кювете и для определения емкости мембраны. Приемо-передатчик RS232 обеспечивает протокол

передачи данных между микроконтроллером и персональным компьютером. Блок индикации служит для просмотра и изменения параметров работы устройства.

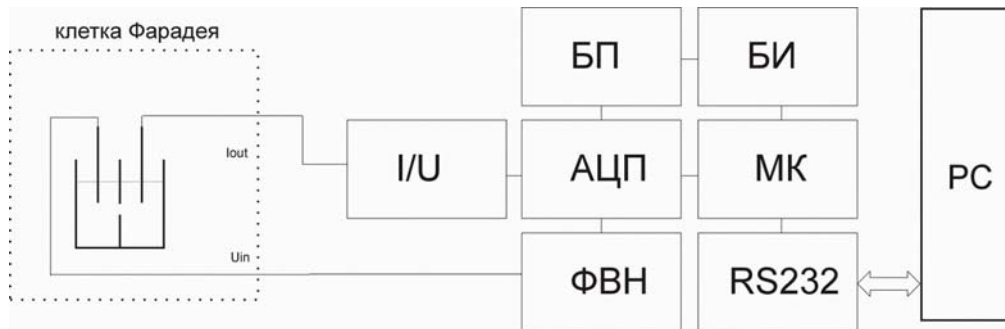


Рис. 1. Структурная схема установки

Принципиальная схема установки

Управление схемой регистрации и передачи данных осуществлено на базе микроконтроллера PIC18F458 с RISC архитектурой (рис. 2).

Блок аналого-цифрового преобразователя состоит из усилителя входного сигнала с программно управляемым коэффициентом усиления, состоящего из элементов R1, DA1-1 типа AD8542 и DA2 типа K572ПА1, который преобразует диапазон выходного сигнала преобразователя ток-напряжение во входной диапазон DA3 типа ADS7835. Последовательно-параллельный сдвиговый регистр DD2 типа 555IP8 преобразует последовательный код с микроконтроллера в параллельный, который через защелку DD1 типа 74НСТ573 одновременно подается на цифро-аналоговый преобразователь DA2 типа K572ПА1 с токовым выходом, который стоит в цепи обратной связи усилителя входного сигнала.

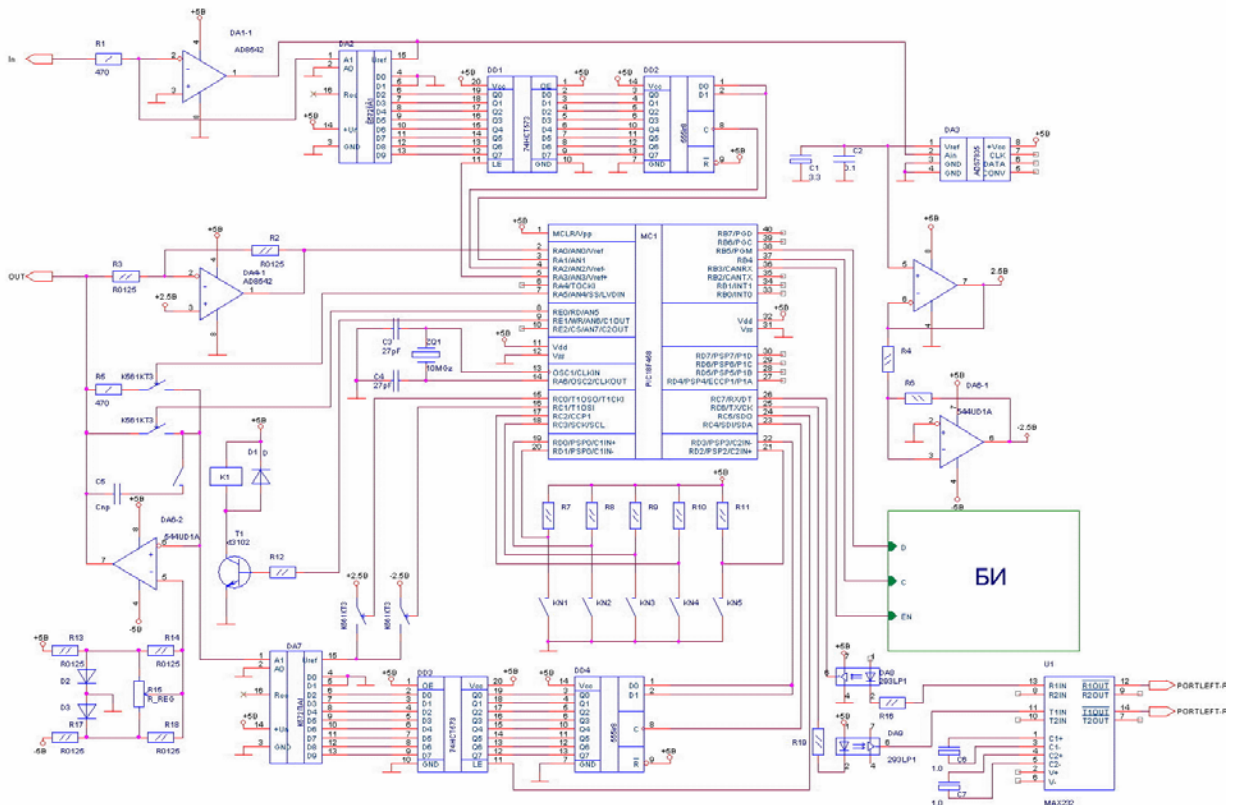


Рис. 2. Принципиальная схема модуля управления

Формирователь входного напряжения состоит из элементов R5, C5, D1, R12-R15, R17, R18, реле K1 типа «Simens»12v16a, транзистора T1, 4-х электронных ключей K561КТ3, операционного усилителя DA6-2 типа 544УД1А, цифро-аналогового преобразователя с токовым выходом DA7 типа K572ПА1, последовательно-параллельного регистра K555ИР8 и защелки DD3 типа 74НСТ573. Работа формирователя построена на операционном усилителе DA6-2. С помощью электронных ключей замыкаются различные цепи обратной связи, которые задают режим работы формирователя. При подаче на мембрану прямоугольного импульса в цепи обратной связи стоит резистор R5. При измерении емкости мембраны операционный усилитель DA6-2 подключен как интегратор с конденсатором C5 в цепи обратной связи. Цифро-аналоговый преобразователь DA7 задает амплитуду импульса и скорость нарастания напряжения.

Описание функциональных модулей установки

Измерительная ячейка представляет собой камеру с электролитом, в которой находится исследуемая мембрана и электроды для подключения измерительной ячейки в электрическую схему.

Преобразователь ток-напряжение - маломощный операционный усилитель с входным током <200 фА и сопротивлением обратной связи 10 ГОм.

Масштабирующий усилитель с программируемым коэффициентом усиления - инвертирующий усилитель с цифро-аналоговым преобразователем, который имеет токовый выход, в цепи обратной связи.

12 разрядный аналого-цифровой преобразователь сигнала с масштабирующего усилителя преобразует двуполярный сигнал с масштабирующего усилителя в цифровой код для дальнейшей передачи его в микроконтроллер.

Источник опорных напряжений формирует опорные напряжения для работы генератора входного сигнала, подаваемого в измерительную ячейку.

Генератор входного напряжения, прикладываемого к мембране, состоит из операционного усилителя, который в зависимости от состояния электронных ключей K2 и K3 включается по схеме интегратора или инвертирующего усилителя. Входным сигналом является ток, сформированный источником опорного напряжения и цифро-аналоговым преобразователем с токовым выходом. Применение 10 разрядного цифро-аналогового преобразователя позволяет получить, в зависимости от подключенной обратной связи, 1024 уровня постоянного или скорости изменения пилообразного напряжения. Ключ K1 предназначен для быстрого разряда конденсатора в цепи обратной связи интегратора. Ключ K2 включает операционный усилитель как интегратор. Ключ K3 включает операционный усилитель как инвертирующий усилитель.

Преобразователь уровня входного напряжения усиливает сигнал генератора входного напряжения в 25 раз и сдвигает нулевой уровень на +2,5 В для измерения аналого-цифровым преобразователем микроконтроллера.

Управляющий контроллер формирует управляющие сигналы электронных ключей, аналого-цифровых и цифро-аналоговых преобразователей, принимает управляющие команды с компьютера и передает ему цифровой код с АЦП.

Драйвер USB обеспечивает возможность обмена информацией по шине USB микроконтроллера с персональным компьютером.

Персональный компьютер принимает, обрабатывает и записывает информацию с блока управления.

Модуль индикации предназначен для индикации параметров работы прибора.
Блок питания формирует все необходимые напряжения для работы установки.

Принцип работы установки.

Установка по исследованию БЛМ работает следующим образом. Генератор напряжения формирует изменяющееся во времени напряжение, которое подается на измерительную ячейку. Принцип действия генератора заключается в следующем. Микросхема DA10 является источником положительного опорного напряжения. Чтобы исключить влияние входного сопротивления усилителя (интегратора) на микросхеме DA9 организован повторитель напряжения, выход которого через ключ К4 может быть подключен ко входу усилителя (интегратора). Отрицательное опорное напряжение подключается ко входу усилителя (интегратора) через ключ К5 с выхода инвертирующего усилителя с коэффициентом усиления 1, организованного на микросхеме DA8. На вход инвертирующего усилителя подается положительное опорное напряжение с микросхемы DA10. Наличие двух опорных напряжений (положительного и отрицательного) необходимо для формирования двуполярного напряжения на выходе усилителя и обеспечения нарастания и спада напряжения в режиме интегратора. Входным сопротивлением усилителя (интегратора) является ЦАП DA7 (K572ПА1) имеющий выход по току. Наличие на входе 10 разрядного ЦАП при постоянном входном напряжении дают возможность получить 1024 положительных и 1024 отрицательных уровней входного тока, что обеспечивает 2048 уровней выходных напряжений в режиме усилителя и 2048 скоростей изменения пилообразного напряжения на выходе интегратора. Для получения необходимого напряжения контроллер управляет ключами К1, К2, К3, К4 и цифровым кодом, подаваемым на ЦАП. Контроль амплитуды пилообразного напряжения осуществляется микроконтроллером с помощью внутреннего 10 разрядного АЦП. Сигнал, который подается на измерительную ячейку, через преобразователь уровня и аналоговый вход микроконтроллера подается на внутренний АЦП. Применение цепи контроля выходного сигнала генератора микроконтроллером дает возможность не только определения моментов переключения ключей в режиме интегратора (для ограничения амплитуды выходного сигнала), но и для контроля исправности схемы генератора.

Заданный выходной сигнал генератора напряжения подается на вход преобразователя ток-напряжение через измерительную ячейку, которая и определяет входной ток усилителя в зависимости от приложенного напряжения химического состава электролита и процессов, проходящих в мембране. Преобразователь ток-напряжение сделан на операционном усилителе DA1 типа AD549 с сопротивлением цепи отрицательной обратной связи 10 ГОм. Для исключения воздействия электромагнитных полей и вибрации измерительная ячейка и преобразователь ток-напряжение размещены в стоящей на гранитной плите клетке Фарадея отдельно от основной схемы установки.

С выхода преобразователя напряжение, пропорциональное току через измерительную ячейку, экранированным кабелем подается на вход масштабирующего усилителя, который находится в модуле управления. Масштабирующий усилитель представляет собой инвертирующий усилитель на базе ОУ DA4 с использованием ЦАП DA2 в цепи отрицательной обратной связи. Резистор R2 определяет входное сопротивление масштабирующего усилителя. Микроконтроллер подает 10 разрядный цифровой код на ЦАП, чем определяет текущий коэффициент усиления масштабирующего усилителя.

С выхода масштабирующего усилителя сигнал подается на вход аналого-цифрового

преобразователя DA3, который преобразует сигнал в цифровой код и передает микроконтроллеру. С микроконтроллера информация о характере изменения тока через мембрану поступает в персональный компьютер по шине USB. Для согласования контроллера с интерфейсом USB в схеме применен драйвер USB PDUSB12.

Программа визуализации экспериментальных данных

Для визуализации токов через мембрану мы написали программу, которая дискретизирует данные и одновременно проводит предварительный анализ и запись отобранных участков на диск (рис. 3). Программа состоит из трёх частей: прерываемой по команде подпрограммы оцифровки данных, подпрограммы нахождения событий и основной программы, которая контролирует две предыдущие и отвечает за размещение отобранных событий. Оцифровка всегда производится с частотой, равной $5f$, где f - частота среза фильтра Бесселя, используемого для фильтрации аналоговых сигналов. Это программа просматривает вновь поступившее оцифрованные данные, ищет момент открывания канала и устанавливает адреса начала и конца открывания канала. Работа подпрограмм базируется на алгоритме регистрации переходных моментов. Этот алгоритм формирует два текущих средних значения из оцифрованных данных и считает, что открывание канала имеет место только тогда, когда различие между средними значениями превышает некий порог. Порог выбирается таким образом, чтобы он в 6 раз превышал стандартное отклонение шума от базовой линии. Для этой программы важны только времена отклонения от базовой линии и возвращение к ней, соответствующие началу и концу срабатывания канала [4].

Такие средние амплитуды вместе с соответствующими временными характеристиками можно использовать для предварительного анализа кинетики работы мембранных каналов в режиме реального времени.

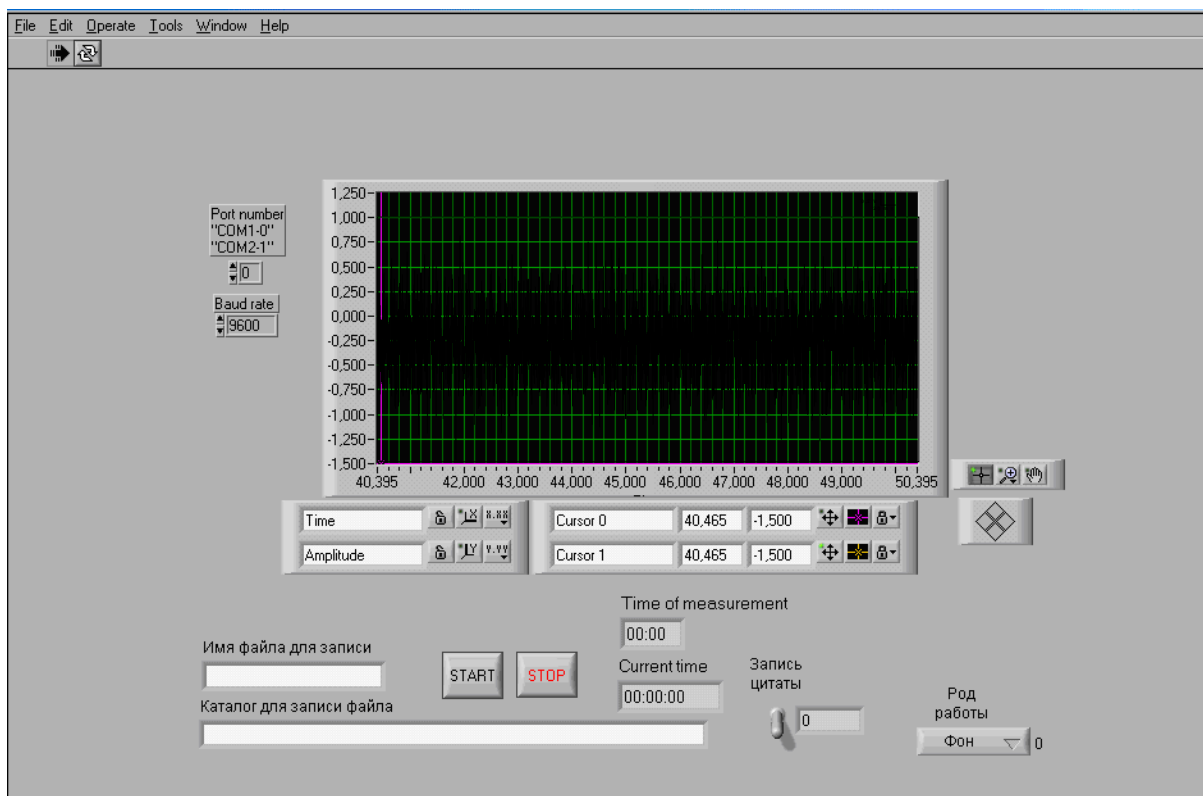


Рис. 3. Вид окна программы визуализации.

Результаты тестирования

Было проведено тестирование макета установки при помощи специально разработанного тестера, представляющего собой управляемый генератор токов с амплитудой в диапазоне от 0,1 до 100 pA.

Результаты тестирования показали, что созданная установка способна регистрировать токи с амплитудой от 0.1 до 100 pA, формирователь входного напряжения и микроконтроллер подают прямоугольные импульсы напряжения разной длительности и амплитуды на мембрану. Показано, что установка поддерживает связь с компьютером через СОМ-порт, амплитуды токов записываются в файл данных для дальнейшего статистического анализа. Интерфейс программы LabView адаптированный для работы с установкой позволяет в реальном времени визуализировать информацию, получаемую от АЦП. Собственные шумы установки не превышают величину в 6 раз меньшую величины тока, текущего через открытый ионный канал, что позволяет выявлять наличие в записях токов событий, связанных с открыванием одиночных ионных каналов с проводимостью не менее 5 пСм.

ВЫВОДЫ

1. Создан действующий аппаратно-программный прототип экспериментальной установки для изучения проводимости и емкости модифицированных бислойных липидных мембран. Параметры комплекса позволяют регистрировать токи одиночных ионных каналов амплитудой от 0 до 100 pA с временами жизни открытого состояния около 0,01 с.
2. Для исследования проводимости одиночных ионных каналов цифро-аналоговый преобразователь прибора вырабатывает управляющие постоянные напряжения в диапазоне от -200 до +200 мВ и переменные напряжения программируемой формы в диапазоне частот от 0 до 1000 Гц в диапазоне напряжений от -50 до +50 мВ.
3. Программное обеспечение системы позволяет регистрировать ионные токи через мембранные каналы в режиме реального времени и экспортировать полученный файлы данных во внешние специализированные приложения для анализа.

Предварительные экспериментальные измерения подтвердили работоспособность установки для изучения проводимости и емкости мембран. В дальнейшем предполагается проведение полномасштабных исследований параметров различных модифицированных бислойных липидных мембран.

Благодарности. Авторы выражают благодарность к.т.н. Стервеедову Н.Г. за содействие в изготовлении экспериментального образца установки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Биологические мембраны. Методы: / Под ред. Дж.Б. Финдлея, У.Г. Эванза. – М.: Мир, 1990. – 424 с.
2. Бислойные липидные мембраны. – Владивосток: Б.и., 1983. – 150 с.
3. Методы изучения мембран растительных клеток / Под ред. В.В. Полевого, Г.Б. Максимова, Н.Ф. Синютиной. – Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1986. – 192 с.
4. Сакман Б., Неер Э. Регистрация одиночных каналов. – Москва: Мир, 1987. – 447 с.
5. Hille B. Ion channels of excitable membranes. – Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc., 2001. – 814 p.
6. Достал И. Операционные усилители. – М.: Мир, 1982. – 512 с.
7. Корыта И. Ионы, электроды, мембраны. – М.: Мир, 1983. – 264 с.