



Povzetek projekta Po kreativni poti do znanja 2017 – 2020, 2. odpiranje, za namen objave in predstavitve na spletni strani sklada

1. Polni naslov projekta: Razvoj metod za meritve biomolekul z optično pinceto

- V katero področje na prvi klasifikacijski ravni KLASIUS-P-16 se uvršča projekt glede na vsebinsko zasnovo (neustrezno področje izbrišite):

05 - Naravoslovje, matematika in statistika

2. V sodelovanju z: (navede se univerza oz. samostojni visokošolski zavod, ki je prijavil projekt in članica, ki je nosilka projekta ter partner/ja – podjetje/ji oz. organizacija, ki je/sta bilo/i vključeno/i v projekt)

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za matematiko in fiziko
Aresis, napredni raziskovalni sistemi, d.o.o.

3. Besedilo:

- Opredelite problem, ki se je razreševal tekom izvajanja projekta

Optična pinceta je kompleksen znanstveni instrument za brezkontaktno manipulacijo mikro-objektov. S pomočjo fokusiranega laserskega žarka je mogoče delce velikosti od nekaj deset nanometrov do nekaj deset mikrometrov ujeti v t.i. optični pasti, jih premikati in meriti sile na njih v območju od 0.1 pN do nekaj 100 pN, kar je ravno območje, v katerem je mnogo relevantnih sil v bio-svetu.

Optične pincete ponuja nekaj (v svetovnem merilu) podjetij, eno izmed njih pa je ljubljansko visoko-tehnološko podjetje Aresis, napredni raziskovalni sistemi, d.o.o. je, ki že od leta 2004 uspešno razvija in izdeluje optične pincete in ima vizijo postati vodilni globalni ponudnik optičnih pincet za resno znanstveno uporabo. Podjetje ponuja tehnološko verjetno najnaprednejše optične pincete na svetu do česar so prišli z dolgoletnim razvojem na temelju ekspertnih znanj fizike (s poudarkom na optiki), elektronike in programiranja. Po drugi strani pa v podjetju ni ekspertize na bio-področju (biologija, biokemija...), ki je trenutno glavna niša za optične pincete.

V projektu smo se zato lotili razvoja programske opreme za meritve biomolekulskih interakcij z optično pinceto in demonstracije merjenja biomolekulskih interakcij z Aresisovo optično pinceto. Z njo smo izvedli nekaj »klasičnih« meritev biomolekulskih interakcij. Vključeno podjetje je najbolj zanimala interakcija med vezavo proteina A na imunoglobulin G ter meritev sila-razteg pri dvoverižni DNK. S takšnimi demonstracijskimi meritvami se lahko pokaže bodočim uporabnikom, da je Aresisova optična pinceta primerna tudi za biomolekulske meritve, kar posledično odpira novo potencialno tržno nišo za sodelujočo gospodarsko družbo.

- Opišite potek reševanja problema oz. kratek povzetek projekta

Projekt je bil osredotočen na tri glavne aktivnosti, ki so se neposredno navezovale na specifično ekspertizo obeh fakultet, ki sta sodelovali pri projektu ter na potrebe in interese partnerskega podjetja:

1. Implementacija algoritmov za kalibracijo optične pasti in določanje sile na delec v pasti na osnovi

video-mikroskopije

Pri projektu smo uporabili Aresisovo optično pinceto, ki omogoča manipulacijo pasti s subnanometrsko natančnostjo. Lego v pasti ujetega delca (tipično so to mikrometrške polistirenske kroglice) je iz slike moč določiti z algoritmom za prepoznavanje objektov. Iz odmika delca od središča pasti x in koeficienta pasti k (ta se določi s kalibracijo) se izračuna silo na delec $F=kx$. V programskem jeziku python, za katerega obstaja mnogo odprtokodnih modulov z različnimi funkcionalnostmi smo razvili programski paket za sledenje delcem na osnovi video-mikroskopije, za kalibracijo optične pasti in določanje sile na delec v optični pasti. Izdelali smo interaktivni grafični vmesnik za lažjo uporabo. Spisali smo obsežna navodila za uporabo.

2. Izbira ustreznih mikrokroglic in vezava biomolekul na njihovo površino

Optična pinceta ne omogoča direktne manipulacije biomolekul (velikost reda nekaj nm), ampak je treba to storiti posredno preko njihove vezave na mikrokroglice, ki pa jih je moč ujeti, manipulirati in meriti sile nanje. Za meritev interakcije med molekulama X in Y je zato potrebno na površino ene vrste kroglic vezati molekule X, na površino druge vrste kroglic vezati Y, v eksperimentu pa se potem meri sile na kroglici. Običajno preiskovanih biomolekul ni možno pritrčiti neposredno na površino kroglice, ampak je potrebna vmesna vez, tipično iz dveh drugih »pomožnih« molekul. Izbrali smo primerno vrsto mikrokroglic za manipulacijo s pinceto in poiskali ter izvedli primerne protokole za vezavo bio-molekul.

3. Meritev biomolekulskih interakcij

Po implementaciji algoritmov za določanje sile in obvladovanju vezave biomolekul na kroglice, smo izvedli več eksperimentov pod biološkimi pogoji (vodno okolje, sobna temperatura). Tipičen eksperiment je vključeval dve različni kroglici, ki smo ju s pinceto pripeljali v kontakt, da se je vzpostavila vez med biomolekulami na njunih površinah, nato pa kroglici počasi vlekli narazen in pri tem opazovali odvisnost sile od premika. Na ta način smo izmerili odvisnost sile od raztezka za dvoverižno DNK ter interakcijo med Proteinom A in Immunoglobulinom G.

4. Izdelava demonstracijske optične pincete

Iz standardnih cenovno-dostopnih komponent, ki so že na voljo v našem laboratoriju, smo izdelali preprosto enožarkovno infrardečo optično pinceto, ki 3D lovi mikrodolce v vodi.

- Navedite in opišite rezultate projekta ter njihov doprinos k družbeni koristnosti

1. Razvili smo programski paket (spisan v priljubljenem jeziku Python) za meritve biomolekulskih interakcij z optično pinceto. Paket sestavlja več samostojnih modulov: za določanje trajektorij delcev iz eksperimentalnih videoposnetkov, za kalibracijo optične pasti iz trajektorije delca v fiksni pasti in za določanje sile na delec, ujet v optični pasti. Za module smo napisali tudi obsežno dokumentacijo ter dodali sintetični generator podatkov, ki novim uporabnikom pomaga razumeti pot od eksperimenta do kvantitativnih rezultatov.

Uporaba programskega paketa ni vezana na optične pincete partnerskega podjetja, ampak primerna za uporabo tako na komercialno dostopnih kot tudi samo-zgrajenih optičnih pincetah. Študenti in dijaki brez dostopa do pincete lahko s pomočjo sintetičnih podatkov opravijo analizo »virtualnih« biomolekulskih interakcij in se na ta način bolje seznanijo s principom meritev. Izvorno kodo programske opreme z izdatno dokumentacijo smo javno objavili na naslovu <https://github.com/fmf-pkp-2019/tweezer> in jo s tem dali v brezplačno široko družbeno uporabo. Potencialnih uporabnikov nove programske opreme je dosti – že samo v Sloveniji je 5 laboratorijev z optično pinceto. Pričakujemo, da jim bo uporaba naših programov olajšala in s tem pohitrila

raziskovalno delo.

2. Razvili smo nov modul za širokouporabljan odprtokodni program za nadzor mikroskopov in periferne opreme microManager. Modul omogoča neposredno krmiljenje Aresisove optične pincete iz tega programa, kar je vsekakor še dodaten argument pri prodaji pincet partnerskega podjetja.

3. Optimizirali smo iz literature znane protokole za vezavo želenih biomolekul na mikrokroglice. DNK molekulo dolžine nekaj mikrometrov smo vezali med dve mikrokroglici različnih velikosti in ju z optično pinceto vlekli narazen. Z našo programsko opremo smo analizirali eksperimentalne videoposnetke in določili odvisnost sile med kroglicama od raztega. Podobno smo izmerili tudi interakcijo med proteinom A in imunoglobulinom G. Partnersko podjetje bo lahko rezultate teh meritev uporabilo v promocijskem gradivu njihovih optičnih pincet ter s tem lažje prodrlo na nov segment trga. Z rastjo podjetja so koristi za družbo očitne: manj nezaposlenosti, preprečevanje bega možganov v tujino, več pobranih davkov.

4. Izdelali smo demonstracijsko optično pinceto. Optična pinceta je načeloma zelo drag in občutljiv znanstveni instrument, naša preprosta različica pa je relativno poceni in prenosljiva. Uporabna bo v študijskem programu (npr. pri predmetu Optika), hkrati pa lahko na različnih javnih prireditvah za popularizacijo znanosti (npr. Festival znanosti, Noč raziskovalcev,...) kot atraktiven eksperiment poveča zanimanje za naravoslovje in tehniko med mladimi.

4. Priloge:

- Slikovno gradivo: Priložite vsaj dve sliki npr. sliko končnega produkta, sliko študentov pri delu na projektu, sliko s sestankov ipd. Pri pošiljanju slik bodite pozorni, v kolikor gre za končni produkt, da bo zadoščeno zahtevam glede informiranja in obveščanja (ustrezni logotipi itd.).

