



Обзор

Использование нанотехнологии оптического пинцета в мембране

Исследования взаимодействия

Арнит Ичампати и Чамари де Силва *

Факультет физики Университета Мерсера, Мейкон, Джорджия 31207, США;
aveechampati123@gmail.com * Переписка: desilva_c@mercer.edu

Аннотация: Оптические пинцеты стали неотъемлемой частью микроскопических манипуляций с клетками с 1990-х годов.

Основополагающая работа Артура Эшкина привела к развитию оптических пинцетов как эффективного инструмента для разработки методов анализа в области физики и нанотехнологий. Оптические пинцеты, являясь передовым применением манипуляций с клетками, облегчили изучение множества клеточных и молекулярных взаимодействий в более широкой области нанотехнологий. За три десятилетия, прошедшие с момента появления оптических пинцетов, появились различные и универсальные методы анализа, которые дополнительно изучают биохимические пути, необходимые для пролиферации и коммуникации клеток. Наиболее важной органеллой, участвующей в коммуникации и защите отдельных клеток, является плазматическая мембрана. За последние три десятилетия появились новые методы анализа, которые изучают роль плазматической мембраны во взаимодействии между клетками и специфические белковые компоненты, которые выполняют интегральные мембранные функции для клетки в целом. Чтобы лучше понять, в какой степени оптические пинцеты превратились в важнейший инструмент для оценки клеточных мембран в области нанотехнологий, в текущем исследовательском секторе будут рассмотрены различные новые методы анализа, включая анализы на вытягивание, вдавливание и сжатие.

Ключевые слова: оптические пинцеты; нанотехнологии; мембранное взаимодействие; тянущие анализы; анализы индентирования; анализы на растяжение



Цитирование: Ичампати, А.; де Силва, К.

Использование нанотехнологии
оптического пинцета в исследованиях
мембранного взаимодействия. Прил. Нано
2022, 3, 43–53. <https://doi.org/10.3390/applnano3010004>

Академические редакторы: Анджело
Мария Тальетти и Илария Реа

Поступила: 1 сентября 2021 г.

Принято: 14 января 2022 г.

Опубликовано: 7 февраля 2022 г.

Примечание издателя: MDPI сохраняет нейтралитет
в отношении заявлений о юрисдикции в
опубликованных картах и институциональной принадлежности.



Копирайт: © 2022 авторов.

Лицензиат MDPI, Базель, Швейцария.

Эта статья находится в открытом доступе.
распространяется на условиях и
условия Creative Commons

Лицензия с указанием авторства (CC BY)
(<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Введение

Оптические пинцеты, также более известные как оптические ловушки, являются исключительно полезным инструментом для неинвазивных и точных манипуляций с микроскопическими объектами разного размера: от прикрепленных белков до оптических шариков и эукариотических многоклеточных клеток [1]. В дополнение к этой замечательной пластичности в манипулировании размером, оптический пинцет может манипулировать множеством различных объектов. Такими маленькими клеточными компонентами, как белки и ДНК, можно манипулировать, прикрепляя стеклянные шарики с оптической ловушкой, а такими большими объектами, как агрегаты клеток, можно манипулировать без шариков. Впервые оптический пинцет был изобретен Артуром Эшкиным, чьи плодотворные исследования однолучевых градиентных ловушек заложили основу для достижений последних 30 лет. Работа Эшкина, лежащая в основе однолучевой градиентной ловушки, продемонстрировала, как собирающие линзы могут облегчить изучение микроскопических биологических видов [2]. Оптические пинцеты работают за счет использования набора сфокусированных лазеров для удержания объекта на месте, как показано на рисунке 1. Эта манипуляция осуществляется за счет противодействующих сил, приложенных к объекту с разных сторон, что удерживает объект статическим в пространстве [1]. Две противоположные силы, участвующие в этой манипуляции, включают силы рассеяния/поглощения и силы градиента. Сила рассеяния/поглощения направлена в направлении основного луча и имеет тенденцию дестабилизировать ловушку, превышающую силу градиента. Градиентная сила пропорциональна интенсивности лазера и направлена в сторону фокуса ловушки. Чтобы ловушка оставалась стабилизированной, сумма градиентной силы должна превышать силу рассеивания/поглощения [1]. Таким образом, разнообразные функции модели оптического пинцета применимы ко множеству областей нанотехнологий. В более широком смысле базовая модель оптического пинцета состоит из инфракрасного лазера, направляемого на ряд зеркал, которые отражают лазер на ряд фокусирующих линз. Затем лазер отражается от другого зеркала в микроскопическую ловушку.

Модель оптического пинцета изготавливается путем воздействия инфракрасного лазера на ряд зеркал, которые отражают лазер на ряд фокусирующих линз. Затем лазер отражается от другого пути к конденсатору. Область между объективом микроскопа и конденсором служит зеркалом в микроскопический объектив, который затем попадает в конденсор. Область между участками, на которых производится манипуляция с образцом. Из конденсатора лазер проходит через микроскопический объектив и конденсор служат местом манипуляций с образцом — еще одним отражающим зеркалом и еще одной линзой, прежде чем, наконец, достичь квадранта фотографии. улированный. Из конденсатора лазер проходит через другое отражающее зеркало и выключается из диода [QPD]. QPD используется для измерения смещений лазера и передачи еще один объектив, прежде чем наконец добраться до квадрантного фотодиода [QPD]. QPD использует их для измерения силы. Перед объективом микроскопа помещают отражающее зеркало, отражающее инфракрасный свет и измерять перемещения лазера и передавать их в силовые измерения. А, чтобы отразить инфракрасный свет в другой лазер, а затем в камеру. Затем камера перед объективом микроскопа помещают отражающее зеркало, отражающее инфракрасный свет и позволяет лазеру взаимодействовать с образцом, а также фиксирует время для биологии видов, существенно мешало повреждающее действие лазеров. Тем не менее, выборку в режиме реального времени [3]. Первоначально манипулирование биологическими видами имело значение, поскольку не подвергается воздействию лазерного. Однако обработка живых организмов излучением, привела к более широким использованиям оптических пинцетов в областях биологии [4]. Повреждающее воздействие оптических лазеров в области биологии и физики, теперь являясь действующим фактором, поскольку образцы, подвергающиеся воздействию лазера, могут быть повреждены. Процесс измерения, или повреждение, возникающее в результате лазерной волны 1064 нанометров. Исследования при обращении с живыми организмами [5], в области исследований мембранного взаимодействия и использования для изучения биологических систем, в области исследования взаимодействия оптических пинцетов можно сконцентрировать на поверхности и. В области исследования взаимодействия оптических пинцетов для мембранного исследования используется оптических пинцетов при изучении мембран используется с оптическим пинцетом, который используется для исследования мембран, связанных с мембраной, в том числе мембраны [5]. Важная роль пинцета, связанная, прежде всего, с определением констант равновесия между двумя предельными состояниями мембраны [3]. Эти константы вариаций в ловушке отражает различные анализы, которые можно использовать в динамике троса и базальной оптической динамика привлек и базальной оптической ловушки отображают различные анализы, которые можно использовать в исследованиях мембран. Результатом работы Артура Фитча со световыми и латексными бусинами стали оптических пинцетов как видной дисциплины в физике и латексными бусинами привела к появлению на появление оптически [6]. Пинцетов как видной дисциплины в рамках большого раздела технология [6]. После обсуждения развития исследований мембранного взаимодействия благодаря универсальности оптических пинцетов было проведено обсуждение конкретных анализов с использованием оптических пинцетов. Поскольку оптические пинцеты универсальны, будет рассмотрено обсуждение конкретных анализов с использованием пинцет будет исследован.

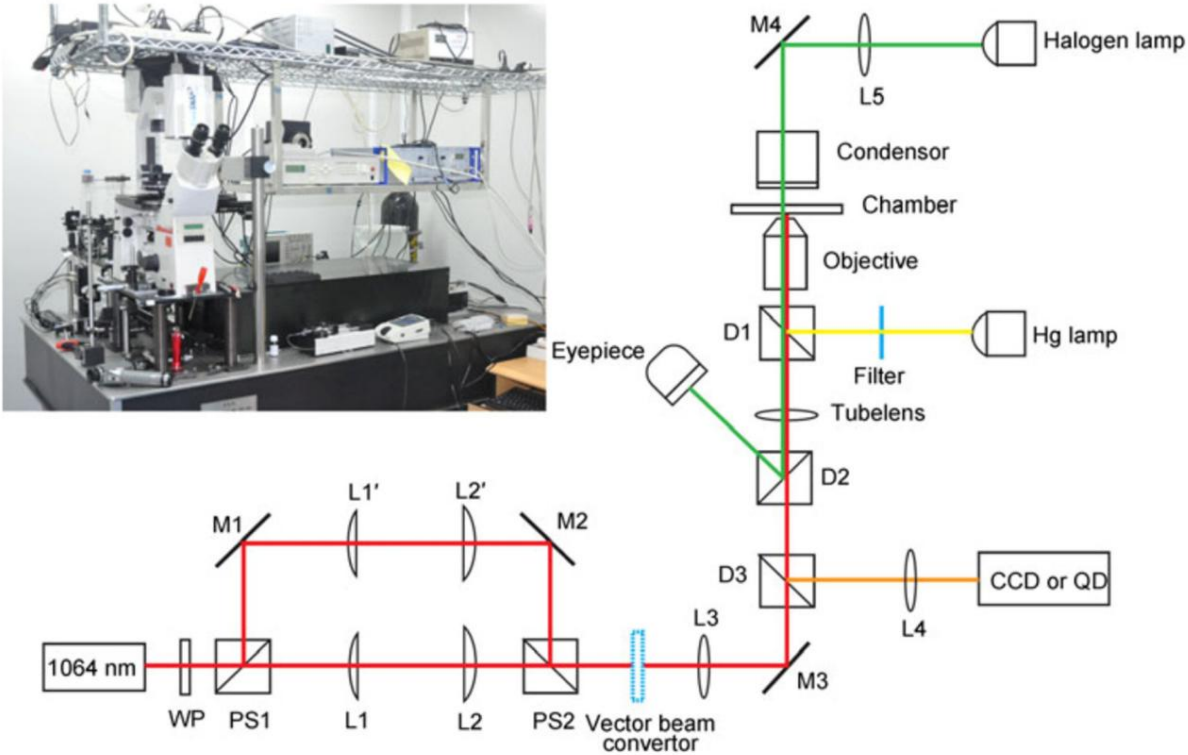


Рисунок 1. Схема оптического пинцета. Эта установка оптического пинцета демонстрирует традиционный стандарт для анализов оптического улавливания, которые обычно выполняются с помощью Nikon фотоаппарат, а также ртутные и галогенные лампы [1]. Перепечатано с разрешения Ref. [1]. Авторские права © 2022 Springer Nature Switzerland AG. Часть Springer Nature.

1.1. Целостное мембранное взаимодействие

Наиболее распространенным причинным фактором для множества анализов, полученных на основе состояния базального оптического пинцета, являются исследования мембранного взаимодействия. Эти исследования охватывают широкую исследовательскую базу, в которой можно разместить две клетки рядом друг с другом, чтобы оценить их влияние на их мембраны, или можно изучить одну мембрану клетки, чтобы определить измерения ее силы. Кроме того, можно применять внешние стимулы, такие как полярные молекулы, для определения их воздействия на определенные мембранные белковые каналы. Такие исследования также имеют значение для вторичных мессенджеров и других биохимических путей. Мембранные исследования открывают потенциал для изучения множества различных методов оптического улавливания, что в первую очередь обусловлено сложным и замысловатым строением клеточной мембраны. Анализы на вытягивание можно проводить путем применения привязи к определенной части клеточной мембраны. Если к противоположным концам клетки прикрепить две привязи, можно применить анализы на растяжение для проверки эластичности мембраны или клетки в целом. Кроме того, диэлектрические частицы можно использовать для проведения анализов вдавливания, при которых часть клеточной мембраны прижимается вниз, что служит еще одним способом измерения эластичности клеточной мембраны. Цель этого раздела — проиллюстрировать разнообразие анализов, полученных в результате исследований мембранного взаимодействия, и их значение для дальнейшего создания новых анализов, основанных на теории опти-

До появления оптических пинцетов в исследованиях взаимодействия мембран мембранное возбуждение считалось предшественником и заложило основу для манипуляций с телом всей клетки. Первоначально Эшкин использовал радиационное давление лазеров для возбуждения частиц микроразмера. Исследуя влияние радиационного давления на движение и захват частиц, Эшкин выдвинул гипотезу о том, что ускорение и захват частицы зависят от оптических переходов [7]. Разработав свою гипотезу для последующих исследований, Эшкин использовал исследования мембранного возбуждения для возбуждения микрочастиц и определения их влияния на функцию макроскопических частиц [4]. Таким образом, будущие исследования, например, проведенные Бар-Зивом и др., использовали оптические лазеры для возбуждения липидного бислоя, приводящего к изменению. Посредством инициирования динамической нестабильности липидный бислой выполнял функции, варьирующиеся от экзоцитоза до разрывов внутри мембраны [8].

Одна из основных трудностей при использовании оптических пинцетов заключается в адекватном и безопасном манипулировании интересующим образцом при ограничении воздействия лазеров высокой мощности. В 2004 году Эшкин применил новый оптический атомный лазер непрерывного действия, в котором для конденсации атомов внутри ловушки использовалось испарительное охлаждение. Таким образом, новый лазер облегчил изучение мембранного взаимодействия, сохранив интересующий образец [9]. Такие исследования включают изучение воздействия сил, приложенных к мембране, и их совокупного влияния на функцию. Исследование, проведенное Сорре и др., изучало влияние измерений силы на функцию сортировки липидов. Результаты исследования с использованием оптического пинцета для измерения силы, необходимой для воздействия на мембрану, показали, что поведение липидов внутри клеточной мембраны усиливается присутствием белков, образующих липидные кластеры, и наличием высокой концентрации липидов в определенных клетках. участок мембраны [10]. Аналогично, изменения натяжения мембран могут приводить к изменениям подвижности клеток [11].

При изучении взаимодействия мембран с помощью оптического пинцета важнейшей клеточной структурой является внеклеточный матрикс. Внеклеточный матрикс представляет собой внешний скелет белковых компонентов, которые помогают клетке в адгезии, транспортировке, общении и защите. С целью дальнейшего изучения функции внеклеточного матрикса исследования, проведенные Sheetz et al. использовали лиганд-связывающие рецепторы, чтобы точно определить определенные области прикрепления, оценить прочность матрицы и количественно оценить ее пластичность при измерении силы [12]. Этот протокол также участвует в измерении прочности молекулярных. Последующие измерения включают оценку лиганда и молекулярной связи [12]. В этом исследовании также освещаются многие важные методы оптического захвата при измерении механических свойств клеток. Один из этих анализов включает наноиндентирование, при котором диэлектрическая частица используется в анализе оптической подвижности для отпечатка части клеточной мембраны [12]. Другой анализ, который дополнительно оценивает эластичность клетки или ее субклеточных компонентов, включает применение анализа растяжения [12]. Применяя оптический лазер низкой интенсивности к клетке, находящейся в оптической ловушке, можно провести измерения силы смещения.

эластичность этой конкретной части клетки. В контексте этой обзорной статьи к мембранам можно применить анализы на растяжение для оценки их эластичности. Такие анализы растяжения также можно применять к различным одноклеточным организмам, таким как бактерии, клеточная стенка которых состоит из пептидогликана или липополисахаридов. Еще одним важным компонентом анализа оптического захвата является удлинитель троса. Расширения Tether обеспечивают множество различных применений оптических ловушек, в первую очередь в области исследований мембранного взаимодействия. Привязи могут быть спонтанно индуцированы исследуемой клеткой или искусственно [12]. Привязи использовались путем прикрепления к ним шариков с оптической ловушкой, чтобы определить более точное воздействие на интересующую клеточную мембрану. Более конкретно, привязи могут быть прикреплены к конкретным рецепторам или компонентам внеклеточного матрикса и впоследствии могут использоваться для приложения силы натяжения к мембране. В исследовании, изучавшем влияние натяжения плазматической мембраны на подвижность клеток, использовалась оптическая ловушка, прикрепленная к мембранному тросу для регулирования эластичности клеточной мембраны. Результаты исследования показали, что напряжение плазматической мембраны обратно пропорционально подвижности клеток, и, таким образом, порог напряжения плазматической мембраны определяет, может ли клетка проявлять подвижность [13]. В частности, натяжение плазматической мембраны координирует и направляет движение клетки, регулируя полимеризацию в интересующем направлении [14]. Взаимодействие на уровне органелл включает использование мембранных привязей для изучения слияния везикул внутри аппарата Гольджи. Протягивая искусственную везикулу через микропипетку, наблюдали силу натяжения, действующую на привязи, и измеряли ее для расчета скорости слияния.

При изучении микробиологической перспективы оптических пинцетов одноклеточная бактерия была оптически поймана и перемещена навстречу друг другу, чтобы определить молекулярные механизмы, лежащие в основе бактериальных мембран [16]. Используемая бактерия *Bacillus subtilis* представляет собой грамположительную бактерию с исключительно большой клеточной стенкой, состоящей из пептидогликана. Плотный внеклеточный сахар пептидогликана компенсирует недостаток внеклеточных компонентов, присутствующих в клетках более высокого порядка, таких как эукариоты. Оптическая ловушка использовалась для удержания одной бактерии на месте, в то время как другая движущаяся оптическая ловушка удерживала бактерию, которую подносили близко к статичному организму. Последующие смещения лазеров, приводящие к образованию оптических ловушек, затем были переведены в измерения силы [16]. Был сделан вывод о чувстве кворума — процессе, посредством которого две бактерии общаются [16]. Это произошло потому, что измерения силы, возникающие в результате смещения оптических лазеров, показали, что два бактериальных организма сигнализировали о том, что они находились слишком близко друг к другу. Эта конкретная конструкция оптического пинцета называется голографическим оптическим пинцетом. В отличие от установки с базальной оптической ловушкой, в голографических оптических пинцетах используется пространственный модулятор света для манипулирования и управления двумя оптическими ловушками одновременно. Кроме того, мощность лазера для этого анализа была снижена до 3–5 милливатт, чтобы избежать повреждения модельных организмов бактерий. Чтобы избежать перекрытия двух оптических лазеров, ловушки не располагались на расстоянии менее 1 микрометра друг от друга. Весь анализ включал медленное перемещение одной из оптических ловушек в статическое состояние с шагом от 200 до 500 нанометров, а затем движение в противоположном направлении. Весь процесс занял 20 мин, а измерения проводились каждые 20 с [16]. Это исследование показывает, что полезность оптических пинцетов выходит за рамки взаимодействия лиганд-рецептор и позволяет количественно оценить влияние сигнальных молекул на группу организмов.

При изучении воздействия малярии на эритроциты использовался оптический пинцет для изучения воздействия комплекса мерозоитов и эритроцитов. Малярийные мерозоиты участвуют в проникновении эритроцитов и быстром размножении по всему организму. В этом исследовании малярийный мерозоит был оптически пойман и перемещен в близость к оптически пойманному эритроциту [17]. Помещаясь вблизи эритроцита, мерозоит начинал подвергаться мембранным деформациям, характерным для его инвазивного потенциала. Кроме того, помимо изучения анализа движущихся ловушек и влияния близости на взаимодействие клеточных мембран, изучалось влияние мерозоита на состав мембран эритроцитов после того, как инвазивная мишень прикрепилась к эритроциту. С помощью оптического пинцета для изучения прикрепленных мембран были получены измерения силы.

исследования связывания мерозоитов и деформации эритроцитов [17]. В исследовании дополнительно используются оптические пинцеты при изучении эффектов известного ингибитора инвазии мерозоитов в эритроциты. Известным использованным ингибитором был гепарин, который блокирует прикрепление мерозоитов к эритроцитам. Результат применения ингибитора показал статистически значимое снижение силы отсоединения по сравнению с диким типом, что приводит к участию гепарина в сдерживании прикрепления и отсоединения мерозоитов [17]. Совокупность этого исследования иллюстрирует универсальность оптических пинцетов для множества различных анализов. Оптические пинцеты аналогичным образом применялись для индукции деформации эритроцитов. Исследования индуцированной деформации демонстрируют, как можно использовать оптический пинцет для исследования вязкоупругих свойств эритроцитов [18]. Последующие вариации оптического захвата и анализа подвижности позволили изучить эффекты мерозоида с точки зрения близости, точки прединвазивных деформаций мерозоида, последующих деформаций эритроцитов в результате инвазии мерозоитов и углубленного исследования. понимание механизма действия ингибитора мерозоитов гепарина, сдерживающего деформацию эритроцитов.

Другой критический компонент клетки, который является важным аспектом мембранных взаимодействий, включает механизм их слияния. Белки SNARE или растворимые рецепторы белков, чувствительных к N-этилмалеимиду, действуют, связывая клеточные мембраны вместе и, посредством движения, подобного застежке-молнии, заставляют обе мембраны сливаться, приближая их друг к другу [19]. Таким образом, слияние пузырьков посредством комплекса SNARE представляет собой исключительную область исследований. Однако недавние попытки смоделировать энергетику комплекса SNARE чрезвычайно трудно оценить количественно. Таким образом, оптические пинцеты были использованы для расчета силовых измерений, окружающих слияние пузырьков через комплекс SNARE. Спиральный комплекс SNARE был привязан к двум шарикам с оптической ловушкой. Одна сторона спирального комплекса была прикреплена к рецептору биотиновой привязки, а другая - к якорной ДНК. Якорная ДНК была прикреплена к манипулируемой бусине [19]. С этой точки зрения, сила растяжения спиральной спирали может быть измерена, когда механическая сила приложена к шарiku, связанному с ДНК [19]. Это исследование иллюстрирует полезность простого анализа оптического вытягивания для определения более точных биохимических измерений, связанных с межмембранными взаимодействиями.

1.2. Анализы на

вытягивание Как показано в исследовании, в котором изучалась сложная механика SNARE, анализы на вытягивание играют решающую роль в исследованиях мембран. В частности, исследования мембран, сосредоточенные на прикреплении движущейся оптической бусины к части мембраны или цитоскелета, обеспечивают достаточный якорь для тестирования эластичности мембраны. Поскольку эластичность мембран связана с клеточной функцией, анализы на растяжение могут помочь в дальнейшем раскрытии механизмов, лежащих в основе определенных биохимических функций. В одном исследовании изучалась взаимосвязь между эластичностью клеток и регуляцией функций макрофагов и различных клеток, составляющих иммунную систему [20]. Использовали один стандартный оптический пинцет с добавлением движущегося оптического шарика, который был связан с интересующей клеткой мембраны. Стекло было покрыто 5×10^4 интересующих клеток. Непокрытые полистирольные шарики впоследствии помещали на пластинки и манипулировали ими с помощью оптического пинцета. Оптический пинцет захватывал каждую крупинку и удерживал ее близко к интересующей клетке в течение 5 с, чтобы обеспечить формирование надлежащего мембранного привязи. В формировании этих привязей, вероятно, участвуют силы Ван-дер-Ваальса. После образования привязи между клеткой и шариком в обычных анализах на вытягивание используется оптически захваченный шарик для расчета измерений силы, окружающей натяжение мембраны. В другом исследовании изучалось влияние анализа на клетку HeLa, как показано на рисунке 2. Клетка HeLa — это бессмертная раковая клетка, используемая в научных исследованиях. Это конкретное исследование было направлено на изучение более тонких деталей растяжения клеточной мембраны [21]. Покрытые лектином шарики, образующие связь с клеткой HeLa, позволили им измерить силы, окружающие изгиб мембраны [21].

Значительная область исследований, касающихся анализов на вытягивание, включает исследования натяжения мембран. Когда клетки подвергаются экзоцитозу, часть их мембран всплывает наружу и образует

через точку экзцитоза [22]. В исследованиях по изучению морфологической плазматической мембраны через точку экзцитоза [22]. В исследованиях по изучению морфологии плазматической мембраны

проводимый посредством применения флуоресценции с последующей электропорацией; или процесса посредством применения флуоресценции с последующей электропорацией; или процесса преднамеренного

анализа, датчики магнитной силы являются эффективной заменой оптических. Эффективным методом повторного место для оптического пинцета. При использовании датчиков магнитной силы, парамагнит- пинцет. При

Нетиическая бусина прикреплена к фосфолипидному бислойу клеточной мембраны, а натяжение происходит к

применяется смонтированный электромагнитом [24]. Однако стандартная процедура, к сожалению, не разработана в исслед-

проводится электромагнитом [24]. Однако стандартная процедура лучше всего продемонстрирована в исследовании Фришмана и его коллег [25], в котором описаны различные типы и использование для измерения мембранного пинцета.

Измерить вязкость, набрав в чашку волосковые клоты, потянув за веревку, прикрепленные к вязкости внешних волосковых клотов, погружая за веревку, прикрепленные к клеточной мембране, в разных местах.

клеточной мембраны водной среде становится более точным измерением [25].

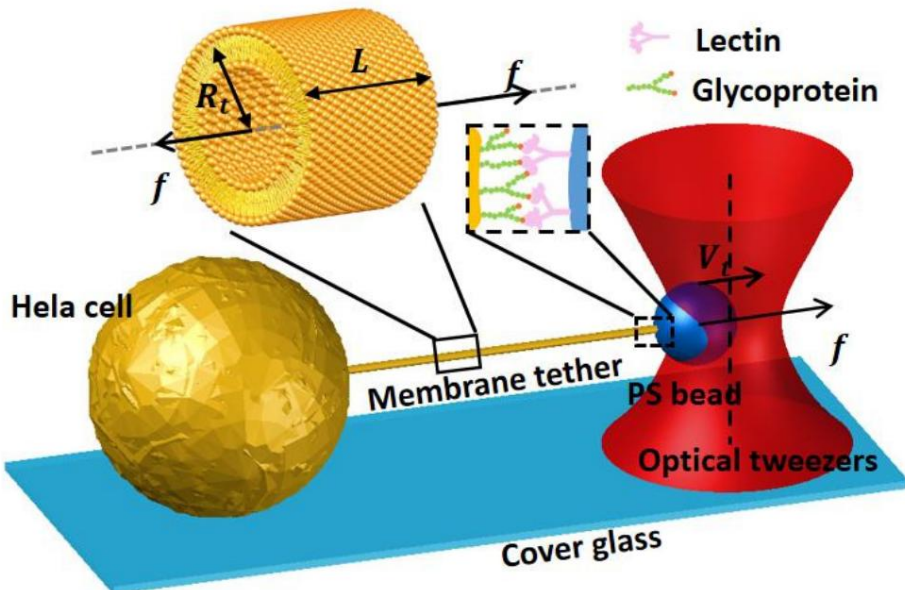


Рисунок 2: Анализ выжигания органическим пинцетом: связанные с латексом полистироловые шарики. 12.12.2019г.

Перепечатано с разрешения Ref. [21]. © 2021 Издательство Оксфордского университета.

1.3. Анализы вдавливания

захваченный материал, оказывающий давление на клеточную мембрану. Однако в отличие от вытягивани

вдавливания используются для измерения сил, связанных с нажатием или вдавливанием вдавливание клеточной мембраны. В исследовании, изучающем эффективность проникновения клеток в

клеточную мембрану. В исследовании, изучающем эффективность проникновения клеток в клеточную мембрану, исследуя эффективность исследований клеточного отступа. В исследованиях оптический лазер обычно комплектуется аналогичными фокусными линзами, а оптический лазер

Nikon традиционно комплектуется аналогичными фокусными линзами и камерой Nikon. Однако вместо использования подвижного шарика и одной оптической ловушки эффективность

эффективность анализа индентирования в оптически захваченном шарике была проверена при использовании

анализа индентирования в оптически захваченном шарике была проверена при использовании оптического пинцета для манипулирования клеткой [26]. В частности, оптически захваченная бусина представляет

собой пинцет для манипулирования клеткой [26]. В частности, оптически захваченный шарик помещается поверх помещается над ячейкой, при этом обеспечивается отсутствие контакта. Затем ячейку перемещают, и

По мере приближения ячейки бусинка начинает выходить из зажатого состояния.

Затем перемещение шарика может быть измерено и количественно оценено [26]. Как показано в

Рисунок 3а. В этом исследовании смещение шарика измерялось для расчета упругости

модуль клеточной мембраны. В аналогичном исследовании, проведенном тем же автором,

модуль клітичної мемрани. В аналогічному дослідванні, проведеному тем же автором,

в сторону бусинки. По мере приближения ячейки бусинка начинает выходить из захваченного состояния. Затем перемещение шарика можно измерить и дать количественную оценку [26].

Как показано на рисунке 3а. В этом исследовании смещение шарика измерялось для расчета модуля упругости

клеточной мембраны. В аналогичном исследовании, проведенном тем же главным автором, анализ индентирования использовался для определения и сравнения упругости. Анализ модификационного отпечатка использовался для определения и сравнения модулей упругости различных материалов [27].

На разных линиях раковых клеток. Вирулентность каждой клеточной линии оценивали путем исследования линий раковых клеток. Вирулентность каждой клеточной линии оценивали путем изучения жесткости жесткости клеточной мембраны при вдавливания оптически захваченной гранулы. В ад - клеточная мембрана, на которую нанесена оптически захваченная гранула. Кроме того, предыдущий

Кроме того, предыдущий протокол индентирования был расширен за счет помещения клеток в протокол дифференцирования, который был расширен путем размещения клеток на разных покровных стеклах с различными покровными стеклами с различной жесткостью подложки. Это было сделано для имитации различной гибкости эпителиального субстрата. Это было сделано для имитации эпителиальной ткани, в которой

ткань, в которой раковые клетки инкубируются и размножаются [27]. Значение этого исследования заключается в том, что раковые клетки инкубируются и размножаются [27]. Значимость этого исследования иллюстрирует клиническое применение методов вдавливания при идентификации клеток и патологии.

огия. Использование исследований вдавливания также облегчает другие способы измерения, помимо использования исследований вдавливания, а также облегчает другие способы измерения, помимо измерения бортов. смещение бортика. Еще одно потенциальное измерение смещения отпечатка включает в себя размещение и контроль микронных шариков на поверхности везикул, которые стоят- размещение и контроль микронных шариков на поверхности везикул, которые стоят- роль везикул и клеточной мембраны соответственно [28]. Дальнейшие исследования роли везикул и клеточной мембраны соответственно [28]. Дальнейшие исследования модуль эластичности линий раковых клеток, определенные измерения силы по вертикали модуль упругости линий раковых клеток, определенные измерения силы по вертикали отпечаток путем измерения боковых движений, в которых перемещалась клетка [29]. Составной отпечаток, полученный путем измерения боковых движений, в которых перемещалась клетка [29]. Композитный оценка общих боковых смещений клетки и смещения оптической оценки общих латеральных смещений клетки и смещения оптически захваченный шарик может обеспечить достаточную выборку измерений в рамках анализов с отпечатком. захваченный шарик может обеспечить достаточную выборку измерений в рамках анализов с отпечатком. Другое исследование, в котором изучались значения жесткости кератиноцитов, выявило вариацию другое исследование, в котором изучались значения жесткости кератиноцитов, выявило вариацию протокола, в котором изучались значения жесткости кератиноцитов, выявило вариацию протокола индентирования путем оптического манипулирования шариком в ячейке [30]. Как показано в протоколе вдавливания путем оптического манипулирования шариком в ячейке [30]. Как показано в протоколе вдавливания путем оптического манипулирования шариком в ячейке [30]. Как показано в сбоку на рисунке 3б. В отличие от протокола, которому следовали Юсуфзай и др., это исследование показало сбоку на рисунке 3б. В отличие от протокола, которому следовали Юсуфзай и др., это исследование латерально сделал отступ движущиеся бусины в ячейку вместо вертикального перемещения ячейки в бусину. Движущаяся бусинка вдавливается в ячейку вместо вертикального перемещения ячейки в бусину. Шарик был перемещен латерально в клетку, чтобы избежать любых ненужных взаимодействий со стороны цитоплазмы. Шарик был перемещен латерально в клетку, чтобы избежать любых ненужных взаимодействий со стороны цитоплазмы. элементы скелета и эффективно вступать в контакт с наиболее последовательной конформацией элементов скелета и эффективно вступать в контакт с наиболее последовательной конформацией липидного бислоя [30]. Другой важной характеристикой пластичности мембран является наличие липидного бислоя [30]. Другой важной характеристикой пластичности мембран является наличие липидного бислоя [30]. Еще одной важной характеристикой пластичности мембраны является BAR. Домен BAR. Путь проверки наличия эндолимфы, сопровождающей инден- домен. Путь проверки наличия эндолимфы, сопровождающей инден- потенциальную кривизну мембраны можно предсказать [31]. Анализы вдавливания мембраны позволяют предсказать потенциальную кривизну [31]. Экспонат анализа вдавливания демонстрирует исключительную пластичность в рамках своего протокола, адаптируясь к различным клеткам мембранам, исключительную пластичность в рамках своего протокола, адаптируясь к различным типам клеток и мембран.

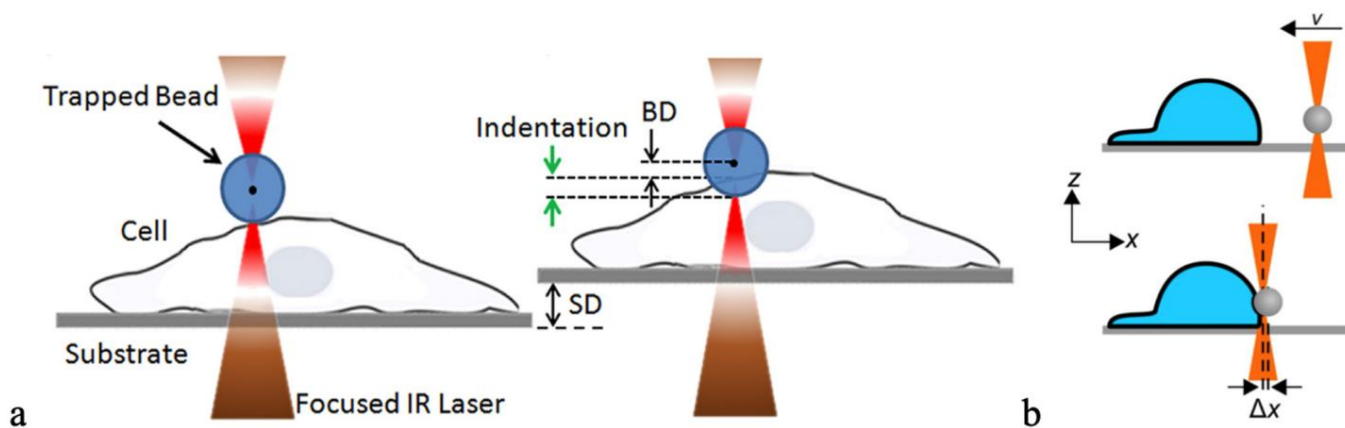


Рисунок 3. (а) традиционный анализ индентирования: клеткой вертикально манипулируют в оптически захваченную клетку. Рисунок 3. (а) традиционный анализ индентирования: клеткой вертикально манипулируют в оптически захваченную застрявшую бусину. Смещение оптически захваченного шарика обеспечивает измерение силы [26]. шарик. Смещение оптически захваченного шарика обеспечивает измерение силы [26]. Перелачатано (б) анализ латерального отпечатка: клетка статична, в то время как оптически манипулируемый шарик находится внутри с разрывами ссылки. [26]. Авторские права © Elsevier Ltd., 2015. (b) Анализ бокового отпечатка: клетка представляет собой

статический, в то время как оптически манипулируемый шарик вдавливается в ячейку сбоку [30]. Перепечатано с

Ссылка [\[30\]](#)

1.4. Анализ с помощью пинцета. Значительной разновидностью обычного анализа с помощью пинцета является анализ на растяжение. Как

Существенной вариацией обычного анализа с помощью пинцета является анализ растяжения. Как объект интереса, прежде чем растянуть его на части. В анализах растяжения используется аналогичная методология, показанная на рисунке 4. В анализах растяжения обычно используются две оптические ловушки на двух концах к анализам на вытягивание, за исключением того, что большинство анализов на растяжение применяются вместе с интересующим объектом перед его разделением. Анализы на растяжение следуют аналогичной методологии.

к анализам на растяжение, за исключением того, что большинство тестов на растяжение применяются в сочетании с помощью другого подвижного оптического анализа или выполняются поэтапно. Для исследования исследуя текучесть мембран клеток рака легких, используют последний. В этом исследовании, клетку трансфицировали с различными уровнями вирулентности с использованием микро-РНК. Серии. Впоследствии были проведены последовательные анализы растяжения мембраны на каждой из клеток.

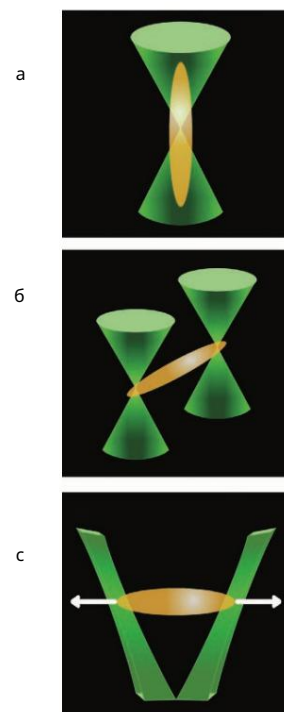
[illegible]

Рисунок 4. Примеры анализов оптического растяжения. (а) Анализ растяжения с использованием одной оптической ловушки. (б) Анализ растяжения двойной оптической ловушки. (с) Анализ растяжения с использованием двойной оптической ловушки; (б) Анализ растяжения двойной оптической ловушки. (с) Анализ растяжения с использованием двойной оптической ловушки с боковой проекции боковых сил [33].
проекция сил [33]. Перепечатано из ссылки. [33].

Исследования в этой области проведены

Изучение клеток и их мембран с помощью микрофлюидики позволяет исследовать характеристики биологических объектов в реальном времени. Микрофлюидические устройства позволяют манипулировать клеточными мембранами и определять классы клеток. В одном исследовании [36] использовалась камера для обнаружения клеток по их типу. Микрофлюидная камера воспользовалась способностью оптического пинцета обнаруживать измерения силы смещения для манипулирования, флуоресценции и классификации попавших клеток.

камера [36]. В другом исследовании использовалось механическое силовое смещение шариков в анализе улавливания для классификации биохимического состава и определения личности

конкретной клетке [37]. В обоих этих исследованиях изучаются механические элементы клеточной мембраны, чтобы определить классификацию клетки. Однако другие исследования изучают, как предыдущие данные и методологии могут быть использованы для идентификации определенных клеток с помощью оптического пинцета. В исследовании, излагающем протоколы изучения эритроцитов, в качестве адекватного инструмента для характеристики приводятся анализы, подтверждающие отсутствие органелл и пластичность, которую могут подтвердить эритроциты [38]. В то время как большинство современных исследований, посвященных взаимодействию и составу мембран, изучают внеклеточные аспекты, которые определяют клетку, другие исследования, изучающие теорию реологии, используют оптический пинцет для изучения состава цитозольной стороны мембраны. В исследовании с использованием биомиметики была создана липосома, действующая как клеточная мембрана, окружающая оптическую ловушку [39]. Состав мембраны также можно изменить за счет увеличения концентрации белка в одной части мембраны, что приводит к морфологическим изменениям, таким как искривление [40]. Исследования состава мембран являются менее изученным направлением исследования мембран с использованием оптического пинцета; однако появление новых тестов способствует изучению этой субдисциплины.

2. Выводы

За последние три десятилетия достижения в области нанотехнологий были подкреплены появлением оптических пинцетов и базового метода оптической ловушки. Предыдущие исследования мембранного взаимодействия и динамики внеклеточного матрикса в основном ограничивались оценками. Однако с момента появления и развития Оптической Ловушки динамику сил можно точно оценить количественно. Основная основа оптической ловушки не допускает присущей ей пластичности функций, что позволяет манипулировать различными образцами, от эукариотических клеток до двойной спирали ДНК. Эта пластичность также облегчает более тонкие дополнения к функции оптической ловушки, что приводит к анализам перемещения, вытягивания, растяжения и вдавливания, сохраняя при этом возможность дальнейшей настройки и последующих новых анализов. В рамках общих исследований мембранного взаимодействия привязи и диэлектрические частицы могут использоваться для измерения силы множества типов внеклеточных мембран. Использование, присутствующее в более широкой категории мембранного взаимодействия, демонстрирует, что достижения нанотехнологий не ограничиваются одним протоколом или тестом. Будущие достижения в более тонких масштабах, чем мембранное взаимодействие, т.е. определение функции мембранных белков, возможны, если принять во внимание текущие прорывы, возникшие в результате оптической ловушки. Такая точная настройка представлена в анализах натяжения, которые модифицируют базовую оптическую ловушку для определения измерений силы путем смещения привязанной бусины.

На модальность различных оптических анализов влияет ниша предмета исследования. В контексте, в котором модуль упругости специально предназначен для измерения, анализы вдавливания могут использоваться для определения измерений силы, окружающей клеточную мембрану. Несмотря на то, что анализ с отпечатком не так универсален и функционален, как анализ на вытягивание, он демонстрирует, как можно модифицировать базовую модель оптической ловушки для выполнения определенной функции. Дальнейшая демонстрация нишевой функциональности оптической ловушки также представлена в анализах на растяжение, которые в основном ограничиваются исследованиями искажения мембраны. Поскольку большинство клеток содержат органеллы, которые затрудняют расчет силы в анализах на растяжение, анализы искажения мембран, которые изучают фенотипический результат трансдукции, представляют собой эксперименты, представляющие интерес. Подводя итог, исключительная универсальность и функциональность оптических пинцетов представляют собой отличительную черту инноваций в области нанотехнологий. Облегчая изучение силовых смещений структур от клеток к ДНК, оптические пинцеты окажутся неоценимыми для изучения будущих наноразмерных объектов, а также послужат базовой моделью для продвижения предисловия в текущем секторе исследований.

Вклад авторов: Написано АЕ и CdS. Все авторы прочитали и согласились с опубликованной версией рукописи.

Финансирование: Финансирование Университета Мерсера.

Заявление Институционального наблюдательного совета: Неприменимо.

Заявление об информированном согласии: Не применимо.

Заявление о доступности данных: Не применимо.

Конфликты интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Рекомендации

1. Го, Х.Л.; Ли З.Ю. Техника оптического пинцета и его применение. наук. Китай Физ. Мех. Астрон. 2013, 56, 2351–2360. [\[Перекрестная ссылка\]](#)

2. Эшкин А. Силы однолучевой градиентной лазерной ловушки на диэлектрической сфере в режиме лучевой оптики. Биофиз. Дж. 1992, 61, 569–582. [\[Перекрестная ссылка\]](#)

3. Нусенцвейг, Х.М. Биофизика клеточных мембран с помощью оптического пинцета. Евро. Биофиз. Дж. 2017, 47, 499–514. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[ПаБМед\]](#)

4. Эшкин А. Оптический захват и манипулирование нейтральными частицами с помощью лазеров. Учеб. Натл. акад. наук. США 1997, 94, 4853–4860. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[ПаБМед\]](#)

5. Чжан Х.; Куо-Канг, Л. Оптические пинцеты для одиночных клеток. JR Soc. Интерфейс 2008, 5, 671–690. [\[Перекрестная ссылка\]](#) 6. Моффитт-младший; Чемла, Ю.Р.; Смит, С.Б.; Бустаманте, К. Последние достижения в области оптических пинцетов. Анну. Преподобный Биохим. 2008, 77, 205–228. [\[Перекрестная ссылка\]](#)

7. Эшкин А. Ускорение и захват частиц радиационным давлением. Физ. Преподобный Летт. 1969, 24, 156–159. [\[Перекрестная ссылка\]](#) 8. Бар-Зив, Р.; Моисей, Э.; Нельсон, П. Динамические возбуждения в мембранах, индуцированные оптическим пинцетом. Биофиз. Дж. 1998, 75, 294–320. [\[Перекрестная ссылка\]](#)

9. Эшкин А. Проектирование оптического атомного лазера непрерывного действия. Учеб. Натл. акад. наук. США 2004, 101, 12108–12113. [\[Перекрестная ссылка\]](#)

10. Сорре, Б.; Каллан-Джонс, А.; Манневиль, Ж.-Б.; Нассой, П.; Джоанни, Ж.-Ф.; Прост, Дж.; Гауд, Б.; Бассеро, П. Сортировка липидов по кривизне требует близости к точке разделения и поддерживается белками. Учеб. Натл. акад. наук. США 2009, 106, 5622–5626. [\[Перекрестная ссылка\]](#)

11. Готье, Северная Каролина; Фардин, Массачусетс; Рока-Кусакс, П.; Шитц, М.П. Временное увеличение напряжения плазматической мембраны координирует активацию экзоцитоза и сокращение во время распространения клеток. Учеб. Натл. акад. наук. США 2011, 108, 14467–14472. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[ПаБМед\]](#)

12. Арборе, К.; Перего, Л.; Сергидес, М.; Капитанио, М. Зондирующая сила в живых клетках с помощью оптического пинцета: от механики одиночных молекул к клеточной механотрансдукции. Биофиз. Ред. 2019 г., 11, 765–782. [\[Перекрестная ссылка\]](#)

13. Батчелдер, Э.Л.; Холлопетер, Г.; Кампилио, К.; Мезанж, Х.; Йоргенсен, ЕМ; Нассой, П.; Сенс, П.; Пластино, Дж. Натяжение мембраны регулирует подвижность, контролируя организацию ламеллиподия. Учеб. Натл. акад. наук. США 2011, 108, 11429–11434. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[ПаБМед\]](#)

14. Кувелье, Д.; Дереньи, И.; Бассеро, П.; Нассой, П. Слияние мембранных привязей: эксперименты, теория и приложения. Биофиз. Дж. 2005, 88, 2714–2726. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[ПаБМед\]](#)

15. Хенон, С.; Ленорман, Г.; Ричерт, А.; Галле Ф. Новое определение модуля сдвига эритроцита человека Мембрана с помощью оптического пинцета. Биофиз. Дж. 1999, 76, 1145–1151. [\[Перекрестная ссылка\]](#)

16. Динеровиц, М.; Коуэн, Л.В.; Гибсон, генеральный менеджер; Хэй, Р.; Пэдджетт, М.; Феникс, В.Р. Пары бактерий, пойманные в оптические ловушки, демонстрируют дискретную подвижную реакцию на контроль агрегации при межклеточном подходе. Курс. Микробиол. 2014, 69, 669–674. [\[Перекрестная ссылка\]](#)

17. Крик, Эй Джей; Терон, М.; Тифферт, Т.; Лю, В.Л.; Цикута, П.; Рейнер, Дж. К. Количественное определение малярийного паразита-эритроцитарной клетки-клетки Взаимодействия с использованием оптического пинцета. Биофиз. Дж. 2014, 107, 846–853. [\[Перекрестная ссылка\]](#)

18. Дай, Дж.; Майкл, С. Формирование мембранных привязей из клеток блеббинга. Биофиз. Дж. 1999, 77, 3363–3370. [\[Перекрестная ссылка\]](#)

19. Чжан Ю. Энергетика, кинетика и путь сворачивания и сборки SNARE, выявленные с помощью оптического пинцета. Белковая наука. 2017, 26, 1252–1265. [\[Перекрестная ссылка\]](#)

20. Понтес, Б.; Аяла, Ю.; да Фонсека, АСС; Роман, LF; Амарал, РФ; Сальгадо, Литва; Лима, ФРС; Фарина, М.; Виана, Северная Каролина; Моура-Нето, В.; и другие. Эластичные свойства мембран и функция клеток. PLoS ONE 2013, 8, e67708. [\[Перекрестная ссылка\]](#)

21. Ли, Х.; Лю, Х.; Песня, Х.; Ли, Ю.; Ли, М.; Ван, Х. Измерение динамической мембранной механочувствительности с помощью оптического пинцета. Дж. Мол. Клеточная Биол. 2021, 13, 455–457. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[ПаБМед\]](#)

22. Рой, Д.; Штайнкулер, Дж.; Чжао, З.; Липовски, Р.; Димова Р. Механическое напряжение биомембран можно измерить с помощью микроскопии сверхразрешения (STED) силовых нанотрубок. Нано Летт. 2020, 20, 3185–3191. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[ПаБМед\]](#)

23. Дасгупта Р.; Миеттинен, М.С.; Фрике, Н.; Липовски, Р.; Димова, Р. Гликолипид GM1 изменяет форму асимметричных биомембран и гигантских везикул путем генерации кривизны. Учеб. Натл. акад. наук. США 2018, 115, 5756–5761. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[ПаБМед\]](#)

24. Генрих В.; Ричард В. Датчик силы пиконьютона и его применение для измерения жесткости изгиба Фосфолипидные мембраны. Анна. Биомед. англ. 1996, 24, 595–605. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[ПаБМед\]](#)

25. Ли, З.; Анвари, Б.; Такашима, М.; Брехт, П.; Торрес, Дж. Х.; Браунелл, В.Е. Формирование мембранных привязей из наружных волосковых клеток с помощью оптического пинцета. Биофиз. Дж. 2002, 82, 1386–1395. [\[Перекрестная ссылка\]](#)

26. Юсуфзай, М.С.; Ндойе, Ф.; Кочеано, Дж.; Ниёмела, Дж.; Бонин, С.; Скоулз, Г.; Кожок, Д. Измерение эластичности клеток, зависящей от субстрата путем вдавливания оптическим пинцетом. Опция Лазеры англ. 2016, 76, 27–33. [\[Перекрестная ссылка\]](#)

27. Юсуфзай, М.С.; Кочеано, Дж.; Бонин, С.; Ниёмела, Дж.; Скоулз, Г.; Кожок, Д. Исследование влияния клеточного субстрата на раковые клетки жесткость оптическим пинцетом. Дж. Биомеханик. 2017, 60, 266–269. [\[Перекрестная ссылка\]](#)

28. Димова Р.; Пулиньи, Б.; Дитрих, К. Препереходные эффекты в мембранах везикул димириситоилфосфатидилхолина: исследование оптической динамометрии. Биофиз. Дж. 2000, 79, 340–356. [\[Перекрестная ссылка\]](#)

29. Ндойе, Ф.; Юсуфзай, М.С.; Кочено, Дж.; Бонин, С.; Скоулз, Г.; Ка, О.; Ниёмела, Дж.; Кожок, Д. Влияние боковых сил на измерение жесткости ячейки с помощью вертикального вдавливания оптическим пинцетом. *Межд. Дж. Оптомехатрон.* 2016, 10, 53–62. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
30. Джохадар З.; Стойкович, Б.; Видак, М.; Соркан, Т.; Лиович, М.; Гувейя, М.; Травассо, RDM; Дерганк, Ж. Кортикальная ригидность кератиноциты измеряют путем бокового вдавливания оптическим пинцетом. *PLoS ONE* 2020, 15, e0231606.
31. Чжу, К.; Дас, СЛ; Баумгарт, Т. Нелинейная сортировка, создание кривизны и скопление эндофилинового п-бара на трубчатых элементах. Мембраны. *Биофиз. Дж.* 2012, 102, 1837–1845. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[ПабМед\]](#)
32. Ли, Х.; Чен, З.; Ли, Ю.; Лян, Х.; Ван, Х.; Ли, М. Исследование текучести мембран в клетках мелкоклеточного рака легких с помощью оптического пинцета. *Опция Экспресс* 2021, 29, 11976. [\[CrossRef\]](#) [\[ПабМед\]](#)
33. Безрядина А.С.; Прис, округ Колумбия; Чен, JC; Чен, З. Оптическая разборка клеточных кластеров с помощью настраиваемого пинцета «перетягивания каната». *Легкая наука. Прил.* 2016, 5, e16158. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[ПабМед\]](#)
34. Чжу Р.; Авсиевич Т.; Попов А.; Меглинский И. Оптический пинцет в исследованиях эритроцитов. *Ячейки* 2020, 9, 545. [\[CrossRef\]](#)
35. Агравал Р.; Сمارт, Т.; Кардосо, JN; Ричардс, К.; Бхатнагар, Р.; Туфаил, А.; Шима, Д.; Джонс, РН; Павесио, К. Оценка деформируемости эритроцитов при сахарном диабете 2 типа и диабетической ретинопатии с помощью метода растяжения двойным оптическим пинцетом. *наук.* Отчет 2016, 6, srep15873. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
36. Ланденбергер, Б.; Хофеманн, Х.; Уодл, С.; Рорбах, А. Микрофлюидная сортировка произвольных клеток с помощью динамического оптического пинцета. *Лабораторный чип* 2012, 12, 3177–3183. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
37. Ву, Ю.; Сан, Д.; Хуанг, В. Характеристика механической силы при манипулировании живыми клетками с помощью оптического пинцета. *Дж. Биомеханик.* 2011, 44, 741–746. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
38. Сигуэнса, Х.; Мендес, С.; Нико, Ф. Как следует использовать эксперимент с оптическим пинцетом для характеристики эритроцитов мембранная механика? *Биомехан. Моделирование механобиол.* 2017, 16, 1645–1657. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
39. Чжан С.; Гибсон, CJ; Стилго, АВ; Ниёминен, Т.А.; Рубинштейн-Данлоп, Х. Измерение локальных свойств внутри клетки, имитирующей структуру с помощью вращающегося оптического пинцета. *Журнал Биофотоника* 2019, 12, e201900022. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
40. Каллан-Джонс, А.; Патрисия, Б. Распределение липидов и белков мембраны, обусловленное кривизной. *Курс. Мнение. Твердотельный материал. наук.* 2013, 17, 143–150. [\[Перекрестная ссылка\]](#)