

Merilni sistem za poskuse na ravninskih lipidnih dvoslojih

Marko Puc, Damijan Miklavčič

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za elektrotehniko, Tržaška 25, 1000 Ljubljana, Slovenija
E-pošta: {mac, damijan}@svarun.fe.uni-lj.si

Povzetek. Elektroporacija je pojav, pri katerem s kratkotrajnim visokonapetostnim električnim impulzom v membrani biološke celice povzročimo strukturne spremembe. Pore, ki nastanejo v plazmalemi, povečajo prepustnost, zato lahko snovi neposredno vstopajo v celico. Namen trenutnih raziskav, ki se izvajajo na področju elektroporacije, je določiti optimalne parametre elektroporacije ter pojasniti mehanizme elektroporacije na molekularni ravni. V ta namen izvajamo poskuse na različnih ravneh: tkivni, celični in molekularni. Osredotočili se bomo predvsem na opis poskusov na ravninskih lipidnih dvoslojih, kjer lahko pojav opazujemo na molekularni ravni. Študije na ravninskih lipidnih dvoslojih temeljijo na dveh metodah, in sicer: metodi nabojskega impulza in metodi vpete napetosti. Za izvajanje poskusov potrebujemo poseben merilni sistem, ki je sestavljen iz: teflonske komore, v kateri naredimo lipidni dvosloj; funkcijskega generatorja, ki ga potrebujemo za vzbujanje; merilnika toka za merjenje toka skozi lipidni dvosloj; merilnika napetosti za merjenje napetosti na lipidnem dvosloju in hitrega stikala, ki ga potrebujemo pri metodi nabojskega impulza. V delu so poleg obeh metod, ki se uporabljata pri preiskavah na ravninskih lipidnih dvoslojih, opisane še izvedba in lastnosti merilnikov toka in napetosti. V dodatku je podana še analiza hitrih operacijskih ojačevalnikov, ki smo jo naredili v času razvoja merilnega sistema.

Glavne besede: elektroporacija, lipidni dvosloji, operacijski ojačevalnik

Measurement System for Experiments on Planar Lipid Bilayers

Extended abstract. The use of high voltage electric pulse technology, electroporation, in cell biology, biotechnology and medicine has attracted an enormous interest. Electroporation is a transient phenomenon that increases permeability of the cell plasma membrane. In the state of high permeability, the plasma membrane allows small and large molecules to be introduced into the cytoplasm, although the cell plasma membrane represents a considerable barrier for them in its normal state. Effectiveness of electroporation depends on many parameters that can be divided in parameters of the electric field and parameters that define the state of cells, i.e. temperature, osmotic pressure, etc. [1, 2, 3]

The aim of the studies that are performed in the field of electroporation can be divided in two areas: optimization of electric field parameters and explanation of mechanisms of electroporation on the molecular level. In all the studies, many experiments are performed *in vivo*, *ex vivo* and *in vitro* but in all these types of experiments results are obtained in several hours or even weeks. Besides that these experiments cannot be observed on the molecular level. Studies on the molecular level are performed in special Teflon chambers (Fig. 1) where an artificial planar lipid bilayer is formed with a folding technique that was presented a decade ago. This type of experiments allows us to measure the electric characteristics of the planar lipid bilayer, which is a model of the cell plasma membrane. Furthermore, we can add different proteins that are built into the planar lipid bilayer and results are obtained immediately [6, 7, 10].

There are different methods of measuring electric characteristics of the planar lipid bilayer but we only focused on two that are often used: charge pulse and voltage clamp. In the charge

pulse method the planar lipid bilayer is exposed to the electric pulse only for a limited time. After the switch **S** (see Fig. 1) is switched off, the discharge of the transmembrane voltage is observed throughout the external resistor **R**. Traces of signals that are observed in the charge pulse method are shown in Fig. 2. In the voltage clamp method the rectangular pulse is followed by a ramp of a specific slope, also shown in Fig. 2. With this method the time course of electroporation of the planar lipid bilayer can be observed. To perform measurements, we have to have a measurement system that consists of a function generator, a fast switch, a volt- and ampere meter [6, 7, 10]. In our paper we only describe the structure of the volt- and ampere meter since we used an existing function generator (Tektronix AFG310) and a simple circuit with an analog electronic switch to form the whole measurement system.

The described measurement modules were designed so that they allow measurement of signals of arbitrary shapes and not just signals that are measured in a charge pulse or voltage clamp method. Requirements for both measurement modules are shown in Table 1 where the frequency means maximal frequency of a signal of an arbitrary shape.

A commonly used technique to measure the current in this kind of experiments is to convert current to voltage [6, 7]. An ampere meter that is shown in Fig. 4, comprises a transimpedance amplifier and an inverting amplifier. The circuit converts the input current into voltage where the relation between the output voltage and the input current is given by Eq (2).

A measurement of the voltage with an operational amplifier can be performed with a differential amplifier or with an instrumental amplifier. We decided to use an instrumental amplifier, shown in Fig. 6, due to its better input characteristics [11, 12]. The voltage that is measured between two inputs can be obtained

from the output voltage by division with amplification of the instrumental amplifier given by Eq. (3).

Results of test measurements that are shown in Figs. 7 and 8 show that both measurement modules fulfill requirements given in Table 1. Nevertheless, to meet all these requirements, some improvements will have to be made.

Development of measurement modules forced us to analyze differences in high speed amplifiers. A brief report on an analysis is given in Appendix to this paper.

Key words: electroporation, planar lipid bilayers, operational amplifier

1 Uvod

Elektroporacija je pojav, pri katerem s kratkotrajnim visokonapetostnim električnim impulzom v membrani biološke celice povzročimo strukturne spremembe. Pore, ki nastanejo v plazmalemi, povečajo prepustnost, zato lahko snovi neposredno vstopajo v celico [1]. Pri tem je treba poudariti, da je proces popolnoma reverzibilen in celice ohranijo viabilnost, če so parametri elektroporacije pravilno izbrani. Pri nepravilno izbranih parametrov (npr. prevelika amplituda, preveliko število, predolgo trajanje impulzov) pride do trajnih poškodb plazmaleme, kar povzroči uničenje celice. Če te parametre pravilno izberemo, pa ima metoda pred drugimi (npr. biokemičnimi) metodami nekaj prednosti:

- lahko jo uporabimo na vsaki celici,
- je specifična za plazmalemo in ne prizadene membran celičnih organel,
- povzroči le minimalne motnje membranskih funkcij [2].

Elektroporacija se uporablja za vnos snovi v celice na različnih področjih biologije in medicine. Nekatera področja uporabe so: molekularna genetika, elektroterapija, vstavljanje proteinov v membrano in vnos zdravil skozi kožo [3].

Na elektroporacijo in povečanje prepustnosti plazmaleme ter vnos snovi v celico vplivajo številni parametri. Te lahko razdelimo na parametre električnega polja in parametre, ki so povezani s stanjem celice [3]. Izbira parametrov električnega polja je ključna za učinkovitost elektroporacije. Zato je pomembno, da je električna poljska jakost večja od pragovne in hkrati dovolj nizka, da plazmaleme ne poškoduje trajno. Učinkovitost lahko pri neki pragovni vrednosti jakosti električnega polja povečamo s povečanjem števila impulzov in podaljšanjem trajanja impulzov [4]. Pri tem je izbira vrednosti parametrov omejena z njihovim vplivom na preživetje celic. Vpliva parametrov, povezanih s stanjem celic, ne bomo opisovali, lahko pa povemo, da mednje štejemo temperaturo, osmotski tlak, prevodnost medija in popolnost celičnega skeleta.

Namen trenutnih raziskav, ki se izvajajo na področju elektroporacije, je določiti optimalne parametre elektroporacije ter pojasniti mehanizem elektroporacije na molekularni ravni. V ta namen izvajamo poskuse na različnih ravneh: tkivi, celični in molekularni. Poskusi na molekularni ravni oziroma na lipidnih dvoslojih [5, 6], ki jih bomo opisali v nadaljevanju, so pripeljali do prvih teoretičnih opisov mehanizmov elektroporacije. Poleg tega imajo poskusi na tej ravni nekaj prednosti pred drugimi.

- Poskus omogoča natančno določitev karakteristike lipidnega dvosloja in s tem modela celične membrane.
- Za izvajanje poskusov potrebujemo le specifičen merilni sistem, medtem ko pri drugih potrebujemo visokonapetostni generator impulzov.
- Rezultati poskusa so na voljo takoj.

Poleg opisa poskusov na lipidnih dvoslojih bomo v nadaljevanju opisali tudi izdelani merilni sistem ter v dodatku podali analizo hitrih operacijskih ojačevalnikov, ki smo jo opravili v času razvoja merilnega sistema.

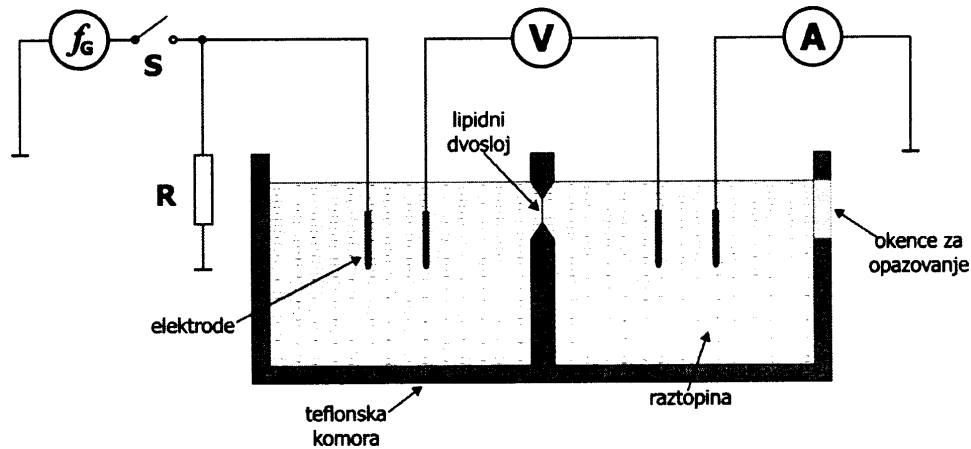
2 Poskusi na lipidnih dvoslojih

Na splošno prevladuje mnenje, da je sprememba prepustnosti biološke membrane pod vplivom električnega polja posledica strukturnih sprememb v lipidnem dvosloju membrane [7, 8, 9, 10]. Zato lahko vsaj nekatere lastnosti pojava opazujemo na modelu lipidnega dvosloja - ravninskem lipidnem dvosloju, ki je v primerjavi z biološko membrano relativno preprost. Ravninski lipidni dvosloj se od celične membrane bistveno razlikuje, toda ob privzetju, da se majhni vpeti delčki celične membrane obnašajo kot majhne ravninske membrane bi bili lahko osnovni koncepti porušitve lipidnega dvosloja veljavni tudi za celice.

Ena poglobitnih prednosti ravninskega lipidnega dvosloja kot modela biološke membrane je, da lahko kontroliramo njegovo sestavo. Za tvorbo lahko uporabimo različne lipide, njihove mešanice v različnih koncentracijah, lahko jim dodamo proteine, polimere in površinsko aktivne molekule [6, 7, 10].

Na ravninskem lipidnem dvosloju lahko zelo preprosto merimo njegove električne lastnosti - zato je tudi študij elektroporacije relativno preprost (slika 1). Stimulacijski in merilni elektrodi namreč lahko postavimo na obe strani ravninskega lipidnega dvosloja in spremljamo električno dogajanje. Največkrat merjene električne lastnosti ravninskega lipidnega dvosloja so: prevodnost, kapacitivnost, porušitvena napetost in membranska napetost [6, 7, 10].

Študije elektroporacije ravninskih lipidnih dvoslojev temeljijo na dveh metodah: metodi nabojskega impulza in metodi vpete napetosti [6, 7, 10].



Slika 1. Blokovna shema merilnega sistema: f_G - funkcijski generator; V - merilnik napetosti; A - merilnik toka; S - analogno elektronsko stikalo; R - upor znane upornosti

Figure 1. Block diagram of the measurement system: f_G - function generator; V - voltmeter; A - ampere meter; S - analog electronic switch; R - resistor

Bistvo metode nabojskega impulza je, da je membrana izpostavljena napetosti le ob impulzu. Zato potrebujemo hitro stikalo, ki razklene tokokrog, v katerem je vir, sočasno s koncem električnega impulza. Oblika stimulacijskega impulza, ki ga uporabljamo pri metodi nabojskega impulza, je prikazana na sliki 2A. Razelektrotev membrane opazujemo na zunanjem uporu znane upornosti R s pomočjo merilnika napetosti. Na sliki 2B so prikazani tipični poteki napetosti na uporu R pri različnih amplitudah poracijskega impulza. Pri potekih, ki sta narisana s črtkano črto, lipidni dvosloj ni bil porušen, pri poteku, ki je narisana s polno črto, pa je bil lipidni dvosloj porušen. Iz slike 2B lahko sklepamo, da je lipidni dvosloj porušen, ko se časovna konstanta razelektrotev zmanjša. Amplitudo napetosti, pri kateri se časovna konstanta razelektrotev zmanjša, v našem primeru U_3 , imenujemo porušitveno napetost. Poleg določitve prušitvene napetosti nam metoda omogoča določitev stopnje poracije membrane. Slednje določimo z meritvijo poporacijske časovne konstante $PE\tau$, ki je definirana kot čas od trenutka, ko se je poracija lipidnega dvosloja začela, do trenutka, ko transmembranska napetost pade za 63% glede na začetno vrednost (slika 2C) [6, 7, 10].

Pri metodi vpete napetosti električnemu impulzu izbrane dolžine (pravokotna faza) sledi faza linearno padajoče napetosti (slika 2D). Dolžina te faze je odvisna od časovnega intervala, ki ga želimo opazovati. Metoda vpete napetosti tako omogoča študijo časovnega poteka elektroporacije. Lipidni dvosloj je porušen, kadar v fazi linearno padajoče napetosti zaznamo naraščanje toka skozi dvosloj; amplitudo pravokotnega impulza zapišemo kot porušitveno napetost (sliki 2E in 2F) [6, 7, 10].

Metoda nabojskega impulza omogoča zelo natančno določitev porušitvene napetosti lipidnega dvosloja, saj se lipidni dvosloj vedno poruši med trajanjem impulza. Z

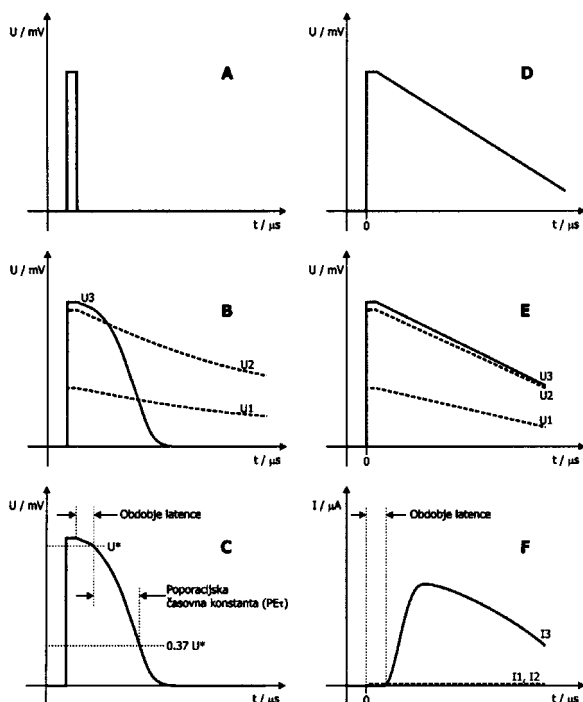
metodo vpete napetosti pa porušitveno napetost lipidnega dvosloja določimo le približno, saj se lipidni dvosloj lahko poruši tudi v fazi linearno padajoče napetosti (daljši impulz nižje napetosti) [6, 7, 10].

Določanje porušitvene napetosti je postopek, pri katerem moramo izvesti več ločenih meritev. Pred vsakim poskusom moramo nekajkrat izmeriti kapacitivnost celotnega sistema brez lipidnega dvosloja (C_s), ki jo sestavlja kapacitivnost vezja in teflonske komore. To naredimo tako, da sistem izpostavimo npr. $10 \mu s$ trajajočemu impulzu z amplitudo $300 mV$ in ga razelektirimo prek zunanje upornosti. Kapacitivnost sistema izračunamo iz časovne konstante razelektrotev. Na enak način za vsak lipidni dvosloj izmerimo kapacitivnost sistema skupaj z lipidnim dvoslojem (C_t). Kapacitivnost lipidnega dvosloja (C_m) izračunamo kot razliko med obema kapacitivnostma ($C_m = C_t - C_s$). Iz tako določene kapacitivnosti C_m in znane površine lipidnega dvosloja izračunamo specifično kapacitivnost vsakega lipidnega dvosloja. Enaka specifična kapacitivnost je merilo za ponovljivost lipidnih dvoslojev. Lipidne dvosloje po testu stabilnosti (lipidni dvosloj mora biti obstojen vsaj 5 minut) izpostavimo vlaku impulzov.

Pri vsakem poskusu spremenimo amplitudo napetosti impulzov, dokler ne dosežemo porušitve lipidnega dvosloja. Napetost, pri kateri se je lipidni dvosloj porušil, imenujemo porušitvena napetost lipidnega dvosloja. Poleg tega si zapišemo tudi zaporedno številko impulza, v katerem je prišlo do porušitve (slika 3) [6, 7, 10].

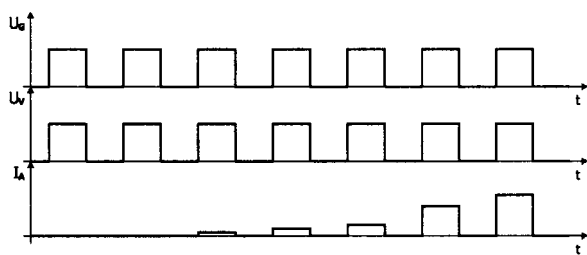
3 Merilni sistem

Glede na blokovno shemo, ki je prikazana na sliki 1, za izvajanje poskusov na ravninskih lipidnih dvoslojih potrebujemo: teflonsko komoro, stimulacijske in merilne elek-



Slika 2. Oblike stimulacijskih in merjenih signalov pri metodah nabojskega implza (levo A-C) in vpete napetosti (desno D-F). (A) oblika stimulacijskega signala. (B) poteki napetosti na upor R . (C) način določitve časovne konstante $PE\tau$. (D) oblika stimulacijskega signala. (E) potek napetost na lipidnem dvosloju. (F) tok skozi lipidni dvosloj

Figure 2. Stimulation and measured signals: charge pulse method (left A-C) and voltage clamp method (right D-F). (A) shape of stimulation signal. (B) traces of voltage on resistor R . (C) definition of time constant $PE\tau$. (D) shape of stimulation signal. (E) trace of voltage on lipid bilayer. (F) current through lipid bilayer



Slika 3. Način določitve porušitvene napetosti
Figure 3. Determination of the breakdown voltage

trode, funkcijski generator ter merilnika toka in napetosti. V nadaljevanju se bomo osredotočili samo na opis obeh merilnikov, saj smo kot funkcijski generator uporabili "Tektronix AFG310" ter posebno vezje z analognim elektronskim stikalom.

Cilj, ki smo si ga zastavili pri razvoju merilnega sistema, ni le merilni sistem, s katerim bi lahko merili lastnosti lipidnih dvoslojev po metodi nabojskega impulza in vpete napetosti. Celotni sistem smo želeli zasnovati širše, in sicer tako, da bi lahko merili in opazovali signale

poljubnih oblik na čim širšem frekvenčnem območju in s čim večjo občutljivostjo obeh merilnikov. Zahteve za oba merilnika smo strnili v tabeli 1, pri čemer naj poudarimo, da pod frekvenco razumemo največjo frekvenco poljubnega signala. Glede na zahteve lahko rečemo, da bo merilni sistem namenjen merjenju majhnih signalov, zato je zelo pomembno, da bo vpliv elektromagnetnih motenj na sistem čim manjši oziroma da bo pod določenim nivojem.

PARAMETRI	MERILNIK TOKA	MERILNIK NAPETOSTI
FREKVENCA	0Hz - 200kHz	0Hz - 200kHz
LOČLJIVOST	$\leq 10\text{nA}$	$\leq 1\text{mV}$
OBMOČJE	10nA - 100 μA	1mV - 1V

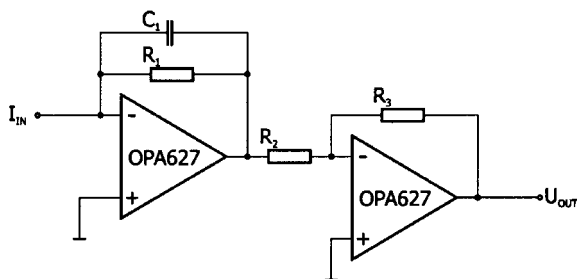
Tabela 1. Zahteve za merilnika toka in napetosti
Table 1. Requirements for volt- and ampere meter

Glede na analizo operacijskih ojačevalnikov, ki smo jo izvedli v času razvoja in ki je podana v dodatku, smo se pri izdelavi obeh merilnikov odločili za operacijski ojačevalnik OPA627. To je precizni hitri operacijski ojačevalnik z napetostno povratno zvezo z zelo majhnim vhodnim mirovnim tokom $\leq 5\text{pA}$, ki ga proizvaja Burr-Brown.

3.1 Merilnik toka

Skoraj zanesljivo lahko trdimo, da je edina primerna metoda merjenja toka pri poskusih na lipidnih dvoslojih metoda, ki temelji na pretvorbi merjenega toka v napetost. Najpreprostejši način bi bilo posredno merjenje napetosti na upor znane upornosti, skozi katerega teče merjeni tok, vendar ta metoda ni primerna za merjenje majhnih tokov. Drugi način, ki je glede na literaturo najpogosteje uporabljen [6, 7], pa je s pomočjo tokovno napetostnega pretvornika, ki je izveden z operacijskim ojačevalnikom. Na sliki 4 je prikazan celotni merilnik toka, ki smo ga izdelali, pretvornik pa sestavljajo prvi operacijski ojačevalnik, ki ima v povratni zanki upor R_1 , in kondenzator C_1 . Pri invertirajočem sistemu je vhodni tok v operacijski ojačevalnik zanemarljivo majhen. V našem primeru, kjer smo uporabili operacijski ojačevalnik OPA627, je tok največ 5pA . To nam omogoča, da s tokovnim merilnikom natančno merimo električni tok. Vhodni tok I_{IN} je enak toku, ki teče iz izhoda prvega operacijskega ojačevalnika prek upora R_1 nazaj na vhod. Napetost na upor R_1 je zato proporcionalna toku I_{IN} in je enaka napetosti na izhodu prvega operacijskega ojačevalnika.

Napetost na izhodu U_{OUT} je določena z enačbo (1). Razmerje upor R_3 in R_2 je enako 1, zato lahko enačbo za izhodno napetost poenostavimo in iz nje izrazimo tok I_{IN} , enačba (2) [11, 12, 13].



Slika 4. Izvedba tokovnega merilnika
Figure 4. Circuit for the current measurement

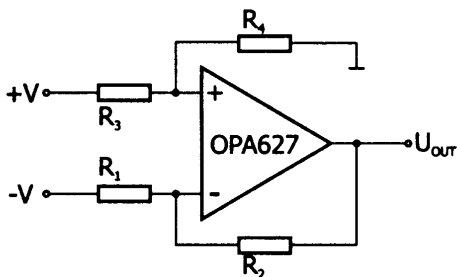
$$U_{OUT} = \frac{R_3}{R_2} \cdot R_1 \cdot I_{IN} \quad (1)$$

$$I_{IN} = \frac{U_{OUT}}{R_1} \quad (2)$$

Za enačbi (1) in (2) lahko rečemo, da veljata le pri enosmernih razmerah oziroma pri nizkih frekvencah. Zaradi parazitnih vplivov postane ta zgoraj opisani enačbi frekvenčno odvisni, kar vpliva tudi na meritve. Parazitne vplive lahko do neke mere odpravimo s kondenzatorjem C_1 , ki mora imeti vrednost nekaj piko-faradov. Napačno izbrana kapacitivnost kondenzatorja povzroči zmanjšanje pasovne širine [11, 12, 13].

3.2 Merilnik napetosti

Merjenje napetosti na ravninskem lipidnem dvosloju temelji na merjenju potencialne razlike med obema predeloma komore. Meritve lahko izvedemo z diferencialnim ojačevalnikom ali pa z instrumentacijskim ojačevalnikom. Glede na literaturo se pri merjenju napetosti pri poskusih na lipidnih dvoslojih večinoma uporablja diferencialni ojačevalnik. Za diferencialni ojačevalnik (slika 5) je značilno, da ima nizko vhodno upornost, ki je definirana z zunanji upori. Za invertirajoči vhod je določena z upornostjo upora R_1 , za neinvertirajočega pa z vsoto uporov R_3 in R_4 .



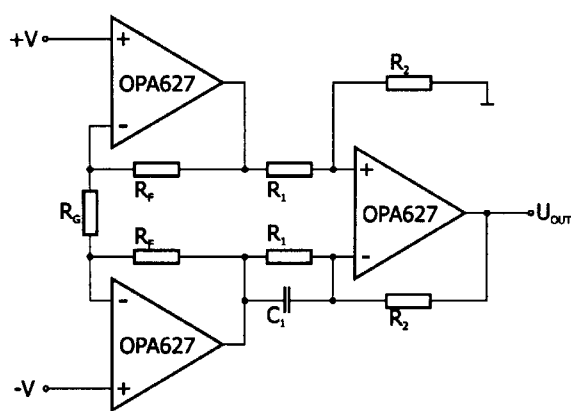
Slika 5. Diferencialni ojačevalnik
Figure 5. Differential amplifier

Prav zaradi nizke vhodne upornosti diferencialnega ojačevalnika smo se odločili, da bomo merilnik

napetosti izvedli z instrumentacijskim ojačevalnikom. Pri tem nismo uporabili obstoječih instrumentacijskih ojačevalnikov, saj ti ne dosegajo zadostnih hitrosti, pač pa smo ga izvedli s tremi operacijskimi ojačevalniki (slika 6). Ojačenje A_U instrumentacijskega ojačevalnika je določeno z enačbo

$$A_U = \left(1 + \frac{2 \cdot R_F}{R_G}\right) \cdot \frac{R_2}{R_1}, \quad (3)$$

v kateri je razmerje uporov R_2 in R_1 enaka 1, tako da je ojačenje določeno le z uporoma R_F in R_G in v našem primeru znaša 10 [11, 12, 13].



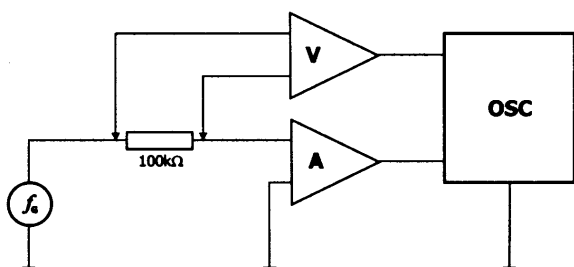
Slika 6. Instrumentacijski ojačevalnik
Figure 6. Instrumental amplifier

4 Sklep

Merilni sistem omogoča merjenje porušitvene napetosti lipidnega dvosloja z metodo nabojskega impulza in metodo vpete napetosti. Poleg tega merilni sistem pri metodi nabojskega impulza omogoča določanje stopnje poracije lipidnega dvosloja.

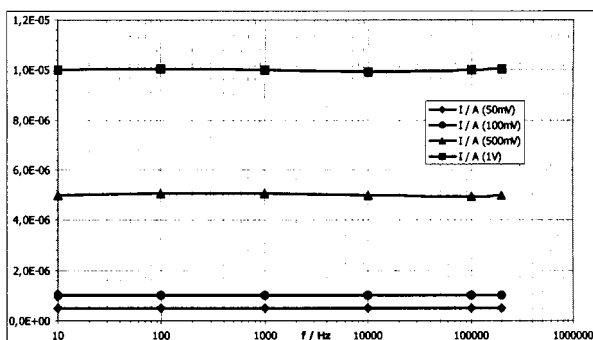
Pri poskusih na lipidnih dvoslojih se uporabljajo različni poracijski pulzi, ki so lahko tudi zelo kratki, zato potrebujemo hiter merilni sistem. Za merjenje napetosti smo izdelali instrumentacijski ojačevalnik s tremi preciznimi hitrimi operacijskimi ojačevalniki, s čimer smo poleg hitrosti dosegli tudi visoko vhodno upornost merilnika, visoko razmerje signal-šum in ločljivost 1mV na celotnem območju. Pri merilniku toka smo se osredotočili na tokovno napetostno pretvorbo, ki smo jo izvedli z operacijskimi ojačevalnikom. Tudi v tem primeru smo uporabili precizne hitre operacijske ojačevalnike, s čimer smo dosegli ločljivost 10nA na celotnem merilnem območju merilnika toka.

Frekvenčno odvisnost meritev smo izmerili po shemi na sliki 7, pri tem smo namesto komore z lipidnim dvoslojem kot breme uporabili upor znane vrednosti, in sicer 100kΩ. Naredili smo štiri ločene meritve, pri katerih

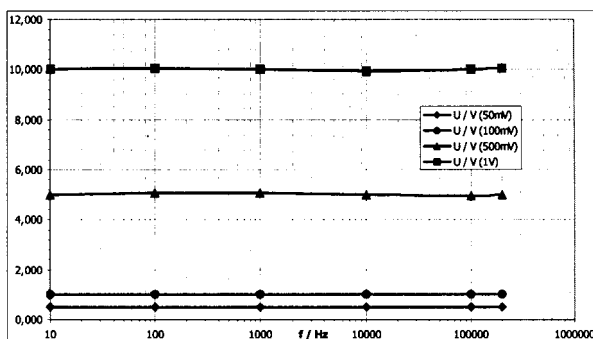


Slika 7. Shema testnega merilnega sistema: f_G - funkcijski generator (Tektronix AFG310); V - merilnik napetosti; A - merilnik toka; OSC - digitalni osciloskop (Lecroy 9310C)
 Figure 7. Block diagram of the test measurement system: f_G - function generator (Tektronix AFG310); V - voltmeter; A - ampere meter; OSC - digital oscilloscope (Lecroy 9310C)

smo pri konstantnih amplitudah vhodnega sinusnega signala (50mV, 100mV, 0.5V in 1V) spreminjali frekvenco od 10Hz do 200kHz. Izmerjene frekvenčne odvisnosti meritev so podane na Sliki 8 za tokovni merilnik in na Sliki 9 za napetostni merilnik.



Slika 8. Meritve toka pri različnih napetostih in frekvencah
 Figure 8. Current measurements at different frequencies and amplitude of the input signal



Slika 9. Meritve napetosti pri različnih napetostih in frekvencah
 Figure 9. Voltage measurements at different frequencies and amplitude of the input signal

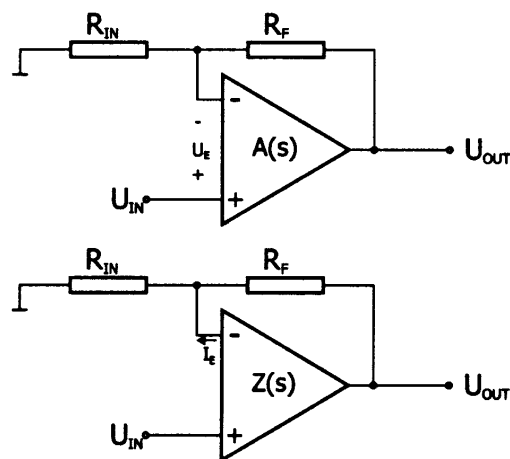
Glede na meritve lahko rečemo, da merilni sistem zadovoljuje potrebam, poudariti pa moramo, da sistem v tej

fazi še ni primeren za merjenje signalov, katerih amplituda je nižja od 50mV, saj pri meritvah toka pojavlja nezaželeni šum.

Dodatek - Hitri operacijski ojačevalniki

Pri izdelavi merilnega sistema za poskuse na lipidnih dvoslojnih smo se soočili z nekaterimi težavami. Ena teh je bila izbira operacijskih ojačevalnikov, ki bi zadostili podanim zahtevam. Dejstvo je, da obstaja na stotine različnih operacijskih ojačevalnikov, ki se med seboj razlikujejo po zgradbi in obratovalnih lastnostih. V grobem lahko glede na obratovalne lastnosti operacijske ojačevalnike razdelimo na: natančne, nizkošumne, hitre, močnostne, itd.

V začetku razvoja merilnega sistema smo sprva izbirali med hitrimi operacijskimi ojačevalniki, pri čemer smo želeli, da bo izbrani operacijski ojačevalnik natančen, nizkošumen ter da bo imel majhen vhodni mirovni tok. Glede na veliko izbiro operacijskih ojačevalnikov na trgu, smo se dokaj hitro dokopali do tistega, s katerim smo zadostili zahtevam. Pri tem pa nas je presenetila delitev hitrih operacijskih ojačevalnikov glede na povratno zvezo. Zato smo se odločili, da bomo opravili manjšo analizo hitrih operacijskih ojačevalnikov.



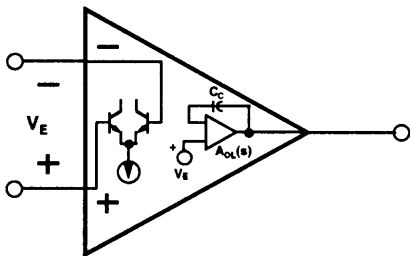
Slika 10. Uporaba operacijskega ojačevalnika z napetostno povratno zvezo (zgoraj) in s tokovno povratno zvezo (spodaj) [11,12]
 Figure 10. Use of the operational amplifier with voltage feedback (top) and with current feedback (bottom) [11,12]

Glede na povratno zvezo se hitri operacijski ojačevalniki delijo na: operacijske ojačevalnike z napetostno povratno zvezo in operacijske ojačevalnike s tokovno povratno zvezo. Kljub različni zgradbi obeh operacijskih ojačevalnikov je njuna uporaba enaka (slika 10). Za obe vrsti je tako napetostno ojačenje A_U neinvertirajočega ojačevalnika enako in je določeno z enačbo

$$A_U = \frac{U_{OUT}}{U_{IN}} = 1 + \frac{R_F}{R_{IN}}, \quad (D1)$$

v kateri je U_{OUT} amplituda izhodne napetosti, U_{IN} amplituda vhodne napetosti, R_F upornost upora v povratni zvezi in R_{IN} upornost upora, ki določa notranjo vhodno upornost [11, 12].

Operacijski ojačevalnik, katerega blokovni diagram je prikazana na sliki 11, je danes eden najbolj uporabljenih ojačevalnikov. Glede na njegove karakteristike se uporablja tako v hitrih kot tudi v natančnih aplikacijah. Iz blokovnega diagrama so razvidne številne ključne karakteristike operacijskih ojačevalnikov te vrste.



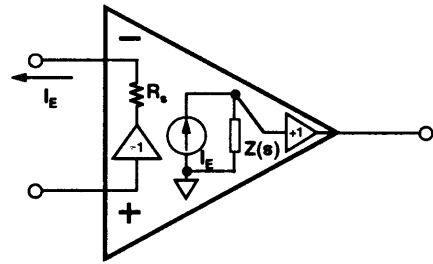
Slika 11. Zgradba operacijskega ojačevalnika z napetostno povratno zvezo [11, 12]
Figure 11. Structure of the operational amplifier with a voltage feedback [11, 12]

Če se najprej osredotočimo na vhodni del ojačevalnika takoj opazimo, da sta vhoda ekvivalentna. Zato sta oba vhodna mirovna toka po amplitudi podobna, hkrati pa je njuna razlika majhna. Poleg tega sta vhodni impedanci vhodov visoki in skoraj enaki. Izhodna napetost V_O ojačevalnika je določena z enačbo

$$V_O = A_{OL}(s) \cdot V_E, \quad (D2)$$

v kateri je $A_{OL}(s)$ odprtozančno ojačenje in V_E razlika med vhodnima napetostma. Odprtozančno ojačenje je frekvenčno odvisno in stabilno pri nizkih frekvencah. Stabilnost operacijskega ojačevalnika je izboljšana s kondenzatorjem C_C , ki pa vpliva na "slew rate". Če strnemo povedano, so prednosti operacijskega ojačevalnika z napetostno povratno zvezo: ekvivalentna vhoda in velika natančnost; slabost pa, da je pasovna širina ojačevalnika odvisna od izbranega ojačenja, ki ga določimo z zunanjimi upori [11, 12].

Blokovna shema operacijskega ojačevalnika s tokovno povratno zvezo (slika 12) natančno prikazuje razliko med obema vrstama ojačevalnikov. Vhoda operacijskega ojačevalnika nista ekvivalentna, zato sta tudi mirovna toka na posameznem vhodu različna in s tem tudi vhodni impedanci. Razmerje med obema vhodnima mirovnima tokoma je odvisno od strukture tokovne povratne zanke in se giblje med ± 2 in ± 5 . Primerjava obeh vhodov pokaže, da ima invertirajoči



Slika 12. Zgradba operacijskega ojačevalnika s tokovno povratno zvezo [11, 12]
Figure 12. Structure of the operational amplifier with a current feedback [11, 12]

vhod večjo amplitudo mirovnega toka in zelo nizko vhodno upornost, medtem ko ima neinvertirajoči vhod zaradi "bufferja" visoko vhodno impedanco, zaradi česar je tudi amplituda mirovnega toka nižja.

Napetostno ojačenje vhodnega "bufferja" je približno +1, njegova pasovna širina pa je precej večja od pasovne širine preostalega dela ojačevalnika.

Izhodna napetost V_O operacijskega ojačevalnika s tokovno povratno zanko je določena z enačbo

$$V_O = I_E \cdot Z(s), \quad (D3)$$

v kateri je I_E razlika med vhodnima tokoma in $Z(s)$ odprtozančna transimpedanca ojačevalnika. Na splošno lahko za operacijske ojačevalnike s tokovno povratno zvezo rečemo, da je njihova uporaba preprostejša, dominantni odprtozančni transimpedančni pol je pri višji frekvenci, zato so popačenja manjša. Pasovna širina zaportoančnega sistema je določljiva z povratnozančnim uporom. Kljub tem dobrim lastnostim so ti ojačevalniki problematični zaradi različnih in precej velikih vhodnih mirovnih tokov ter zaradi tokovnega šuma, ki je na invertirajočem vhodu večji kot na neinvertirajočem [11, 12].

Iz opisov obeh vrst ojačevalnikov je razvidno, da imata obe svoje dobre in slabe lastnosti, če jih prenesemo na zahteve pri načrtovanju vezja, lahko s preprosto tabelo določimo, katerega uporabiti v določenem primeru (tabela 1) [11, 12].

5 Literatura

- [1] E. Neumann, S. Kakorin, K. Toensing, Fundamentals of electroporative delivery of drugs and genes, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 48, 3-16, 1999.
- [2] S. Orlowski, L. M. Mir, Cell electroporation: a new tool for biochemical and pharmacological studies, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1154, 51-63, 1993.
- [3] A. Maček Lebar, G. Serša, M. Čemažar, D. Miklavčič, Elektroporacija, *Medicinski Razgledi*, 37, 339-354, 1998.
- [4] M. P. Rols, J. Tissie, Electroporation of Mammalian Cells to Macromolecules Control by Pulse Duration, *Biophysical Journal*, 75, 1415-1423, 1998.

ZAHTEVE VEZJA	T.P.Z.	N.P.Z.
VELIK "SLEW RATE"	DA	MORDA
ŠIROKOPASOVNO	DA	MORDA
VELIKA OJAČENJA	DA	MORDA
MAJHNE ENOSMERNE NAPAKE	NE	DA
MAJHNA POPAČENJA	DA	MORDA
NIZKOŠUMNE TRANSIMPEDANCE	NE	DA
PREPROSTO NAČRTOVANJE	DA!	MORDA

Tabela 2. Primerjava uporabe operacijskih ojačevalnikov obeh vrst (T.P.Z. - tokovna povratna zveza, N.P.Z. - napetostna povratna zveza) [11, 12]

Table 1. Comparison of the use of both types of operational amplifiers (T.P.Z. - current feedback, N.P.Z. - voltage feedback) [11, 12]

- [5] V. Sharma, K. Stebe, J. C. Murphy, L. Tung, Poloxamer 188 Decreases Susceptibility of Artificial Lipid Membranes to Electroporation, *Biophysical Journal*, 71, 3229-3241, 1996.
- [6] G. C. Troiano, L. Tung, V. Sharma, K. J. Stebe, The Reduction in Electroporation Voltages by the Addition of a Surfactant to Planar Lipid Bilayers, *Biophysical Journal*, 75, 880-888, 1998.
- [7] T. Y. Tsong, Electroporation of cell membranes, *Biophysical Journal*, 60, 297-306, 1991.
- [8] L. V. Chernomordik, S. I. Sukharev, S. V. Popov, V. F. Pastushenko, A. V. Sokirko, I. G. Abidor, Y. A. Chizmadzhev, The electrical breakdown of cell and lipid membranes: the similarity of phenomenologies, *Biochimica et Biophysica Acta*, 902, 360-373, 1987.
- [9] R. W. Glaser, S. L. Leikin, L. V. Chernomordik, V. F. Pastushenko, A. I. Sokirko, Reversible electrical breakdown of lipid bilayers: formation and evolution of pores, *Biochimica et Biophysica Acta*, 940, 275-287, 1998
- [10] A. Maček Lebar, *Vpliv električnih parametrov na elektroporacijo plazmaleme v in vitro pogojih*, Doktorska disertacija, Fakulteta za elektrotehniko, Ljubljana, 1999.
- [11] J. H. Broeders, M. Mazews, B. Baker, Noise and Interference, *Design Seminar*, Burr-Brown, 1999.
- [12] B. Baker, High Speed Amplifiers, *Design Seminar*, Burr-Brown, 1999.
- [13] P. Horowitz, W. Hill, *The art of electronics*, Cambridge, Cambridge University Press, 1994.

Marko Puc je diplomiral 1998 na Fakulteti za elektrotehniko Univerze v Ljubljani, kjer je zaposlen kot mladi raziskovalec. Leta 2000 je bil habilitiran v asistenta za področje elektrotehnike. Ukvarja se s proučevanjem učinkov električnih polj na biološke celice in razvojem elektronskih vezij.

Damijan Miklavčič je diplomiral leta 1987, magistriral leta 1991 in doktoriral leta 1993 na Fakulteti za elektrotehniko in računalništvo Univerze v Ljubljani, kjer je zaposlen kot izredni profesor. Raziskovalni področji njegovega dela sta biomedicinska tehnika in proučevanje učinkov elektromagnetnih polj na biološke celice.