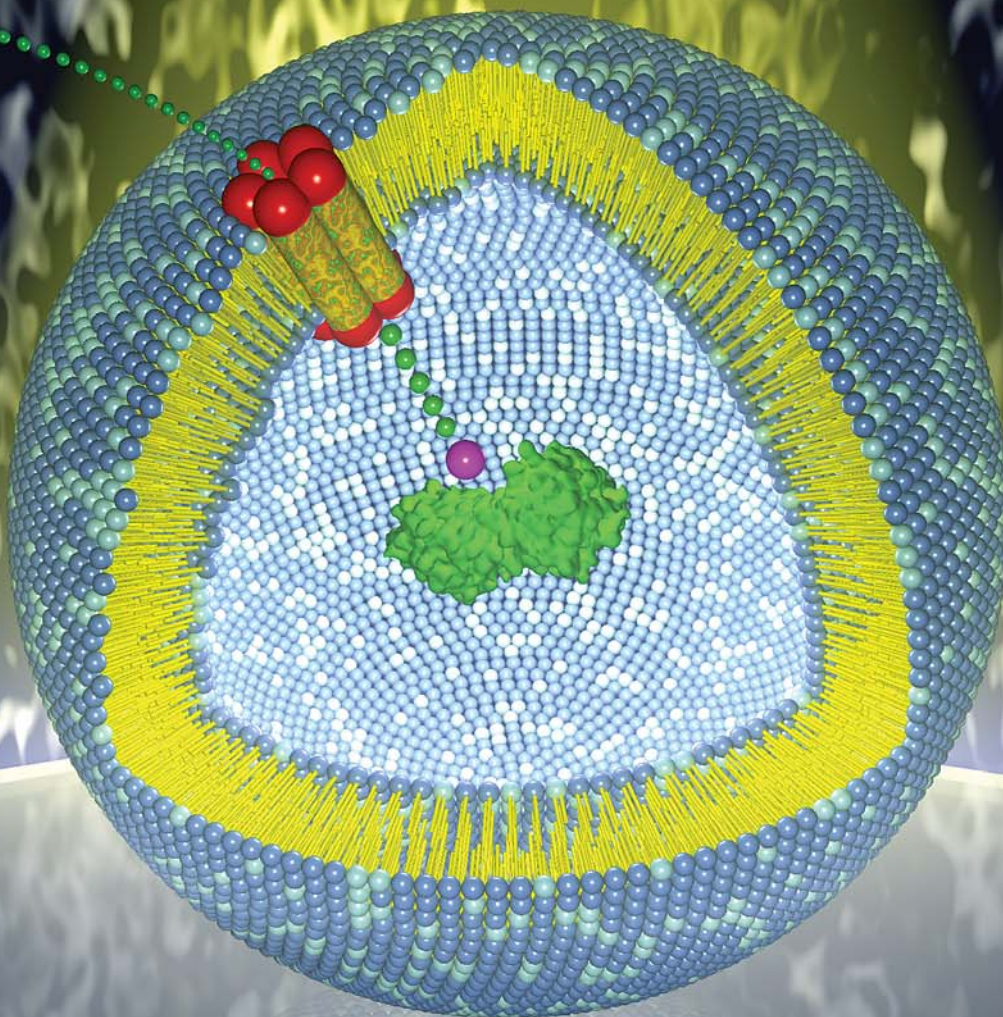


# Aktuel

## NATURVIDENSKAB

4 | 2 0 0 8 | s e p t e m b e r



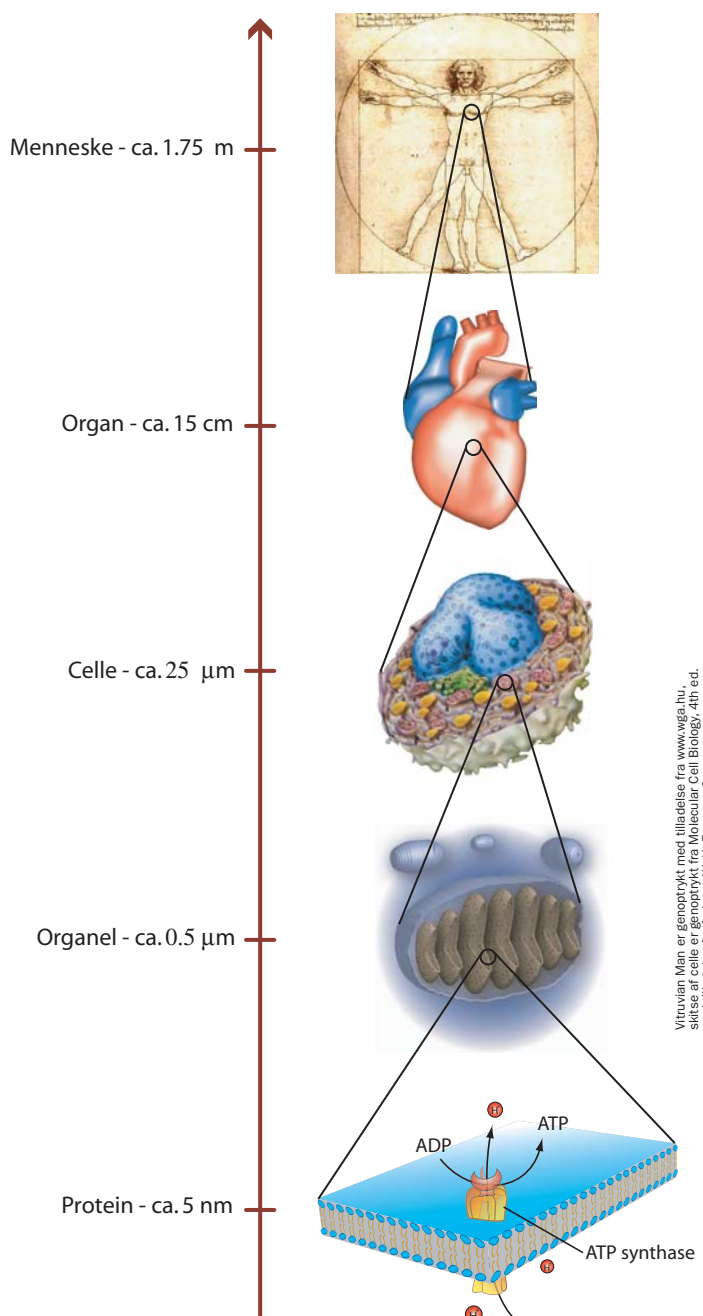
## Nanokolber i det nye laboratorium

Isotoper fortæller om fortidens kost

Billedanalyser hjælper læger og industri

# Det nye biokemiske laboratorium

- en milliard kolber på en enkelt chip



Vitruvian Man er genoptrykt med tilladelse fra www.wga.hu, skitse af celle er genoptrykt fra Molecular Cell Biology, 4th ed. med tilladelse fra forlaget W. H. Freeman & co.

Figur 1. Zoom til nanobiologien.

1) Menneske, den Vitruvianske Mand, 2) hjerte, 3) en enkelt celle, 4) mitokondrier og 5) proteinet ATP Synthase placeret i en mitokondriemembran.

Forskernes glaskolber kan nu erstattes med naturens egne nanokolber, såkaldte vesikler. Med sådanne nanokolber kan man både lave pH-målinger og undersøge enzymers aktivitet på nanoskalaen. Det åbner spændende perspektiver for den biokemiske forskning.

Af Sune M. Christensen, Andreas H. Kunding og Dimitrios Stamou

Ordet laboratorium er afledt af det latinske ord laborare og betyder et rum, hvori arbejde finder sted. Laboratoriet er vigtigt for naturvidenskabelig forskning, da dette er stedet, hvor eksperimenter foretages under kontrollerede forhold. Ved at organisere milliarder af naturens egne nanokolber – såkaldte vesikler – på en enkelt chip, har forskeren nu fået adgang til et helt minilaboratorium, der åbner for en række spændende muligheder. Nanokolberne kan bruges til nænsomt at håndtere proteiner, som er en af livets fundamentale bestanddele. Og da hver enkelt vesikel på chippen kan udnyttes som et biokemisk laboratorium på nanoskalaen, kan en enorm mængde forsøg laves på én gang. Det vil kunne give os ny viden om, hvordan menneskekroppen fungerer.

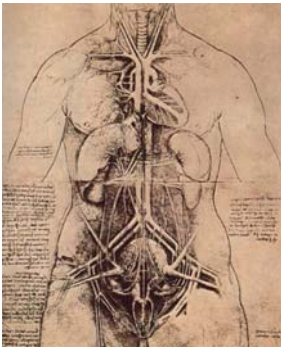
## En opdagelsesrejse ind i kroppen

Fascinationen af kroppen, og i særdeleshed livets gåde, har altid pirret menneskets nysgerrighed. Kimet til moderne biologisk forskning blev lagt i renæssancens Europa, hvor mennesket for alvor blev sat i centrum. I sit laboratorium dissekerede en af denne periodes store enere, Leonardo da Vinci, døde mennesker og kortlagde herved menneskets overordnede anatomi. På baggrund af sådanne studier blev det hurtigt klart, at menneskelegemet fungerer på basis af samarbejde mellem de forskellige organer.

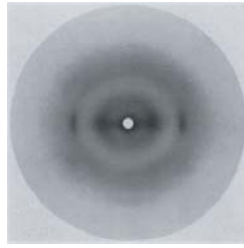
Celler blev for første gang observeret i 1670'erne af hollænderen Antonie van Leeuwenhoek ved hjælp af simpel lysmikroskopi. Denne opdagelse blev anset for at være så kontro-

**Leonardo da Vinci 1452-1519:**

Kortlægger den menneskelige anatomi ved dissekering.

**W. T. Astbury 1930'erne:**

Pionerer røntgen-eksamination af proteinkrystaller.

**L. Pauling 1951:**

Den sekundære struktur af proteiner løses på basis af røntgen-data.

**J. D. Watson, F. H. Crick 1953:**  
Helix strukturen for DNA løses.

**F. Bauer 1802:**

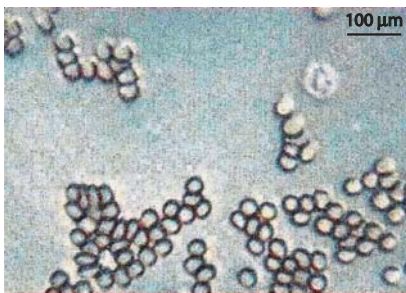
Opdager cellekernen.

**E. Ruska 1931:**

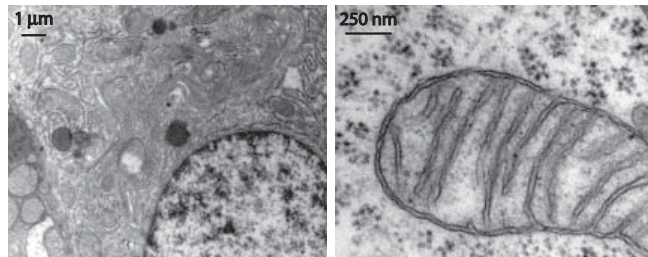
Det første elektronmikroskop bygges.

**A. van Leeuwenhoek 1670:**

Observerer for første gang celler ved optisk mikroskopi.

**K. R. Porter, A. Claude, E.F. Fullam 1945:**

Optager mikrografer af hele celler ved elektronmikroskopi.



Figur 2. Milepæle i forståelsen af menneskekroppen.

Illustrationer: 1 er genoptrykt fra [www.wga.hu](http://www.wga.hu), 2 er genoptrykt med tilladelse fra professor Brian J. Ford, 3 er genoptrykt med tilladelse fra dr. Dietrich Steinkopff Verlag, 4 er original mikrografer optaget af lektor Gert H. Hansen, 5 er genoptrykt med tilladelse fra PNAS, Vol. 37, s. 205 og Nature, Vol. 171, s. 737

versiel, at den ikke umiddelbart blev accepteret af det videnskabelige samfund. Først da British Royal Society, et dengang nyligt grundlagt forsknings-selskab i England, sendte en komité bestående af jurister og en enkelt præst til at inspicere van Leeuwenhoeks prøver, blev forskningsresultatet endeligt anerkendt.

**Celler og proteiner**

Frem til 1940'erne var det ikke muligt at studere i detalje, hvordan celler så ud indvendigt, grundet den begrænsede optiske opløsningsevne af et lysmikroskop. I 1939 blev det første elektronmikroskop gjort kommercielt tilgængeligt. Elektronmikroskoper har en meget høj opløsningsevne, og det blev derfor muligt at iagttage cellens anatomi direkte. Det før-



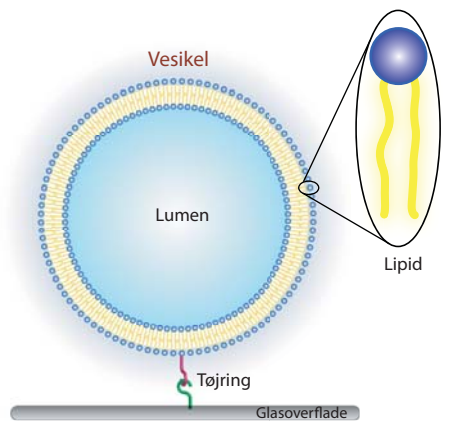
Foto: Nemo-Science Centeret

Nanoteknolog underkaster en prøve fluorescens-mikroskopisk analyse.

## Vesikler - boks 1

Vesikler er naturens egne nanokolber, som menneskeceller benytter sig af til at transportere og sortere biologiske molekyler. Vesikler kan fremstilles kunstigt og benævnes også liposomer. Navnet liposom kommer af de to græske ord lipos, som betyder fedt, og somos, som betyder legeme. Denne betegnelse skyldes, at et liposom består af en tynd hinde (membran), der udgøres af fedtlignende molekyler, også kaldet lipider. Membranens tykkelse er ca. 3-5 nm, hvorimod vesikler kan antage størrelser fra 20-500 nm. Da membranen består af fedtagtige molekyler, er det meget vanskeligt for stoffer opløst i vand at rejse igennem den. Membranen betragtes derfor som stort set uigennemtrængelig på trods af dens tykkelse på kun et par få nanometer. Vesikler er nyttige redskaber for nanoteknologi, dels på grund af deres nanoskopiske størrelse, men også fordi lipider kan programmeres til selv at danne en vesikel. Denne reaktion er et eksempel på spontan selvorganisering, hvilket er en af nanoteknologiens grundpiller, hvor man populært sagt bygger funktionelle komponenter op fra bunden.

For at udnytte vesiklerne til nanoteknologiske eksperimenter er det en fordel at tøjre dem til en overflade. Dette kan f.eks. gøres ved hjælp af to komplementære biologiske molekyler, der genkender og binder til hinanden. Første skridt i denne procedure er at designe en overflade, der er beklædt med den ene

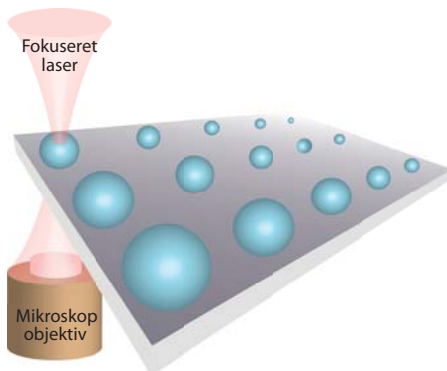


En vesikel med et vandigt lumen og en membran opbygget af lipider. Vesiklen er tøjret til en glasoverflade.

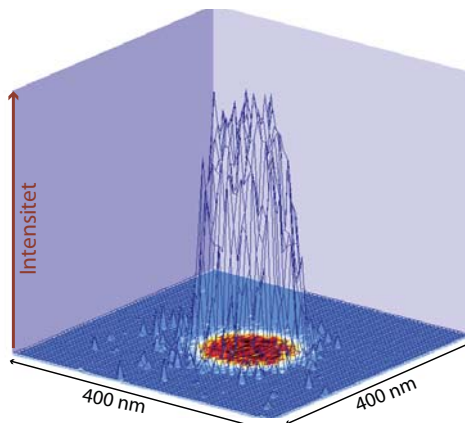
af de to bindingspartnere. Den anden bindingspartner placeres på membranen af vesiklen. Ofte er det nyttigt ikke blot at tøjre vesiklerne tilfældigt til overfladen men at gøre dette på kontrolleret vis. En måde at opnå dette på er inspireret af det velkendte princip bag eksempelvis kartoffeltryk: Først beklædes et stempel med den ene bindingspartner, dernæst printes mønstret fra stemplet på overfladen og endelig tøjres vesikler indeholdende den anden bindingspartner på mønstret.

## Fluorescens-mikroskopi - boks 2

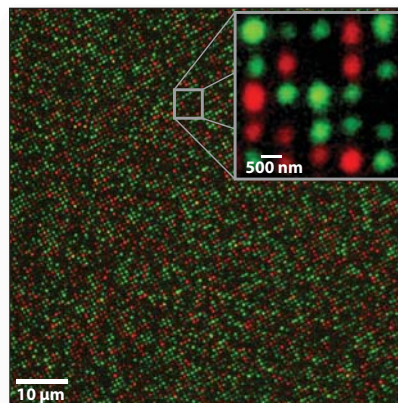
Fluorescens-mikroskopi er en udbredt forskningsteknik, især inden for biologisk og medicinsk forskning. En forudsætning for, at en prøve kan studeres med fluorescens-mikroskopi er, at den indeholder farvestoffer. Når et farvestof bestråles med lys af en særlig bølgelængde/farve, da vil det absorbere lyset og genudsende det med en anden farve. Denne proces benævnes fluorescens og er sammenlignelig med phosphorescens, som bl.a. bruges i selvlysende genstande. Når fluorescens anvendes i mikroskopi dannes et billede af farvestoffets farve, eksempelvis grøn. Hvis mikroskopet benytter filtre, kan man afbillede adskillige farver samtidig.



Figuren viser en skitse af en vesikel-mosaik, der monitoreres ved hjælp af laser fluorescens-mikroskopi.



Figuren viser et eksempel på et højdekort over intensiteter af fluorescens-signalet fra en enkelt vesikel. Det fremgår, at fluorescens signalet er størst i vesiklens midtpunkt.



Fluorescens-mikrofotoграфи af en mosaik bestående af røde og grønne vesikler.

Trykt med tilladelse fra Angew. Chem. Int. Ed. Vol. 42, s. 5580

ste elektronmikrofotoграфи af en hel celle blev optaget i 1945 af Keith Porter og Ernest Fullam, som sammen med George Palade efterfølgende kortlagde menneskecellers indre arkitektur. Disse er opbygget af mindre enheder, kaldet organeller, som i analogi til kroppens organer varetager helt specifikke opgaver i cellen.

Proteiner er nanoskopiske arbejdsmaskiner, der varetager adskillige biologiske funktioner, såsom at danne sluser imellem cellens forskellige områder, virke som transportbånd eller skære fiberstreng over. Eksistensen af proteiner havde været kendt siden 1700-tallet, men først i 1931 lykkedes det William Astbury at måle på opbygningen af et protein ved hjælp af eksperimenter med røntgen-diffraction. Desværre var det ikke muligt direkte fra Astburys data at se, hvordan proteinets struktur så ud. Det var først ca. 20 år efter, at den dobbelte nobelprismodtager Linus Pauling foreslog en model til at forklare resultaterne. Siden da er der blevet udviklet mere avancerede modeller, og det er nu muligt at se direkte, hvordan enkelte atomer sidder placeret i forhold til hinanden på proteinet.

## Biologi på nanoskala

Proteiner er kun få nanometer store, og således foregår alle biologiske processer fundamentalt set på nanoskala. I den sidste halvdel af det 20. århundrede er der blevet gjort en gigantisk indsats for at klassificere disse processer vha. elektronmikroskopi og røntgenmålinger. Desværre er det ikke med disse teknikker muligt at se, hvordan enkelte proteiner fungerer mens de arbejder, og endnu eksisterer der kun ganske få metoder til både at håndtere og studere proteiners funktion på en nænsom måde. Men ved at reducere laboratoriets størrelse til nanoskala kan vi drastisk forbedre studiet af proteiners funktion.

Nanolaboratoriet består af vesikler, som kan betragtes som ultrasmå nanokolber bestående af en fedtlignende membran med et vandigt indhold

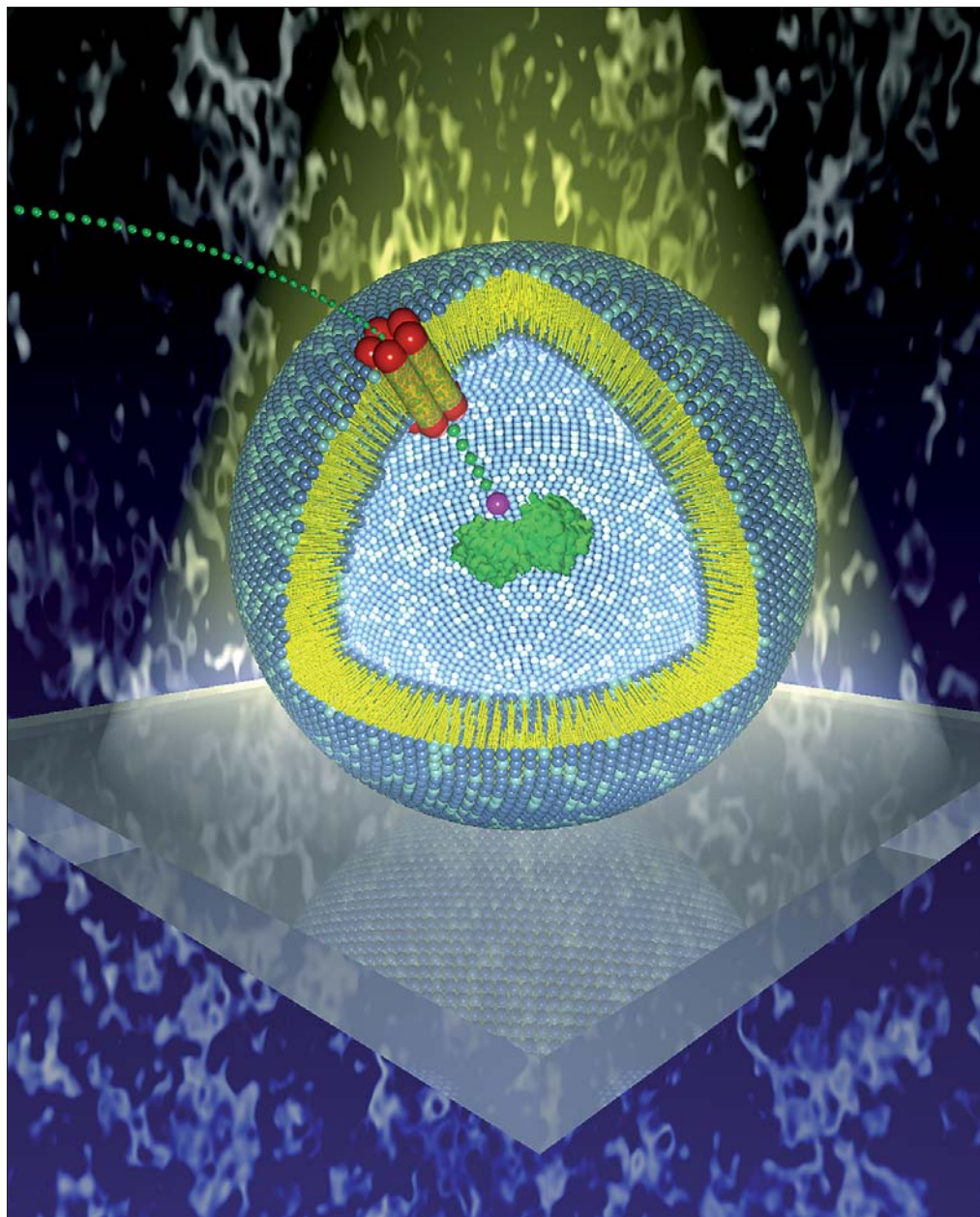
(boks 1). I cellen bruges vesikler til at transportere proteiner mellem forskellige områder og som budbringere i kommunikation med naboceller. Vesikler kan fremstilles kunstigt ved at opløse en blanding af lipid-molekyler i vand (se boks 1). Ved moderne biokemiske metoder er det i dag muligt at isolere proteiner fra celler og efterfølgende indkapsle dem i disse nanokolber. På den måde kan man udnytte en vesikel til at fange et eller flere biologiske molekyler og efterfølgende underkaste dem videnskabelige undersøgelser.

En forudsætning for at arbejde med enkelte vesikler er at kunne fastfryse (fikser) deres position, og dernæst overvåge deres funktion ved mikroskopi. Fikseringen kan opnås ved at tøjre vesiklen til en overflade og den kan nu studeres ved hjælp af såkaldt fluorescensmikroskopi (boks 2).

En stor fordel ved at tøjre vesikler på overflader er, at placeringen af enkelte vesikler kan kontrolleres med stor nøjagtighed. Således er det muligt at fremstille en ordnet mosaik, som gør det muligt at måle på mange vesikler samtidigt. En mosaik kan have op til 1 million vesikler per  $\text{mm}^2$  af overfladen. I de tilfælde, hvor hver enkelt vesikel udnyttes som et selvstændigt laboratorium, vil der således kunne foretages 1 milliard forsøg parallelt på en  $10 \text{ cm}^2$  overflade.

### At måle pH i en nanokolbe

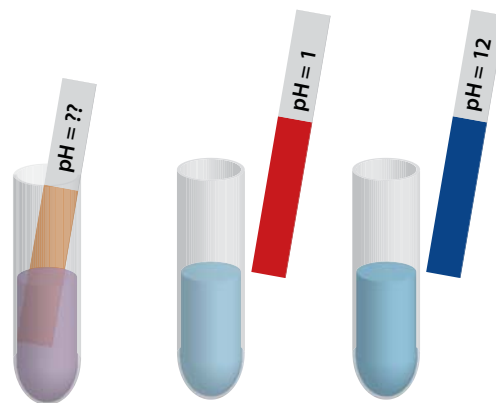
En af de helt basale operationer i et laboratorium er at måle pH-værdier med lakmus-papir. pH er et mål for koncentrationen af protoner (eller rettere oxoniumioner,  $\text{H}_3\text{O}^+$ ). pH-skalaen er indrettet således, at en protonrig opløsning har lav pH og vice versa. Et eksempel på et meget interessant biomolekyle er proteinet ATP synthase. ATP synthase fungerer basalt set som et møllehjul, idet proteinet danner en kanal, hvorigennem protoner kan strømme fra et område i cellen til et andet. Denne strøm af protoner udnyttes som energikilde i produktion af cellens primære brændstof ATP. For at kunne studere ATP synthasen,



En tegners kunstneriske fortolkning af fremtidens biokemiske laboratorium.

imens den arbejder, er det nødvendigt, at kunne måle pH-værdier meget nøjagtigt og meget lokalt.

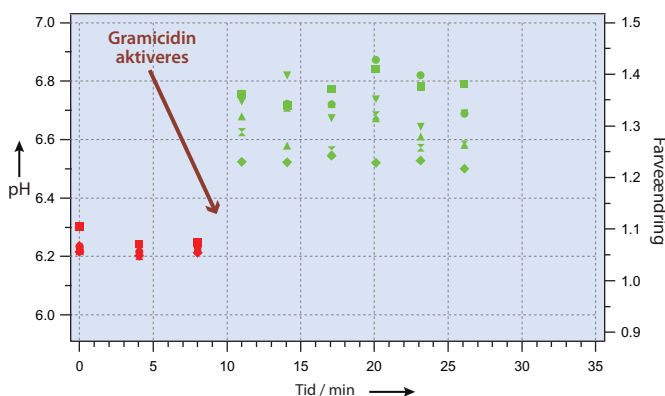
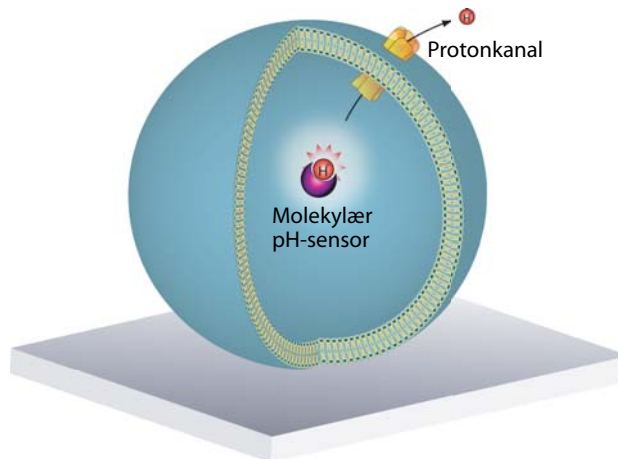
Lakmus-papir er belagt med en kemisk indikatorforbindelse, der er i stand til at skifte farve alt afhængig af, hvor mange protoner der er i dens omgivelser. Denne type af kemiske forbindelser kaldes under ét pH-sensitive farvestoffer. Vi kan udnytte pH-følsomme farvestoffer som nanosensorer, der kan rapportere pH-værdien, og således antallet af protoner, i vesiklers indre. Et sådant farvestof



Figur 3. Ligesom man med lakmuspapir kan måle pH-værdien i en opløsning, kan man indsatte pH-sensorer i vesikler.

Figur 4. Ligesom man med lakmuspapir kan måle pH-værdien i en opløsning, kan man indsætte pH-sensorer i vesikler.

Her er vist et eksempel, hvor en overflade-tøjret vesikel med en pH-sensor får indsat en protonkanal (gramicidin A) ved lavt pH. Når protonkanalen indsættes i den ellers uigennemtrængelige fedtmembran, skifter vesiklen farve fra rød til grøn, på grund af udstrømningen af protoner til den omgivende opløsning af højere pH. På diagrammet er der vist eksperimentelle målinger, hvor pH-værdien blev målt for enkelte



vesikler. Det ses tydeligt af grafen, at pH-værdien steg, idet gramicidin A blev aktiveret og begyndte at transportere protoner ud af vesikkelens indre.

Den viste pH ændring svarer til, at der blev transporteret ca. 1 proton til den omgivende opløsning fra vesikkelens indre. På nanoskala kan en enkelt proton således forårsage et stort skift i pH.

er Carboxy Fluorescein. Denne sensor fluorescerer grøn for pH 5-6 og skifter herefter gradvist farve til rød for pH 9-10. En nanokolbe funktionaliseret med en sådan molekylær pH-sensor kan bruges til at rapportere aktiviteten af en protonpumpe indsat i vesikkelens membran (se figur 4).

Med denne metode har vi kunnet måle pH i lumen af en enkelt vesikel med en radius på ca. 100 nm. Med et sådant ekstremt lille volumen, kan man måle ændringer svarende til, at der transporteres ca. 1 proton fra vesikkelens indre til den omgivende opløsning. Det viser sig, at på nanoskala kan en enkelt proton forårsage et stort skift i pH.

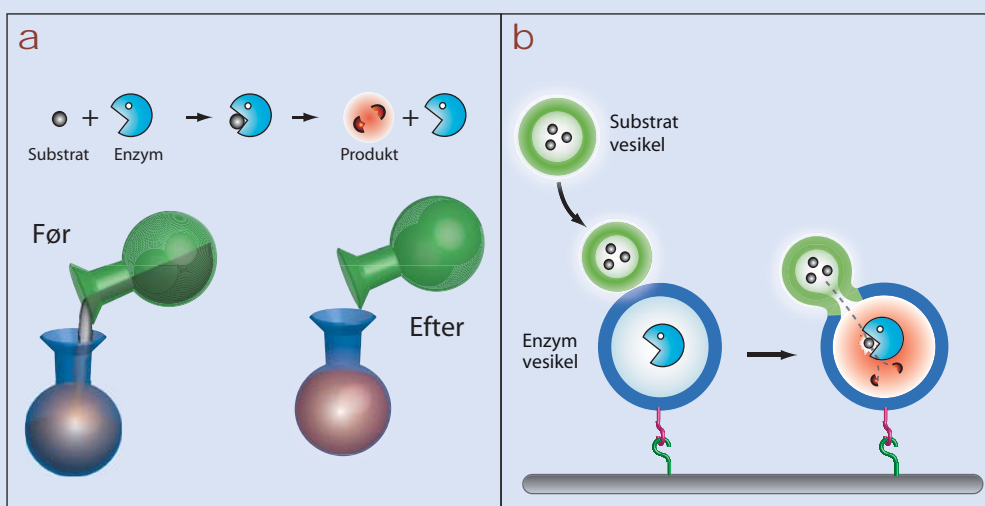
### Kunsten at blande på nanoskala

En af de mest fundamentale operationer i et laboratorium er at blande væsker sammen, figur 5a. Hvor denne opgave er triviell på makroskopisk skala, er det langt mere kompliceret, at foretage denne proces kontrolleret, når flasker er erstattet af nanokolber, der er så små, at de ikke kan ses med det blotte øje, ej heller observeres i et almindeligt mikroskop. På denne skala er det meget svært fysisk at tage to beholdere, føre dem sammen og blande deres indhold. Denne yderst delikate opgave er nu blevet løst. Der er blevet udviklet vesikler med særlige fedtmembraner, der har den egenskab, at forskellige vesikler kan finde hinanden i en opløsning og blande indhold i det øjeblik kontakt opnås, figur 5b. Tøjres en sådan vesikel nu til en overflade, kan den overvåges ved mikroskopi, og herved kan den kemiske reaktion følges imens den forløber, når vesiklerne smelter sammen og de to nanokolbers indhold blandes.

På denne måde er det muligt at analysere enzymatiske reaktioner, som netop kræver sammenblanding af to opløsninger.

Muligheden for kontrolleret at blande meget små volumener af opløsninger udgør en af grundstenene i udviklingen af vesikel-baserede laboratorier.

## Enzymatisk reaktion i vesikler



Figur 5. Figuren skitserer en reaktion, hvor et substrat blandes med enzymet og efterfølgende kløves til et produkt, der udstråler rødt lys (a). Blandes opløsninger af substrat og enzym, kan reaktionen følges, ved at måle intensiteten af den røde farve i opløsningen og herved opnå indsigt i enzymets egenskaber. Dette eksperiment kan udføres ved hjælp af vesikler (b).

I det viste eksperiment er et enzym fanget i en vesikel, som er bundet til en overflade (vesikelmembranen er farvet blå, så den kan ses ved hjælp af fluorescens-mikroskopi). Substratet er indkapslet i en anden type vesikel (mærket med grøn farve). Når substrat og enzym blandes, dannes et rødt farvestof.



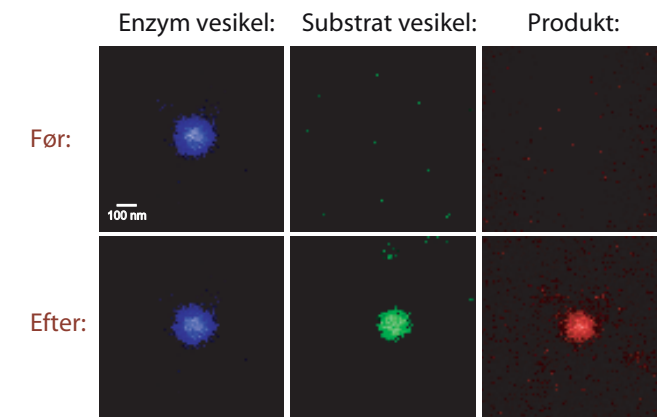
Foto: Nano-Science Centeret

Prøver under forberedelse i Bio-Nanoteknologi Laboratoriet.

Ved en drastisk reduktion af størrelsesforholdene i den klassiske kolberekation er døren åbnet for en ekstrem høj grad af effektivisering af mange biokemiske forsøg. De to vigtigste fordele er dels, at der nu kan foretages utrolig mange forsøg samtidigt og på meget lidt plads og dels, at man kan arbejde med volumener så små, at de indeholder helt ned til et enkelt proteinmolekyle, som kan blandes parallelt. Det sidste åbner et vindue til en helt ny videnskabelig disciplin, der beskæftiger sig med studiet af enkelte molekylers opførsel.

### Revolution i vente

De seneste års forskningsmæssige fremskridt har skabt teknologien til at udnytte enkelte vesikler som uafhængige biokemiske laboratorier. På sigt forventes dette, at revolutionere den traditionelle måde at foretage eksperimenter på, idet ultra-miniaturiserede laboratorier vil erstatte den mere traditionelle tilgang, hvor opløsninger blandes i kolber, og målinger



Figur 6. Figuren viser mikrofotografier af de tre farver optaget før og efter, at indholdet af de to vesikler blev blandet. Først ses en blå plet svarende til en enkelt vesikel tøjet på overfladen. Da en vesikel med substrat lander på overfladen opstår et signal fra den grønne farve. Sluttelig ses et rødt signal, som viser, at indholdet af de to vesikler succesfuldt er blandet.

foretages ved hjælp af makroskopisk apparatur. I fremtidens biokemiske laboratorier foretages hele eksperimenter i en selv-samlet nanokolbe og målinger foretages lokalt på nanoskala. Længere ude i fremtiden kan den øgede viden om, hvordan biologiske systemer virker på nanoskala, bruges til at bygge

syntetiske biologiske komponenter såsom kunstige organer, fotosyntese-baserede solceller, kunstigt immunforsvar, intelligent medicin og biokompatibel elektronik. ■

Elektron-mikrofotografierne er venligst stillet til rådighed af lektor Gert H. Hansen.

### Om forfatterne



Sune M. Christensen er ph.d.-studerende  
E-mail: [sunemc@nano.ku.dk](mailto:sunemc@nano.ku.dk)  
Tlf.: 35320385



Andreas H. Kunding er ph.d.-studerende  
E-mail: [akunding@nano.ku.dk](mailto:akunding@nano.ku.dk)  
Tlf.: 35320385



Dimitrios Stamou er lektor og leder af Bionanotek. Lab.  
E-mail: [stamou@nano.ku.dk](mailto:stamou@nano.ku.dk)  
Tlf.: 35320479

Alle er ved Bionanoteknologi Laboratoriet under Nano-Science Centeret på Københavns Universitet.  
<http://nano.ku.dk/groups/nanobio>

### Yderligere læsning

Bjørnholm, T. 2003: Nye uddannelser i nanoteknologi – Danmark i front. *Naturens Verden* 2003/7/8, side 12

Christensen, S. M. & Stamou, D, 2007: Surface-based lipid vesicle reactor systems: fabrication and applications. *Soft Matter*, Vol. 3, side 828

Kunding, A. H., Mortensen, M. W., Christensen, S. M. & Stamou D, 2008: A fluorescence-based technique to construct size distributions from single-object measurements: Application to the extrusion of lipid vesicles. *Biophysical Journal*, Vol. 96

To hjemmesider:  
[www.nano.ku.dk](http://www.nano.ku.dk) og  
[www.nanotek.nu](http://www.nanotek.nu)