

## Využití AFM mikroskopie při mapování mechanických vlastností

Jan Příbyl, Radka Obořilová, Jakub Máčala

*CEITEC MU, Masarykova univerzita*

*Email: [jan.pribyl@ceitec.muni.cz](mailto:jan.pribyl@ceitec.muni.cz)*

### 1. Úvod

#### 1.1. Popis techniky

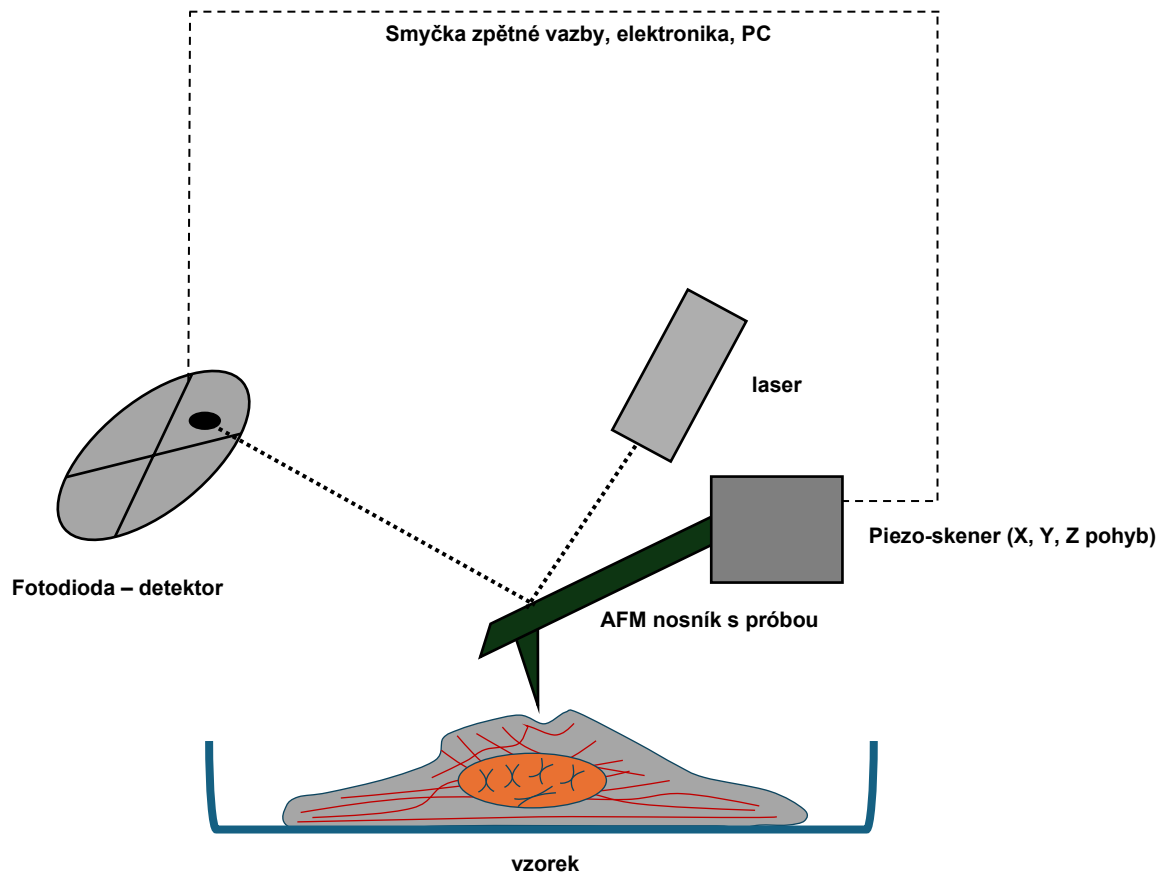
Mikroskopie atomových sil (AFM)<sup>(1)</sup> je zobrazovací technika založená na rastrovacím pohybu sondy nad studovaným povrchem. Výsledkem této interakce je trojrozměrný obraz povrchu. Zjednodušeně lze konstatovat, že geometrie sondy ovlivňuje rozlišení, které může dosahovat až subnanometrových hodnot. Sledování různých parametrů interakce pak vede k tomu, že AFM poskytuje nejen topografický obraz povrchu, ale také informaci o rozložení adhezních sil, materiálovém složení, magnetických silách, tuhosti a dalších parametrech povrchu. Sonda totiž interaguje s povrchem vzorku prostřednictvím různých sil<sup>(2)</sup>, jako jsou van der Waalsovy síly, elektrostatické síly a mechanické kontaktní síly.

#### Popis přístroje

AFM se skládá z několika klíčových součástí (Obrázek 1)<sup>(3)</sup>. Srdcem mikroskopu je sonda (většinou ostrý pyramidální hrot, ale používají se i jiné tvary) umístěná na mikroraménku (nosník, nesprávně se označuje anglikanismem kantilever). Interakce sondy s povrchem je sledována prostřednictvím ohybu raménka, a to nejčastěji pomocí laserového paprsku, který je směřován na čtyřsegmentovou fotodiodu. Existují ale i jiné způsoby indikace ohybu. Jemné pohyby mikroraménka jsou obstarávány piezoelektrickým skenerem, což je keramická tyčinka potažená elektrodami, která na ni přivádí vysoké napětí, jenž způsobuje její pohyb. Systém zpětné vazby řídí velikost tohoto napětí na základě analýzy interakce mezi sondou a povrchem. Systém řízení zpětné vazby, vysílání napětí do piezoelektrických skenerů, analýza jednotlivých signálů a komunikace s počítačem a dalšími periferiemi jsou umístěny v řídicí jednotce, což bývá nejdražší součást celého AFM.

#### 1.1. Měřicí módy

Ve srovnání s jinými mikroskopiemi je AFM vlastně mikroskopií mechanickou, tj. vyhodnocující vlastnosti vzorku na základě interakce s próbou. Při kontaktu s povrchem pak próba proniká i do jeho struktury a umožňuje tak sledovat i vlastnosti pod povrchem, hovoříme o tzv. indentaci. Sonda zprostředkovávající interakci s povrchem pak může vykonávat různý pohyb ve všech osách, tím je pak řízen i měřicí režim<sup>(4)</sup>, tj. směr a způsob pohybu nosníku se sondou vzhledem ke vzorku.



Obrázek 1: Schéma AFM mikroskopu, adaptováno z publikace (3).

### Kontaktní režim

Je nejstarší a nejjednodušší způsob měření, při kterém je hrot (nebo jinak tvarovaná sonda) v nepřetržitém kontaktu s povrchem vzorku. Může pracovat ve dvou módech, a to v módu konstantní síly a konstantní výšky. V prvním módu je výchylka konzoly monitorována, aby se pomocí smyčky zpětné vazby udržovala konstantní síla mezi hrotem a vzorkem. Ve druhém se pak sonda pohybuje v konstantní výšce nad povrchem a je měřena aktuální výchylka nosníku. Kontaktní mód se využívá především pro zobrazování pevných a tvrdých povrchů, výhodou je experimentální jednoduchost a snadná kombinovatelnost např. s tzv. víceprůchodovými módy, kdy je v prvním průchodu měřena topografie a v druhém pak magnetické či vodivostní vlastnosti povrchu. Mezi nevýhody se často řadí destruktivnost při práci s měkkými vzorky (např. buňkami).

Zvláštní podskupinu kontaktního módu měření pak představuje tzv. plně indentační režim, při kterém je vzorek deformován do dosažení zadané síly. Tuto deformaci popisuje silová křivka (závislost síly na výšce), jejím zpracováním pak dostáváme informace o elasticitě v daném bodě. Naměřením sítě těchto bodů pak vznikají mapy elasticity, vyjádřené jako rozložení Youngova modulu pružnosti.

Při měření s čtyřbokou pyramidou lze Youngův modul pružnosti vypočítat proložením silové křivky rovnicí<sup>(5)</sup> (1).

$$F = \frac{F \tan(\alpha)}{(1-\nu^2)\sqrt{2}} \delta^2 \quad (1)$$

Kde  $F$  je hodnota síly,  $E$  je Youngův modul pružnosti,  $\nu$  je Poissonova konstanta,  $\alpha$  je úhel který svírá prouba s nosníkem,  $\delta$  je hloubka indentace (distance).

### Polokontaktní (pokleповý) režim

V tomto režimu se nosník rozkmitává v blízkosti své rezonanční frekvence a přerušovaně se dotýká povrchu vzorku. Amplituda kmitání se využívá k udržování konstantní interakční síly a její změna pak slouží k převedení na informaci o topografii povrchu. Fázová změna frekvenčního signálu pak doplňuje topografii o mechanických vlastnostech vzorku. Výhodami pokleповého režimu je jeho citlivost při použití na měkké vzorky. Je vhodný pro zobrazování v běžné atmosféře i v kapalině. Dosahuje nižších rychlostí zobrazování než kontaktní mód, u moderních přístrojů je jeho rychlost dostatečná i pro tzv. video-režim, tj. snímání s rychlostí vyšší než 15 obrázků za sekundu. Typicky se pak využívá pro zobrazování biologických vzorků, jakými jsou např. biomolekuly nebo buňky.

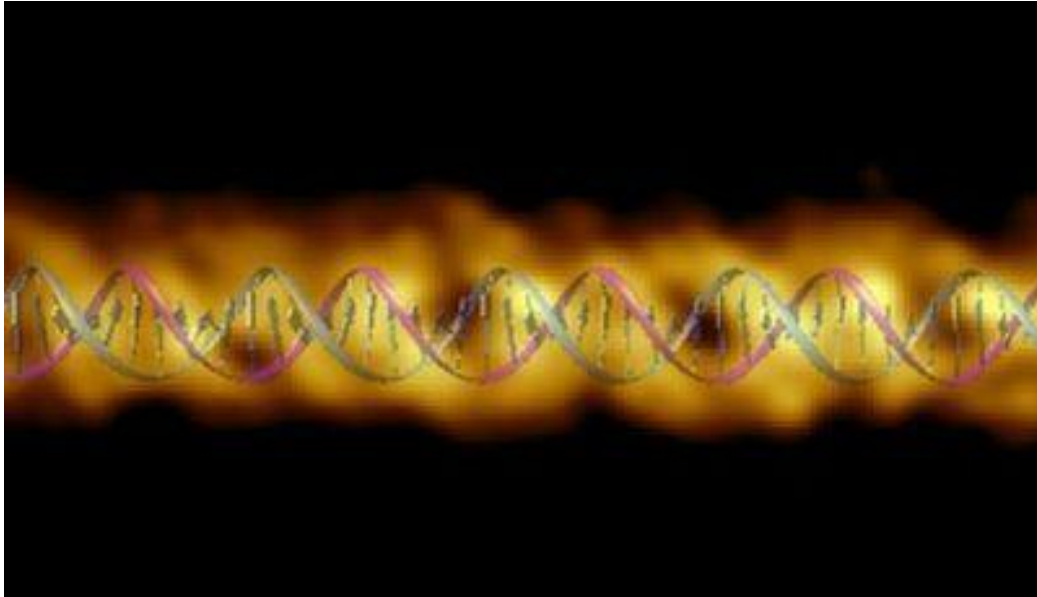
### Mimorezonanční pokleповý režim

Je nejnovější měřicí mód dostupný dostupný na nejmodernějších mikroskopech. Principem činnosti je rychlé přibližování k povrchu po velmi krátké výškové trajektorii, při kterém je zaznamenávána silová křivka (Obrázek 2). Jedná se o mimorezonanční poklep, kdy je nosník poháněn frekvencí mnohem nižší, než je jeho rezonance. Vzorovací frekvence je až 8 kHz, tj. každou sekundu se naměří a vyhodnotí 8 tisíc přibližovacích křivek, na jejichž základě je sestaven obraz povrchu s vysokým rozlišením spolu s mapováním elasticity či adhezivitu povrchu. Vysokou přesnost zobrazení určuje právě princip měření, kterým je udržení konstantní konstantní síly interakce v každém bodě.

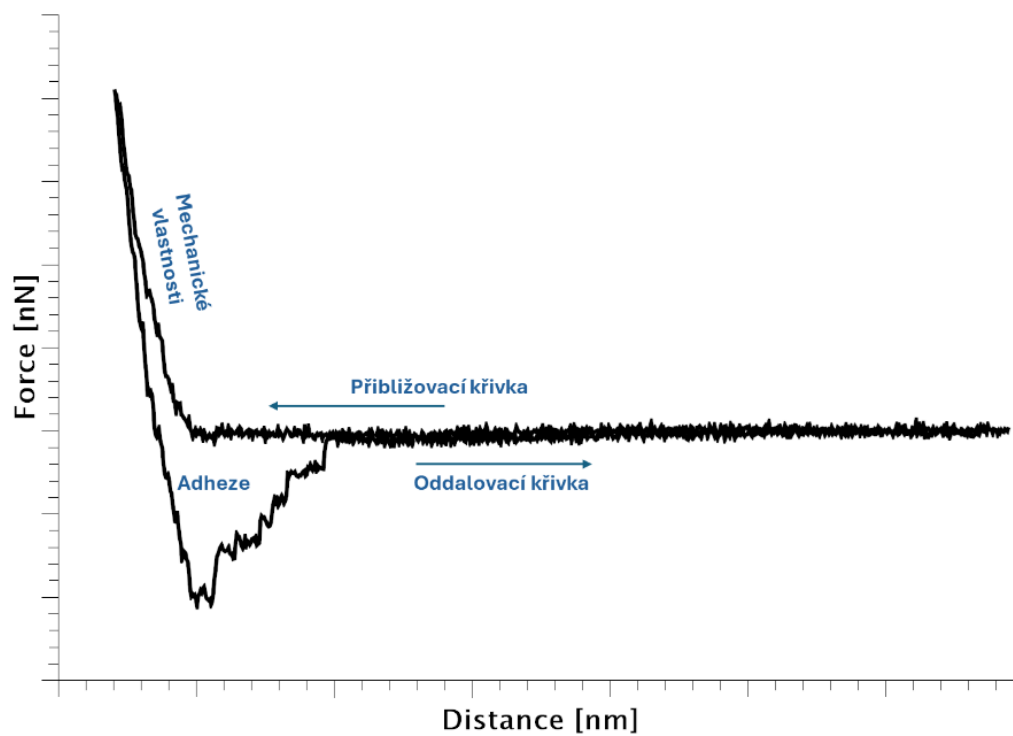
Tyto režimy mají komerční označení např. Peak Force Quantitative NanoMapping (PFQNM)<sup>(6)</sup>, Force Volume a Quantitative Imaging<sup>(7)</sup>.

Výhodami tohoto druhu měřicích módů je možnost dosáhnout velice podrobné mapy mechanických vlastností (např. tuhost, adheze). Jsou ideální pro práci prakticky se všemi druhy vzorků, od tuhých a rigidních materiálů až po měkké, hydratované vzorky typu biomolekul, gelů a buněk. Minimalizuje poškození choulostivých

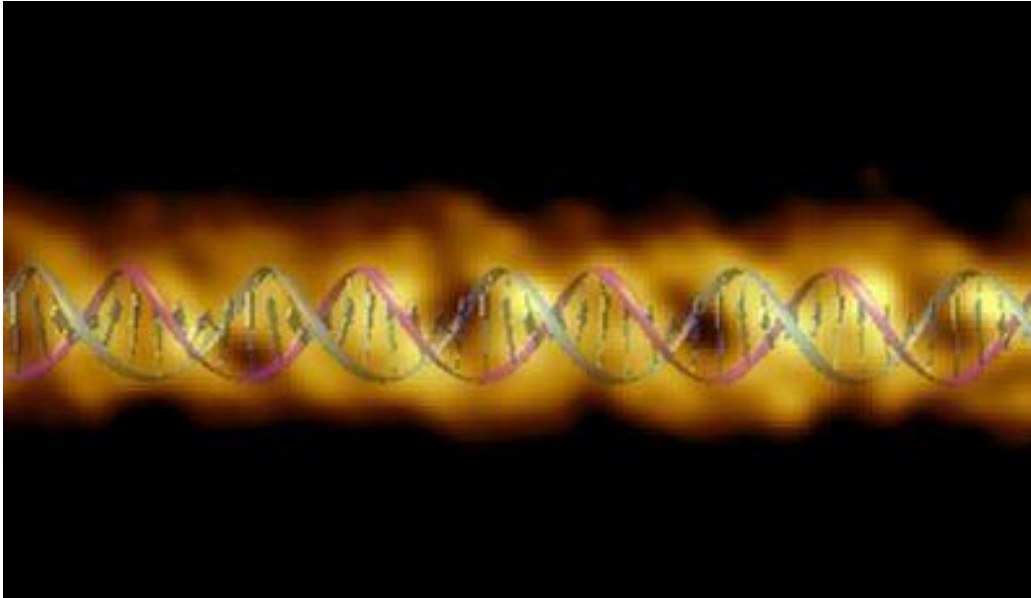
vzorků. Typickým příkladem je struktura dvoušroubovice DNA na



Obrázek 3.



Obrázek 2: Příklad silové křivky s vyznačenou přibližovací a oddalovací částí křivky, adhezním minimem a indentační částí, jejíž tvar odpovídá mechanickým vlastnostem vzorku.



Obrázek 3: Struktura dvoušroubovice DNA nasnímaná AFM mikroskopem pracujícím v PFQNM módu je provedena v odstínech hnědé. Teoretická Watson-Crickova struktura je schematicky znázorněna v barvách modré a růžové. Převzato z<sup>(8)</sup>.

## 1.2. Příklady použití

AFM je s výhodou využíváno pro zobrazování a další charakterizaci celé škály vzorků<sup>(9)</sup>, výhodou je snadná příprava a možnost zobrazování ve všech druzích prostředí – od prostředí vakua či inertního plynu až po fyziologické prostředí kultivačního roztoku. Pracovní teplota se může pohybovat od hlubokého mrazu až po teploty atakující 600 °C. Při vlastní aplikaci AFM se pak většinou pohybujeme ve dvou rovinách – použití pro charakterizaci připravených vzorků.tj. např. charakterizujeme drsnost leptaného povrchu, nebo pak pro analýzu struktury vzorku, který je přítomen v roztoku nebo suspenzi. První případ je jednoduchý, vzorek není potřeba nijak upravovat a je možné ho podrobit přímo vlastní analýze. Druhá možnost, tedy analýza struktury vzorku v roztoku, pak vyžaduje jeho vhodnou imobilizaci na podkladní materiál. Pro úspěšný experiment je potřeba splnit několik podmínek – vybrat vhodný podkladní materiál (chemické složení, drsnost, případně biokompatibilita), správný imobilizační postup a také optimalizovat koncentraci tak, aby na povrchu byla správná hustota studovaných objektů.

Plánování experimentu tedy začíná výběrem vhodného podkladního materiálu. Popíšme si teď ty nejčastěji používané. Tradičním materiálem je vysoce uspořádaný pyrolytický grafit (HOPG), vysoce uspořádaná forma čistého pyrolytického grafitu, grafitového materiálu s vysokým stupněm preferované krystalografické orientace, který se obvykle získává grafitizačním tepelným zpracováním uhlíku nebo chemickým napařováním. Jedná se o vrstevnatý materiál, který lze snadno čistit odlupováním horních vrstev. Je vodivý a vysoce hydrofobní. Hydrofobicita umožňuje nesespecifickou imobilizaci prakticky jakéhokoliv vzorku, tento druh interakce je však velmi silný a může vést k denaturaci biomolekul. To, spolu s vysokou cenou, brání jeho širšímu využití pro biologicky zaměřené experimenty. V této oblasti se naopak široce prosazuje muskovit (světlá slída), hydrofilní křemičitanový materiál, který má vrstevnatou strukturu, což se i zde s výhodou používá pro snadné čištění jeho povrchu. Isoelektrický bod tohoto materiálu je na hodnotě 3.1 a proto je pro většinu aplikací v biologii a

biochemii, tj. při pH kolem fyziologické hodnoty, nabit negativně. Na to je potřeba myslet, pokud imobilizuje vzorek pomocí iontové interakce. Např. DNA je také negativně nabitá, a proto je potřeba aplikovat systém, který tuto interakci zprostředkuje. Tím je např. použití dvojmocných kationtů ( $Mg^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ), polyelektrolytů (polylyzin) nebo silanizací povrchu v parách. Při imobilizaci proteinů je třeba se řídit jejich isoelektrickým bodem, tj. použít takové pH roztoku, aby byl protein kladně nabitý, tj. pH mezi isoelektrickým bodem muskovitu a proteinu. Iontová interakce pak dostatečně k tomu, aby biomolekuly byly dostatečně pevně zachyceny pro zobrazování v kapalině i v přirozené atmosféře.

Pro práci s živými buněčnými kulturami se i pro AFM aplikace používá standardní kultivační materiál, kterým je nejčastěji plast (polystyren, polypropylen) a sklo. Pro útvary velikosti buněk (plošná velikost v desítkách a výška v jednotkách mikrometrů) není potřeba používat materiál extrémně hladký (HOPG, muskovit). Samotná imobilizace pak probíhá přirůstáním buněk k podkladu, který se často modifikuje specifickými proteiny podporujícími adhezi (kolagen, fibrin, lamin). I zde stejně, stejně jako u sledování individuálních biomolekul platí, že sledované objekty musí být na podkladním materiálu dobře uchyceny, aby umožňovaly interakci s AFM sondou. Nelze tak proto pracovat se suspenzí mikročástic nebo neadhezivními buňkami.

## **2. Praktická úloha – zobrazování fágové DNA v nativních podmínkách**

### **2.1. Úvod**

Jak již bylo řečeno výše, v úvodní části, je AFM vhodnou metodou pro zobrazování struktury jednotlivých molekul DNA. Lze sledovat strukturální změny na úrovni molekul v prostředí blízkém fyziologickým podmínkám, tj. v pufrovaném prostředí s řízenou hodnotou teploty.

V praktické části si vyzkoušíme imobilizaci DNA na povrch pomocí monovrstvy polyelektrolytu polylyzinu a její zobrazení na moderním přístroji Bruker Dimension FastScan Bio v mimorezonančním poklepovém režimu PFQNM. Závěrem bude jednoduchý protokol o provedeném experimentu a jeho výsledek.

### **2.2. Praktické provedení**

#### **Pomůcky a chemikálie**

- AFM mikroskop Bruker Dimension FastScan Bio
- Sonda Bruker ScanAsyst-Fluid+
- Roztok DNA v TRIS pufru
- 0,1% roztok poly-L-lyzinu (pLL)
- TRIS pufr pH=7,4
- Muskovit upevněný na nerezové podložce
- Pipety automatické vč. špiček
- Plastové mikroskopavky
- Pinzeta

#### **Příprava vzorku pro zobrazování**

1. **Očistěte** povrch **muskovitu** na povrchu nerezového plíšku **lepící pásky** tak, aby byly viditelně odstraněny vrchní vrstvy, a přitom povrch zůstal bez šupin.
2. Na povrch muskovitu naneste **50  $\mu$ l 0,1% polylyzinu**, tj. tak aby celý povrch muskovitu byl pokryt kapkou tohoto roztoku.
3. Inkubujte **20 minut** při laboratorní teplotě, přikryjte víčkem Petriho misky.
4. Po skončení inkubace **opláchněte** roztok pLL velkým množstvím **TRIS pufru**, před dalším nanášením nenechte povrch zaschnout.
5. Naneste na povrch roztok **DNA** o koncentraci **1-5 nmol/l**, objem **50  $\mu$ l**, tj. opět tak, aby byl zakryt celý povrch muskovitu.
6. Inkubujte **20 minut** při laboratorní teplotě, přikryjte víčkem Petriho misky.
7. Po skončení inkubace opláchněte roztok pLL opakovaným přidáváním a odsáváním TRIS pufru (**5 x 100  $\mu$ l TRIS pufru**), před dalším nanášením nenechte povrch zaschnout, nechte na něm kapku TRIS pufru.
8. Takto je vzorek připraven pro zobrazování, přeneste ho do komory AFM, kde ho připevníte na měřící základnu.

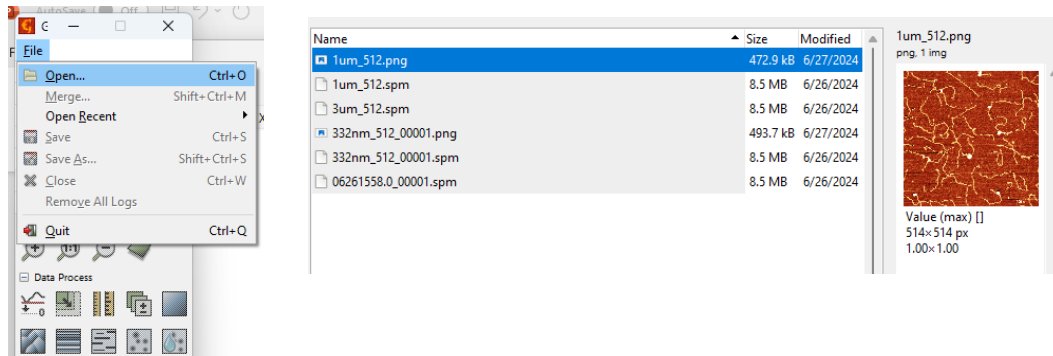
### Zobrazování DNA

1. V průběhu imobilizace vzorku s DNA, která je popsána v předchozím odstavci, si můžeme **připravit AFM mikroskop**.
2. Měřicí sondu **Bruker ScaAsyst Fluid+** umístěte pomocí pinzety do držáku Z-skeneru.
3. Na oblast sondy a okénka na tomto skeneru umístěte **30  $\mu$ l TRIS pufru**, tak aby tato oblast byla zakrytá pufrem.
4. Umístěte **Z-skener** do AFM mikroskopu a navigujte pohyb základnu se vzorkem a měřicí hlavu tak, aby se kapky vzorku a na skeneru navzájem spojily. Vznikne tím souvislý meniskus kapaliny, kterým může procházet světlo i laser AFM, vidíte optický obraz povrchu.
5. Další **nastavení** a vlastní **měření** proveďte podle přiloženého **videa** a dle **pokynů** personálu laboratoře, který vás bude experimentem provázet.
6. Uložené obrázky pak vyhodnoťte v softwaru Gwyddion (viz kapitola 2.3), vyexportujte a použijte ve finálním protokolu.

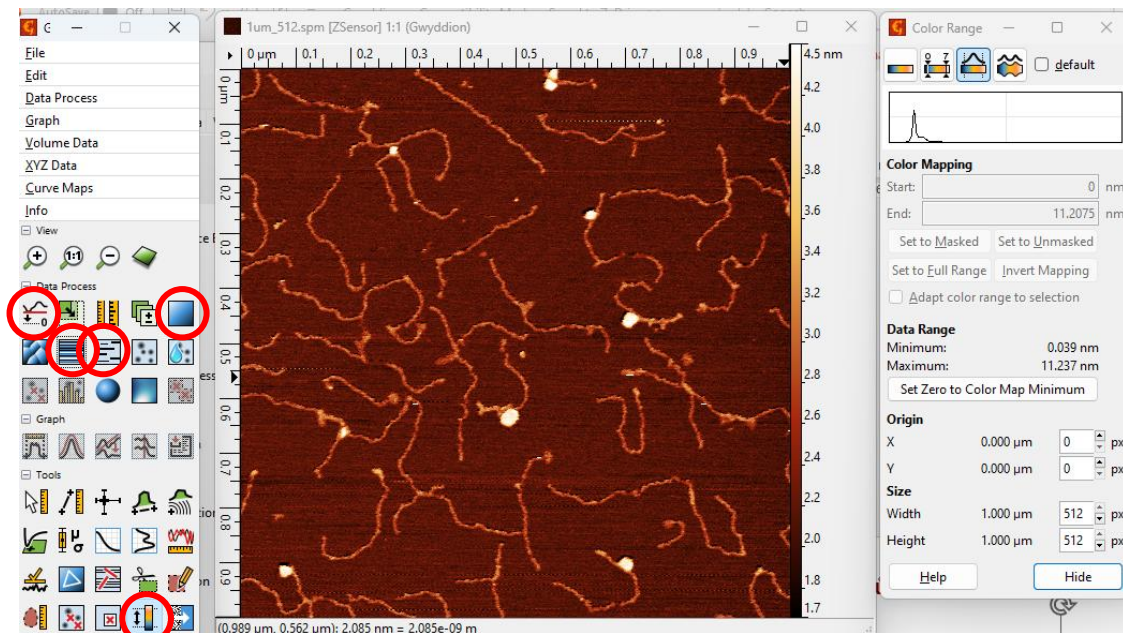
### 2.3. Vyhodnocení naměřených dat

Pro vyhodnocování dat z AFM mikroskopu je možné použít celou řadu programů, některé z nich jsou volně dostupné, jako např. software dodávaný s mikroskopem, Gwyddion, WSxM, atp., některé placené – např. SPIP. My použijeme software Gwyddion (více informací, vč. návodů a podpory na webu <http://gwyddion.net>), který má svou základnu v Brně.

1. **Otevření příslušného souboru** – v dialogu Open nebo přetažením z prohlížeče souborů:



- Pro zpracování obrázku je potřeba aplikovat několik funkcí, které jsou již v programu připraveny. V následujícím schématu jsou vyznačeny červenými kruhy. Použijte je v pořadí od horního levého rohu dolů, není to ale esenciální:



- Výsledný obrázek můžeme **vyexportovat** ve formátu **JPG** pomocí File – Save as.
- Zanalyzujte další vlastnosti řetězců DNA na obrázku, jako je např. délka řetězců, jejich průměrná šířka, drsnost povrchu atp.  
K tomu si najdete návod na stránkách softwaru Gwyddion - <http://gwyddion.net>.

### 3. Literatura



- **Video** popisující přípravu a zobrazování vzorku DNA, je uloženo ve **Studijních materiálech** tohoto předmětu.
- eKurz **CEIT\_NAN\_1 Přístroje a metody CF Nanobiotechnology** dostupný na [is.muni.cz](http://is.muni.cz) (vyberte místo studijního období eKurz).

- **Odborná literatura:**

1. Binnig G, Quate CF, Gerber C. The Atomic Force Microscope. *Physical Review Letters*. 1986;56:930–3.
2. Seo Y, Jhe W. Atomic force microscopy and spectroscopy. *Rep Prog Phys*. 2007;71:016101.
3. Kabanov D, Klimovic S, Rotrekl V, Pesl M, Pribyl J. Atomic Force Spectroscopy is a promising tool to study contractile properties of cardiac cells. *Micron*. 2021;103199.
4. Moreno-Herrero F, Colchero J, Gómez-Herrero J, Baró AM. Atomic force microscopy contact, tapping, and jumping modes for imaging biological samples in liquids. *Phys Rev E. American Physical Society*; 2004;69:031915.
5. Roa J, Oncins G, Diaz J, Sanz F, Segarra M. Calculation of Young's Modulus Value by Means of AFM. *Recent patents on nanotechnology*. 2011;5:27–36.
6. Young TJ, Monclus MA, Burnett TL, Broughton WR, Ogin SL, Smith PA. The use of the PeakForce™ quantitative nanomechanical mapping AFM-based method for high-resolution Young's modulus measurement of polymers. *Meas Sci Technol*. 2011;22:125703.
7. Chopinet L, Formosa C, Rols MP, Duval RE, Dague E. Imaging living cells surface and quantifying its properties at high resolution using AFM in QI™ mode. *Micron*. 2013;48:26–33.
8. Ido S, Kimura K, Oyabu N, Kobayashi K, Tsukada M, Matsushige K, Yamada H. Beyond the Helix Pitch: Direct Visualization of Native DNA in Aqueous Solution. *ACS Nano. American Chemical Society*; 2013;7:1817–22.
9. El Kirat K, Burton I, Dupres V, Dufrene YF. Sample preparation procedures for biological atomic force microscopy. *Journal of Microscopy*. 2005;218:199–207.

#### 4. Vzor protokolu k této laboratorní úloze

---

**Jméno, příjmení, ročník, obor**

**Datum** vypracování úlohy

**Použité pomůcky**

**Pracovní postup**

**Výsledky** – zahrnují grafický výstup a další parametry popisující zaznamenaný obrázek povrchu (délka řetězců, jejich šířka, drsnost povrchu atp.) a popis dosažených výsledků

**Závěr**