

Technologické aspekty biosensorů

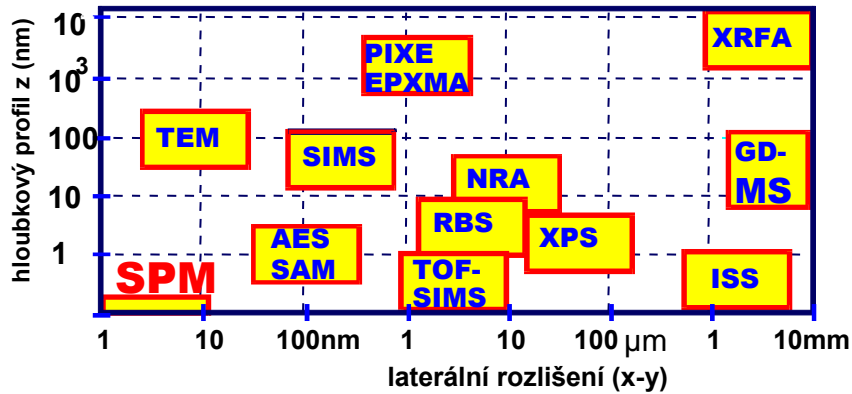
- miniaturizace
- nanotechnologie
- nanobiotechnologie
- nanobiosensory

Co to je nanobiotechnologie

Nanotechnologie zkoumá a vyvíjí struktury, které alespoň v jedné z dimenzí mají velikost od desetin po stovky nanometrů (nanočástice, nanodráty, nanovrstvy)

Nanobiotechnologie využívá biologické nanosystémy (biomolekuly, proteiny, nukleové kyseliny, vícemolekulární komplexy, viry, buněčné komponenty, ...) v technických systémech. Používá nanotechnologické postupy při zkoumání biologických systémů, s cílem získat informace obtížně dostupné „klasickými“ technikami.

Studium biopovrchů



AES	Auger electron spectroscopy	SPM	Scanning probe microscopy
EPXMA	Electron probe X-ray microanalysis	TEELS	Transmission electron energy-loss spectroscopy
GDMS	Glow discharge mass spectrometry	TEM	Transmission electron microscopy
ISS	Ion scattering spectroscopy	TOF-SIMS	Time-of-flight secondary ion mass spectrometry
PIXE	Proton-induced X-ray emission	XPS	X-ray photoemission spectroscopy
RBS	Rutherford back-scattering spectrometry	XRFA	X-ray fluorescence spectroscopic analysis
SAM	Scanning Auger microscopy		
SIMS	Secondary ion mass spectrometry		

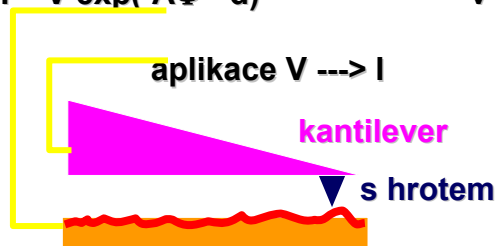
Principy SPM a AFM

Scanning tunneling microscopy

1982 (G. Binnig, H. Rohrer)

tunelování elektronů mezi hrotem průby a vodivým povrchem

$$I \sim V \exp(-A\Phi^{1/2}d)$$

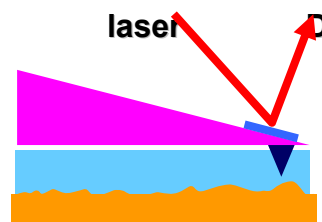


Atomic force microscopy

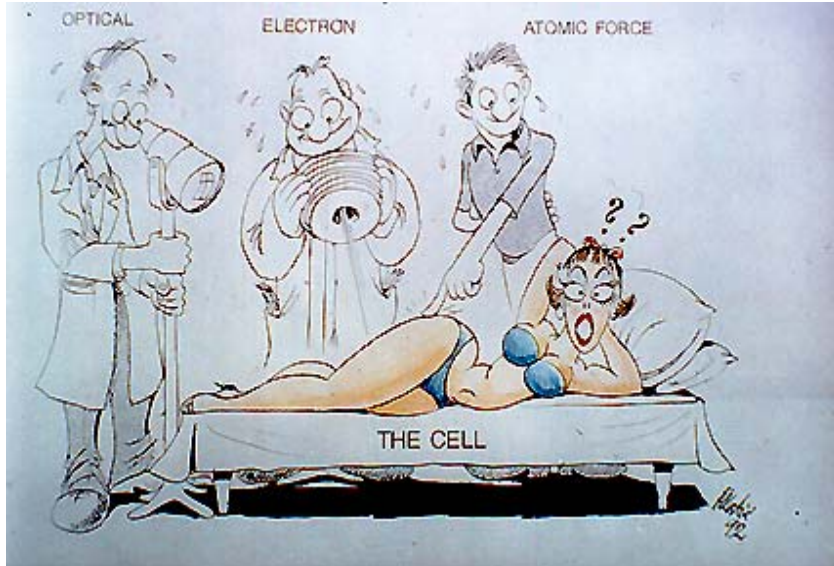
1986 (G. Binnig, C. Quate, C. Gerber)

Lenard-Jonesův potenciál

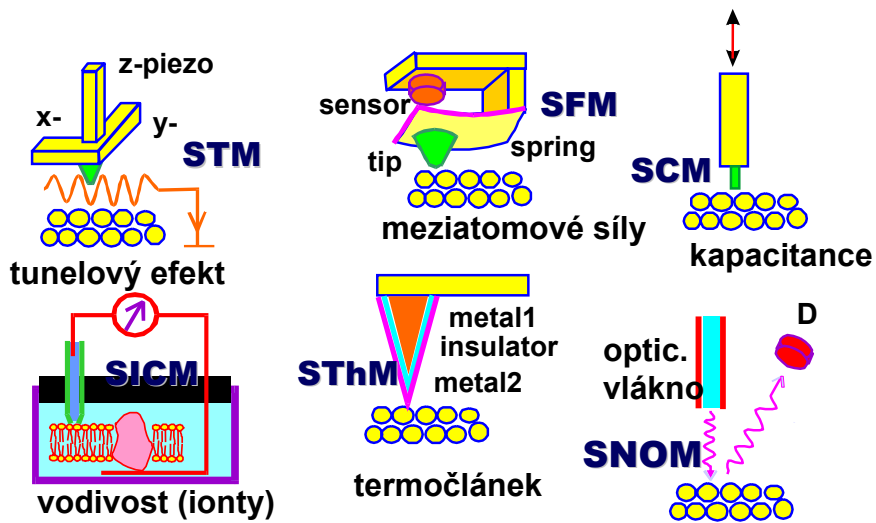
vhodné pro nevodivé povrchy a měření přímo v kapalinách



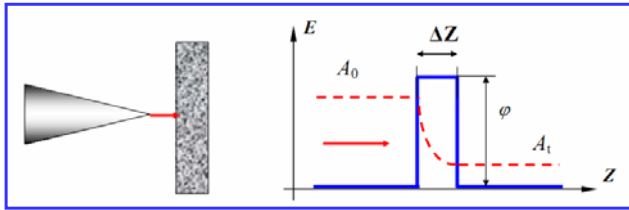
Mikroskopie...



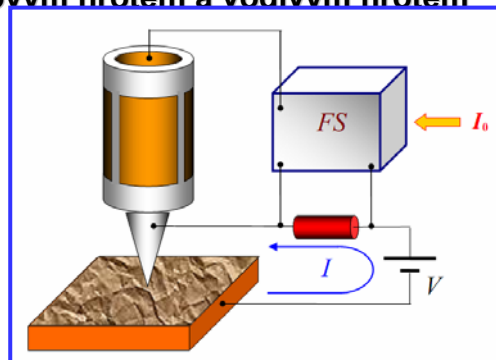
SPM (scanning probe microscopies)



STM scanning tunnelling microscopy

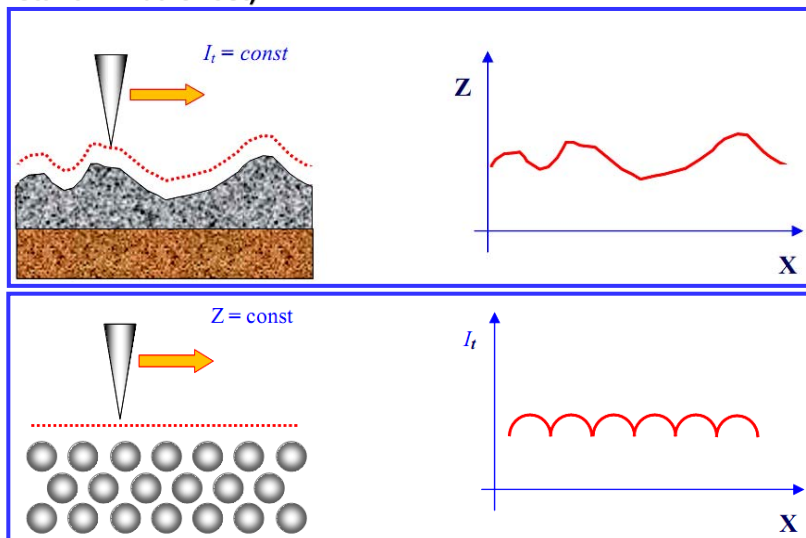


- založeno na tunelování elektronů přes potenciálovou bariéru mezi ostrým kovovým hrotem a vodivým hrotem v přítomnosti el. pole

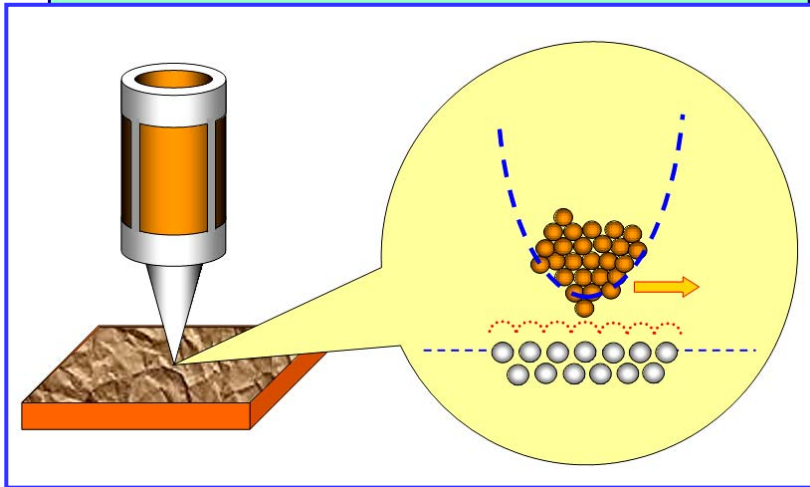


STM mody

- zpětnovazební operace - změna výšky (z) hrotu nad vzorkem tak, aby se udržoval požadovaný stav (konstantní proud nebo konstantní vzdálenost)

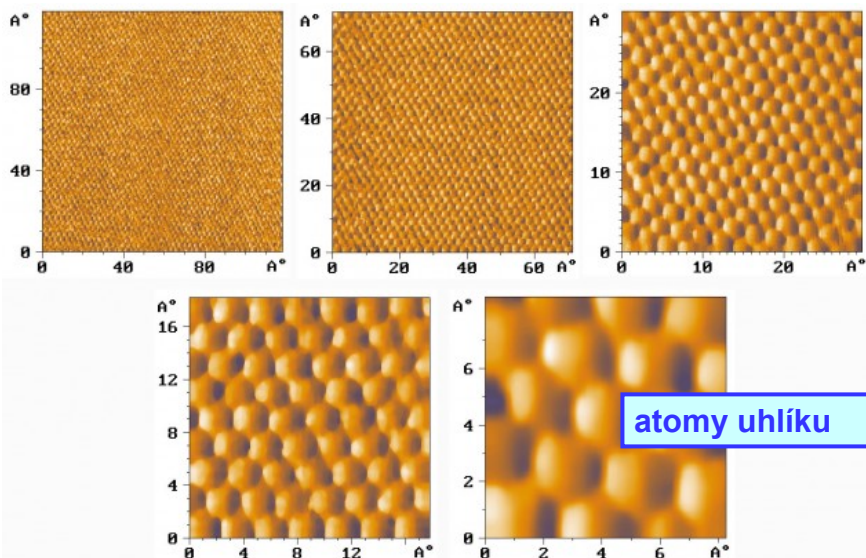


Atomární rozlišení



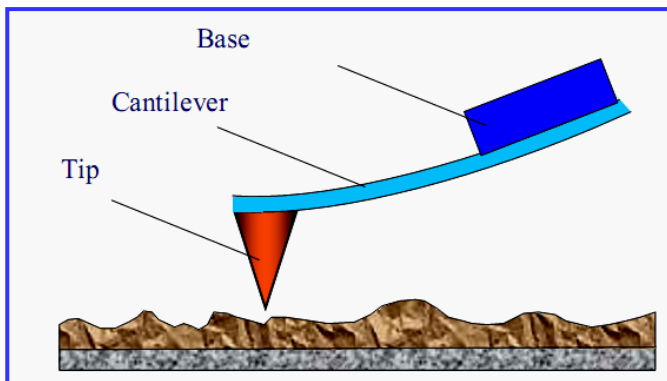
- atomy na povrchu hrotu a povrchové atomy vzorku spolu interagují

Atomární rozlišení



AFM, atomic force microscopy

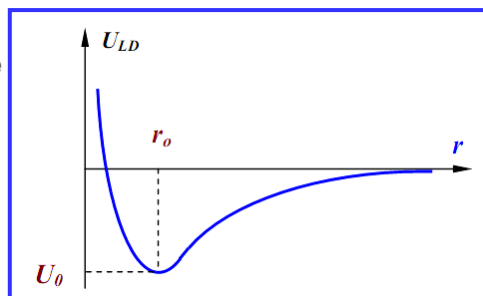
- principem je měření síly mezi hrotem a povrchem vzorku, hrot je umístěn na konci pružného nosníku (cantilever)
- vznikající síly vedou k prohnutí nosníku (deflection)
- na základě znalosti jeho tuhosti pak lze vyhodnotit velikosti působících sil



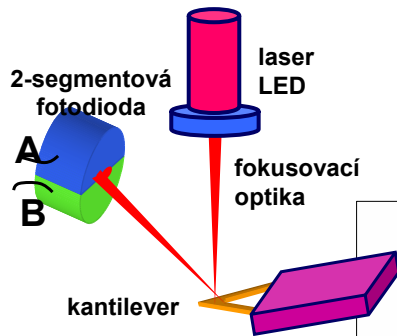
Interakční síly

- mohou být vysvětleny na základě van der Waalsových sil
 - van der Waalsova potenciálová energie mezi dvěma atomy ve vzdálenosti r je aproximována exponenciální funkcí - Lennard-Jonesův potenciál
 - první člen v sumě popisuje vzdálené přitažlivé síly dané interakcí dipólů
 - druhý člen se uplatní na kratší vzdálenosti - repulze daná Pauliho vylučovacím principem
 - r_0 je rovnovážná vzdálenost mezi atomy, hodnota energie je minimální

$$U_{LD}(r) = U_0 \left\{ -12 \left(\frac{r_0}{r} \right)^6 + \left(\frac{r_0}{r} \right)^{12} \right\}$$

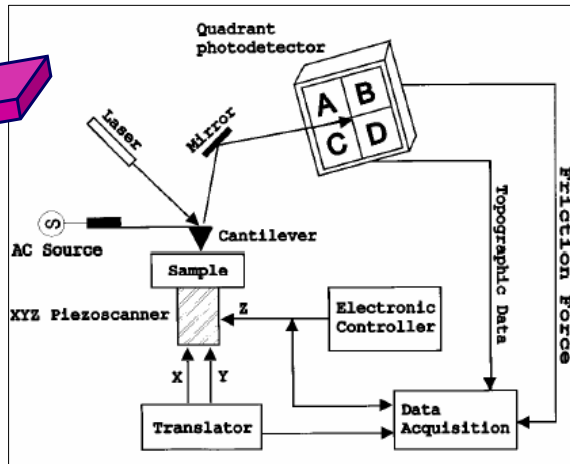


Optický „zesilovací“ systém

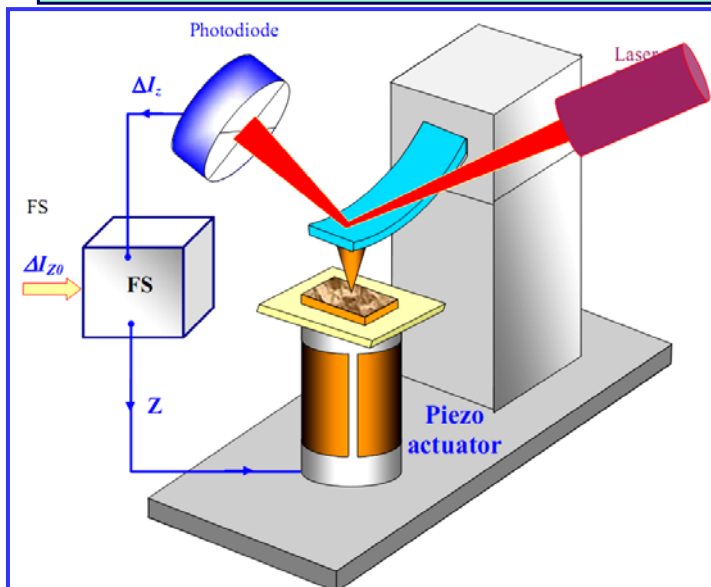


Schematické znázornění systému pro citlivé sledování vychýlení kantilevru

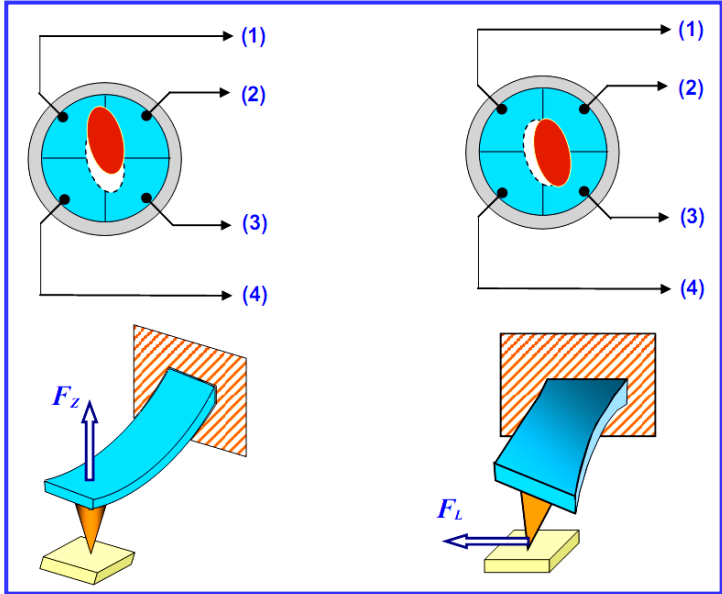
Rozdíl signálů A-B výstupních napětí segmentů fotodiody je úměrný velikosti vychýlky kantilevru



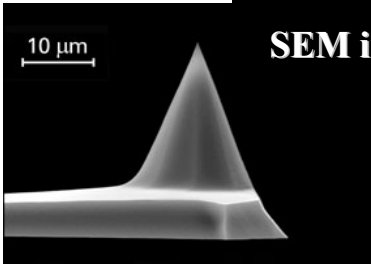
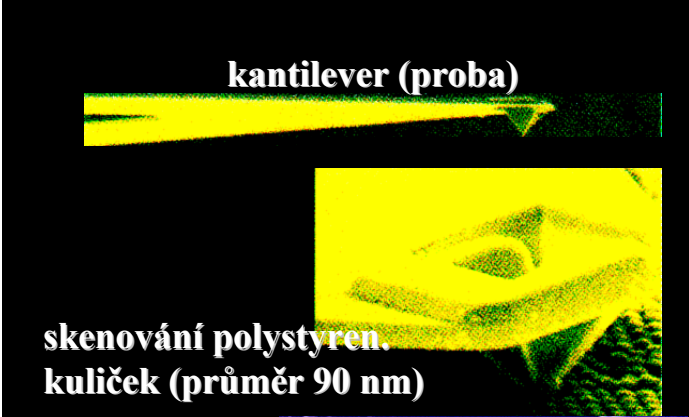
Zpětná vazba



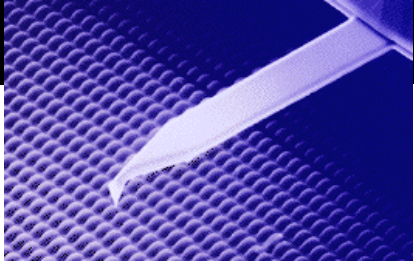
Vychylování nosníku



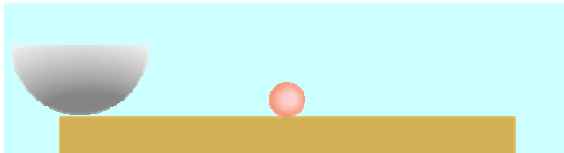
AFM



SEM image

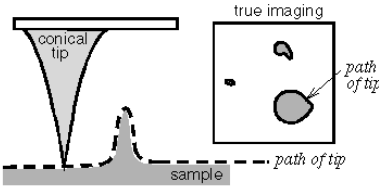


AFM: laterální rozlišení

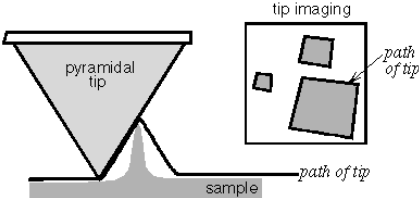


konvoluční efekt
hrotu-vzorku

nejlepší zakřivení hrotu cca 5 nm,
rozlišení je pak 1 až 2 nm



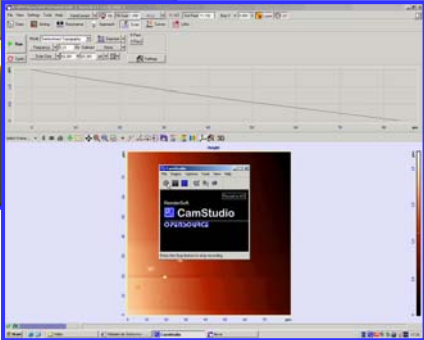
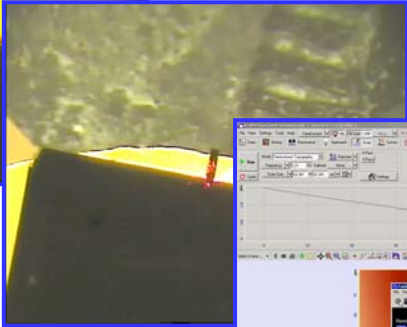
■ vliv konvoluce na topografii



Nastavení, sken, zobrazení



integrováný videomikroskop
přesné nastavení na
zkoumanou oblast

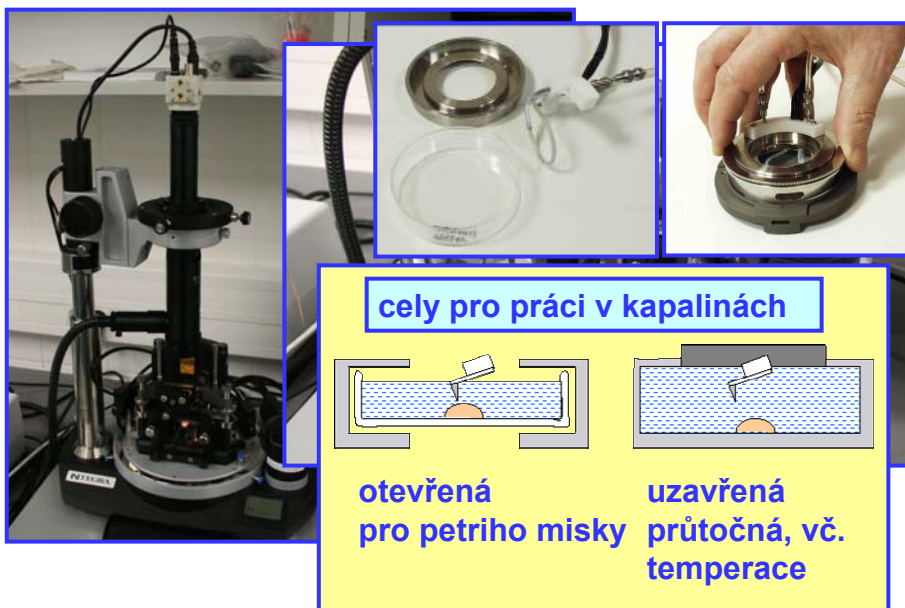


Instrumentace

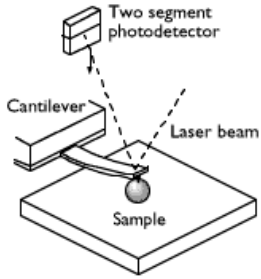
- MultiMode, Digital Instruments (Veeco)
- PicoPlus, Molecular Imaging
- skenovací hlava



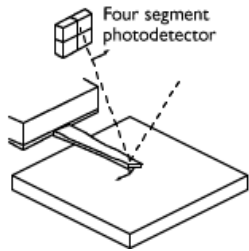
AFM systém Ntegra Vita



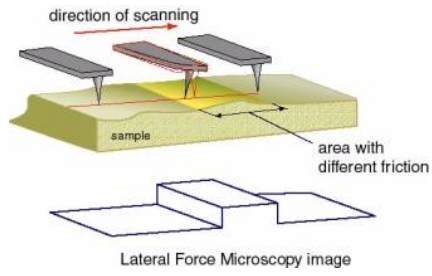
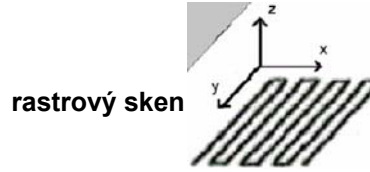
AFM: kontaktní mod



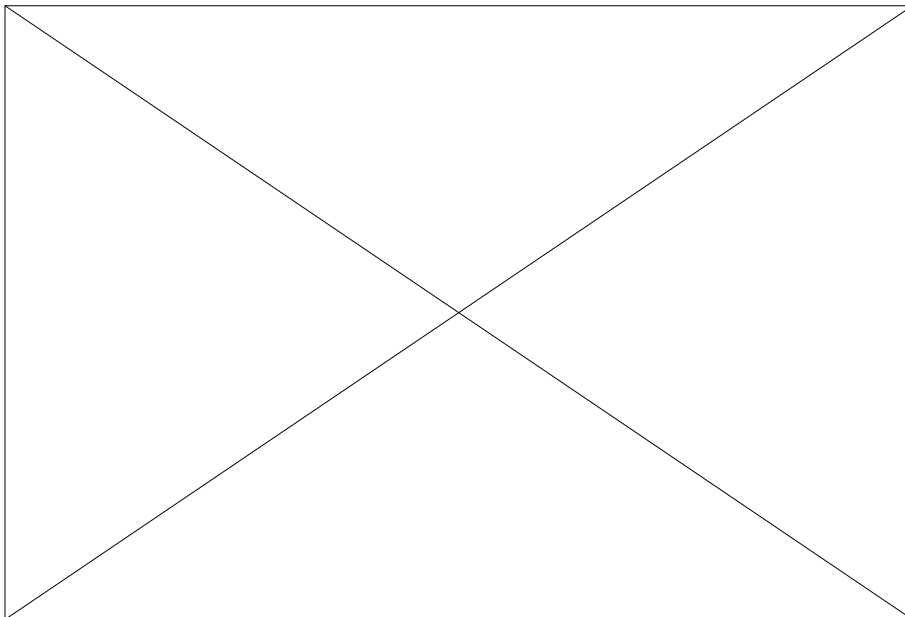
■ vertikální výchylka (deflektce) = topografie

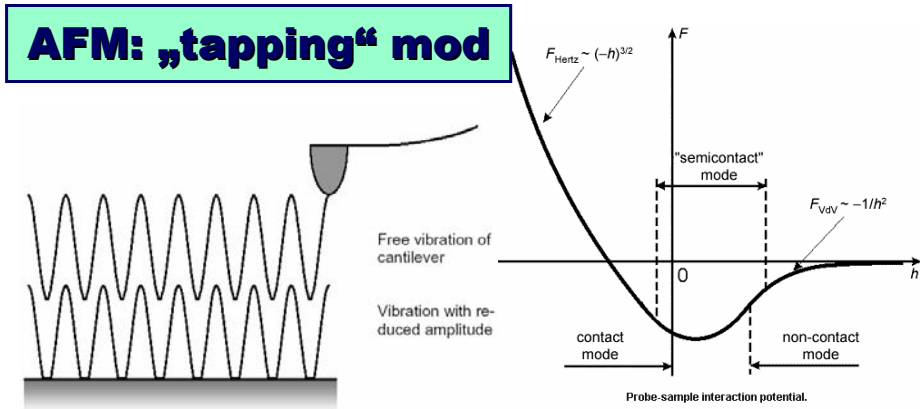


■ laterální výchylka = frikční síly



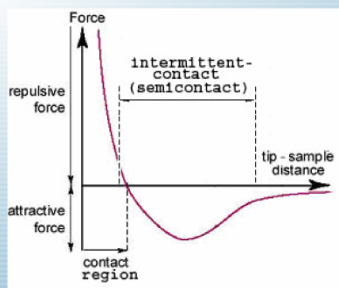
Contact modes





- kantilever vibruje blízko své rezonanční frekvence a zaznamenává se tlumení oscilační amplitudy
- nevadí frikční síly
- krátký kontakt hrotu s povrchem – povrch není tak poškozován (ani hrot) - pro biomolekuly

Semiconact modes



Semiconact techniques:

- Semiconact mode
- Phase Imaging mode
- Semiconact Error mode

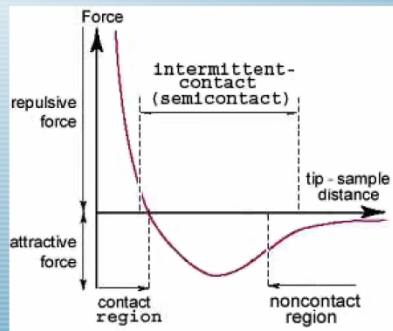
Usage of **SFM** with oscillating cantilever was firstly anticipated by **Binnig**. Relatively small shift of cantilever oscillating frequency with sensing repulsive forces means that contact of cantilever tip with sample surface under oscillation is not constant. Only during small part of oscillating period the tip "feels" contact repulsive force. Scanning sample surface with cantilever oscillated in this manner is not non-contact, but intermittent contact (semicontact).



Non-contact modes

Non-Contact techniques:

- ▣ Non-Contact mode
- ▣ Frequency Modulation mode



The **Non-Contact AFM (NC AFM)**, invented in 1987, offers unique advantages over other contemporary scanning probe techniques such as contact **AFM** and **STM**. The absence of repulsive forces (present in Contact **AFM**) in **NC AFM** permits its use in the imaging "soft" samples and, unlike the **STM**, the **NC AFM** does not require conducting samples.

Porovnání obou modů

■ kontaktní

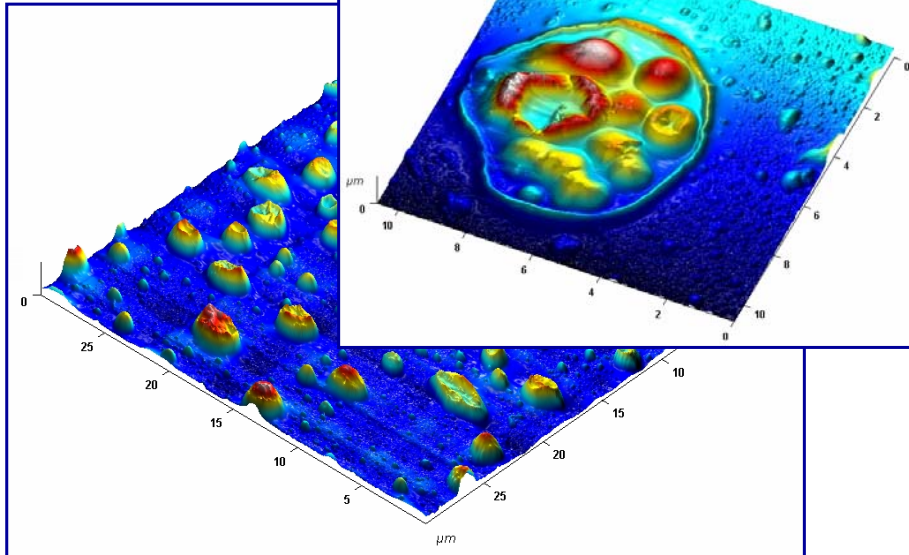
- + {
 - velká rychlost skenování
 - relativně snadné dosažení „atomárního“ rozlišení
- {
 - účinkem laterálních sil může docházet k deformaci zobrazovaných objektů
 - ve vzduchu se mohou projevit výrazně kapilární síly (kolmé na směr interakce hrot-vzorek) - zhoršené rozlišení
 - poškození měkkých povrchů „poškrábáním“ (u bioobjektů)

■ nekontaktní (semikontaktní)

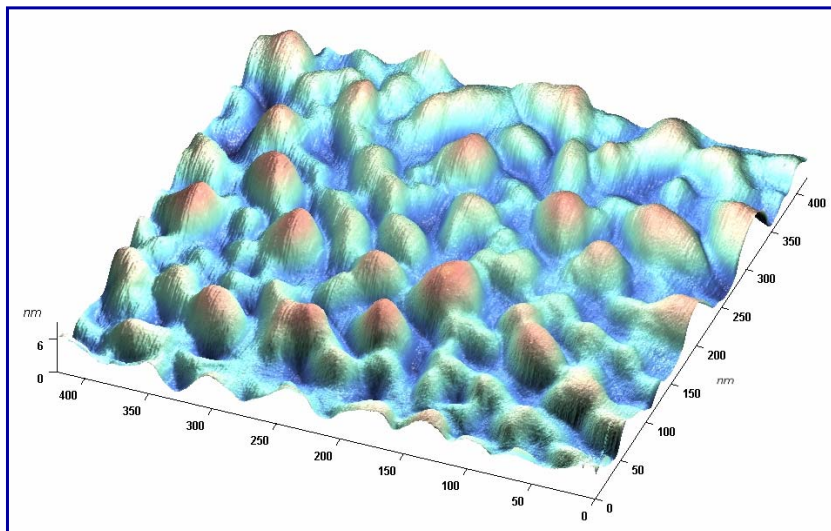
- + {
 - vyšší laterální (xy) rozlišení (1 až 5nm)
 - menší síly a menší poškození měkkých objektů na vzduchu
 - eliminace laterálních interakcí
- {
 - nízká rychlost skenování

Electropolymerizované vrstvy

- 1,4-diaminobenzen a resorcinol

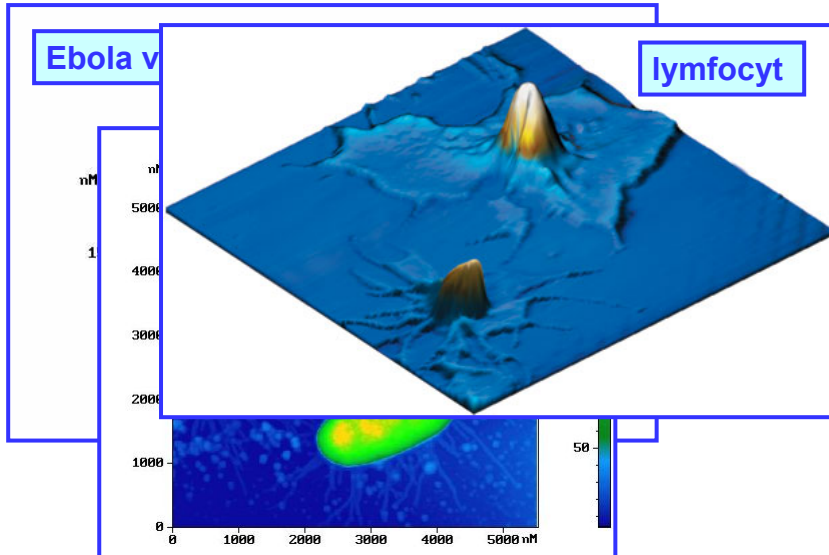


Au nanočástice



- slída (mica) silanizovaná thiol-modifikovaným silanem

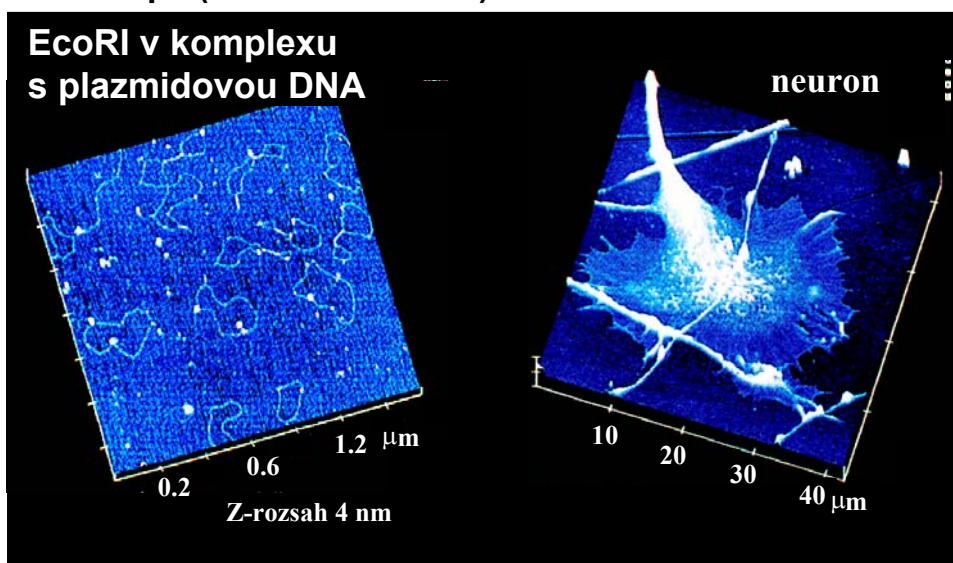
Viry a buňky (web NT-MDT)



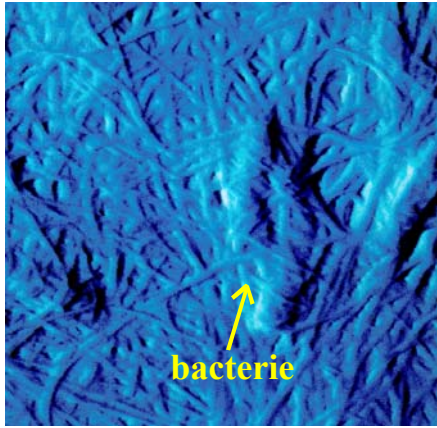
AFM DNA

BioScope (zvětšení až 10^7 x)

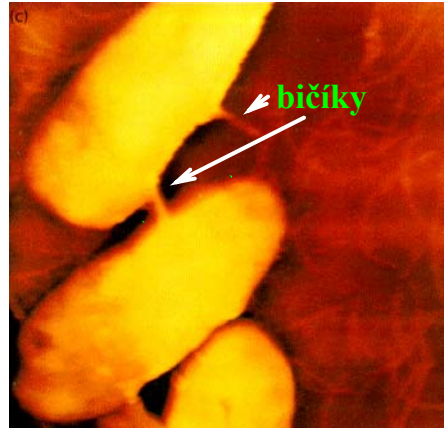
EcoRI v komplexu
s plazmidovou DNA



AFM bakterie

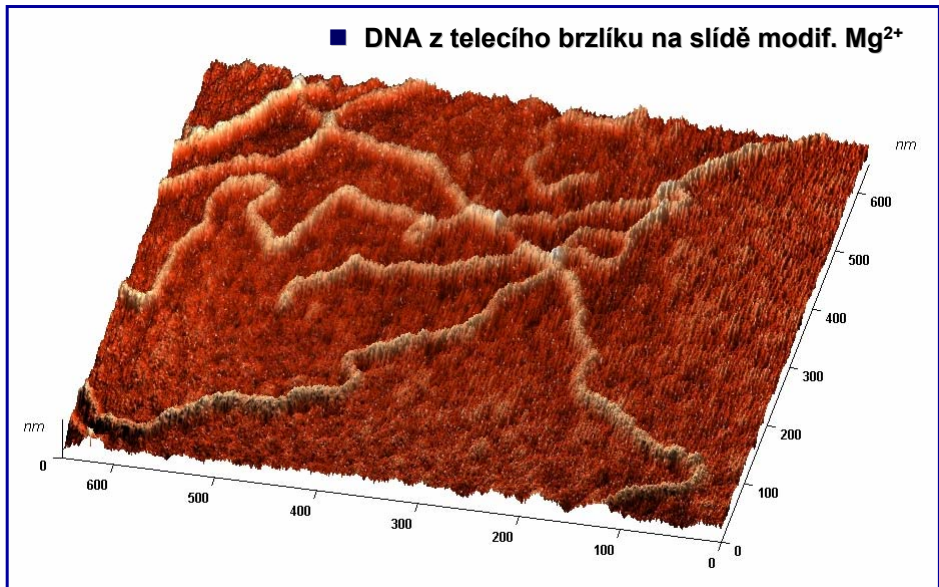


celulosa napadená bakterií
8x8 μm

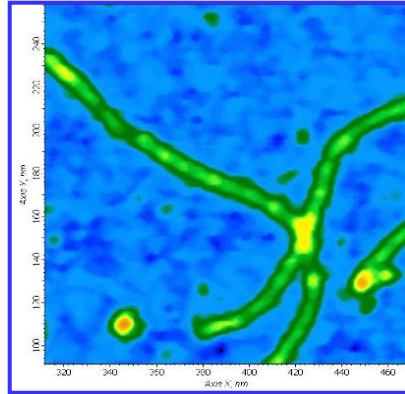
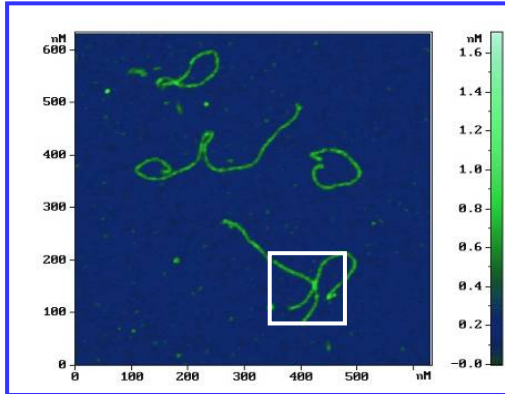


Pseudomonas putida
5x5 μm max. výška 500 nm

AFM nukleových kyselin

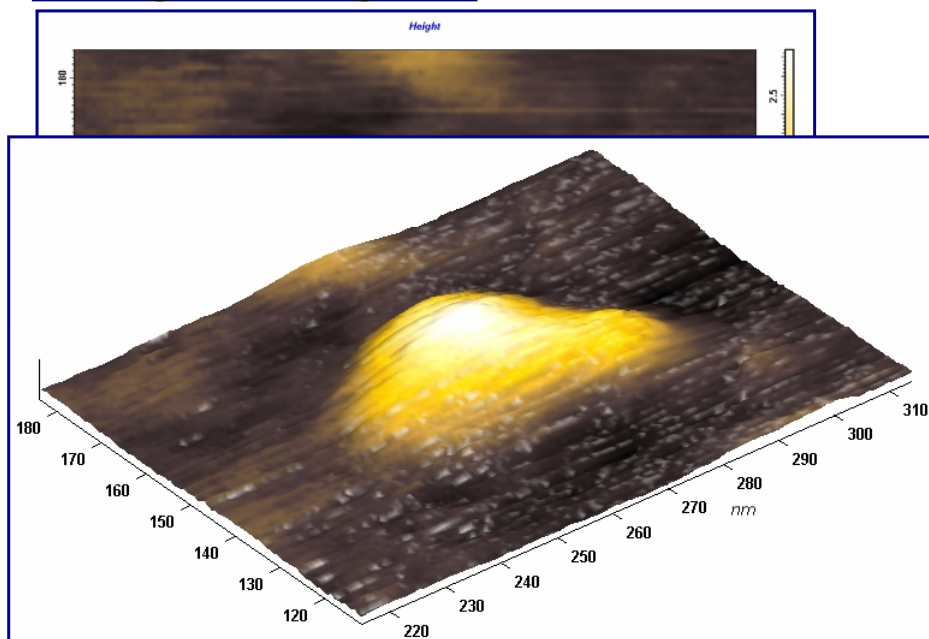


Biomolekuly ...

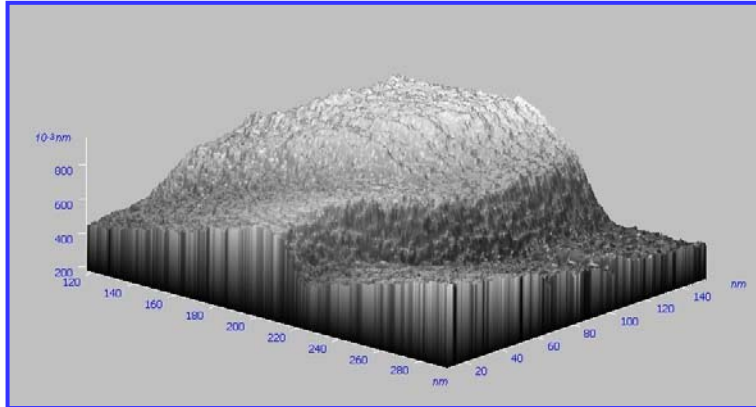


kolagen typu I-III, vpravo
zvětšeno a přebarveno

IgG detaily

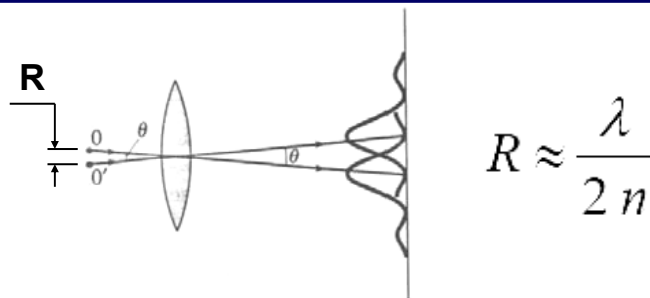


Atomární rozlišení



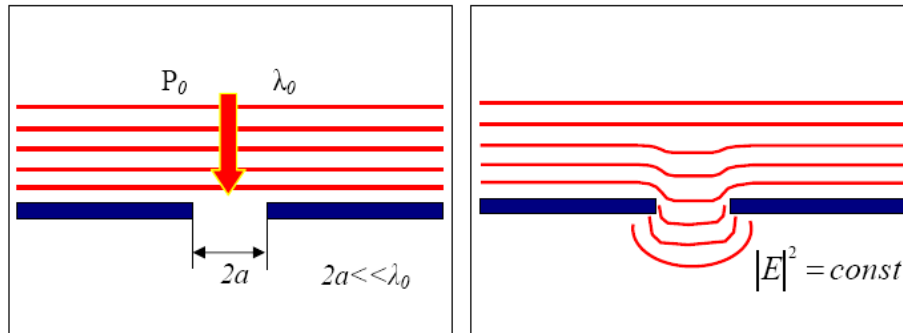
jednotlivé vrstvy atomů
uhlíku v orientovaném
pyrolytickém grafitu

Difrakční limit optických technik



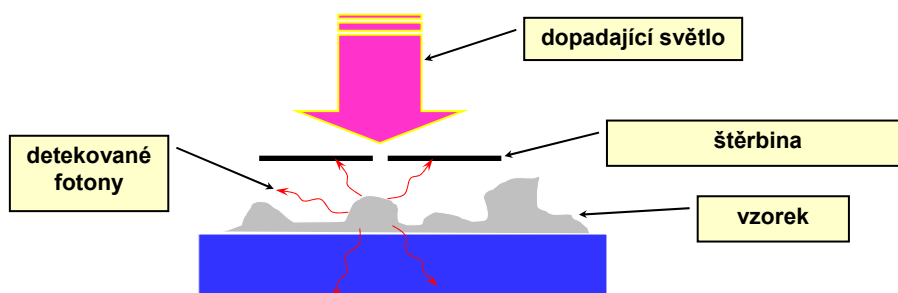
- světlo má vlnovou povahu, díky difrakci je bod zobrazován ne jako bod, ale jako soubor koncentrických kruhů s vyšší a nižší intenzitou
- minimální vzdálenost R pro rozlišení dvou blízkých bodů je asi polovina vlnové délky světla
- reálně to je kolem 150-200 nm pro viditelné světlo

Efekty blízkého pole



předchozí neplatí, pokud se zobrazovaný objekt nachází v blízkosti štěrbin mnohem menší než je vlnová délka světla - vzniká tzv. blízké pole - SNOM technika (scanning near field optical microscopy, nebo taky NSOM)

Základy SNOM

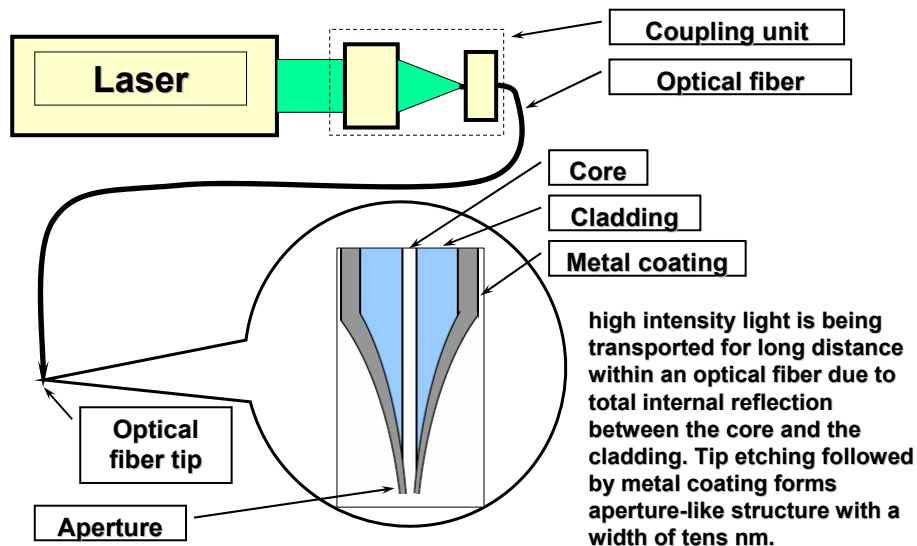


"sub-wavelength" štěrbina se přiblíží na několik nm k povrchu vzorku

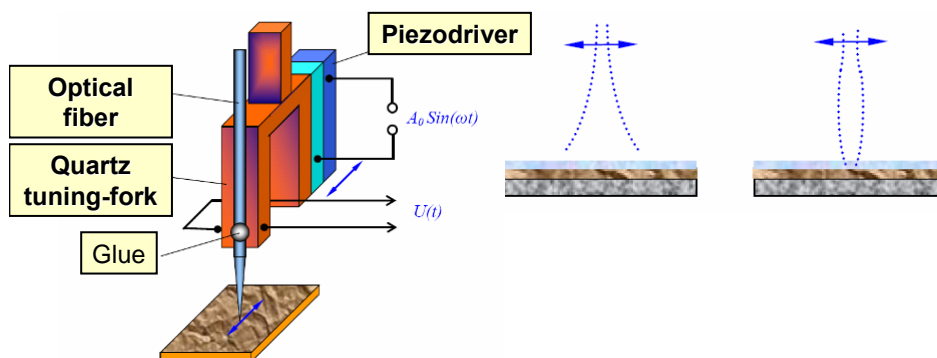
generované fotony jsou zachyceny detektorem

bod po bodu se skenuje 2D obraz povrchu s rozlišením kolem 1 nm.

Optické vlákno jako štěrbina



Shear-force feedback control



probe vibrates at resonance frequency of quartz tuning-fork. Amplitude and phase of such vibration significantly change when the probe tip arrives the closest proximity of the object surface. Feed-back control mechanism fixes parameters of new state providing precise height positioning of the tip. Thus shear-force topography image of the surface can be obtained simultaneously with near-field optical one.

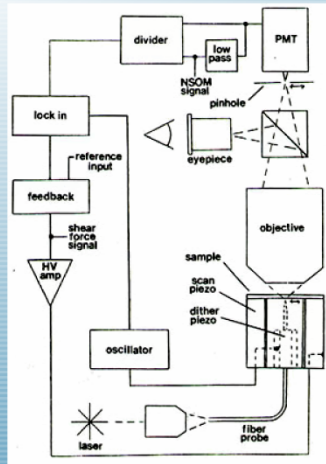
SNOM

SNOM:

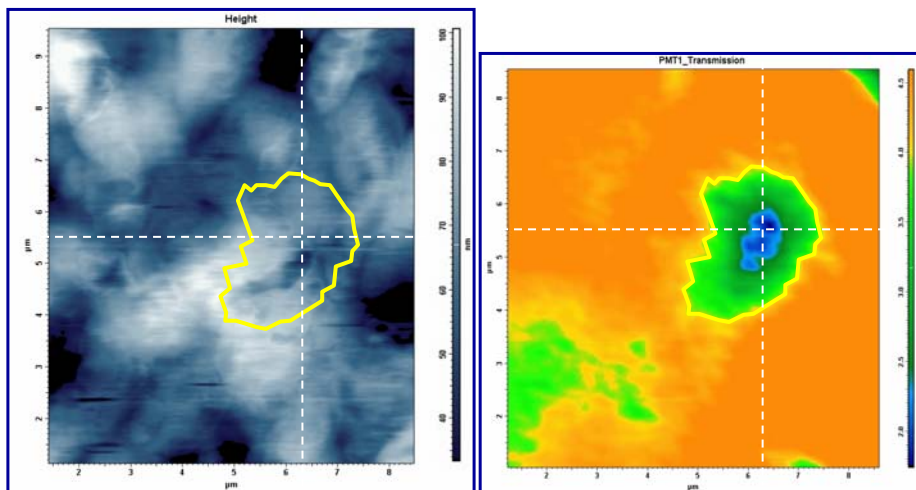
- ▣ Shear Force Microscopy
- ▣ Transmission mode
- ▣ Reflection mode
- ▣ Luminescence mode

Scanning Near-Field Microscopy (SNOM)

The resolving power of classical optical microscopes is restricted by **Abbe's** diffraction. However, it is possible to overcome this limit. If a subwavelength hole in a metal sheet is scanned close to an object, a super-resolved image can be built up from the detected light that passes through the hole. Scanning near-field microscopy based on this principle was first proposed by **Syngé** in 1928.

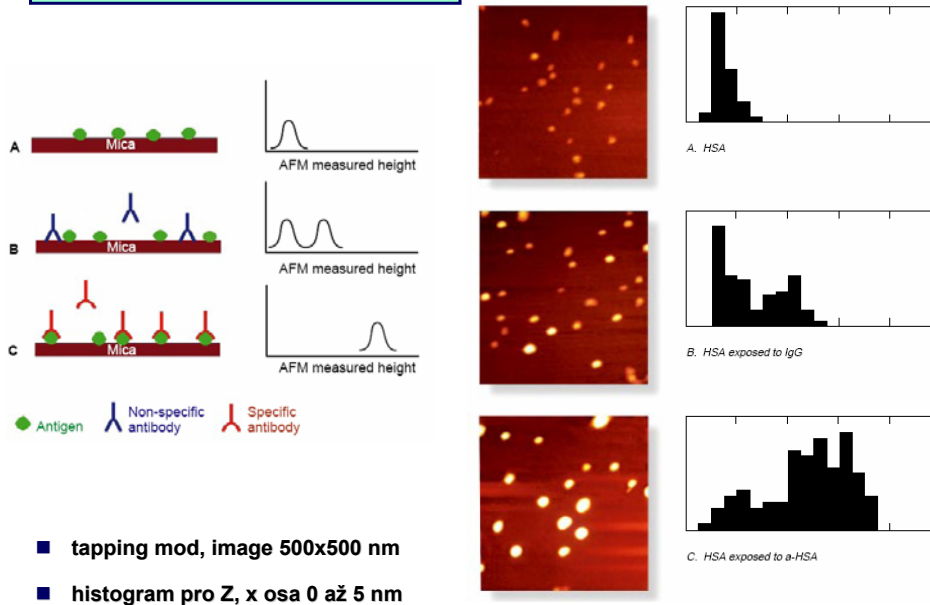


SNOM

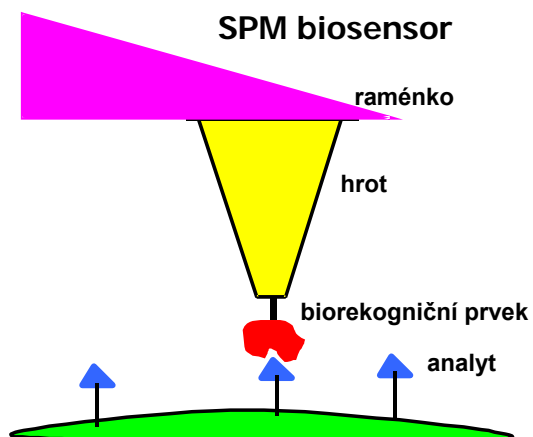


- výškový (vlevo, AFM mod) a optický (vpravo, SNOM mod) obraz elektropolymerizovaného filmu

Sledování biinterakcí



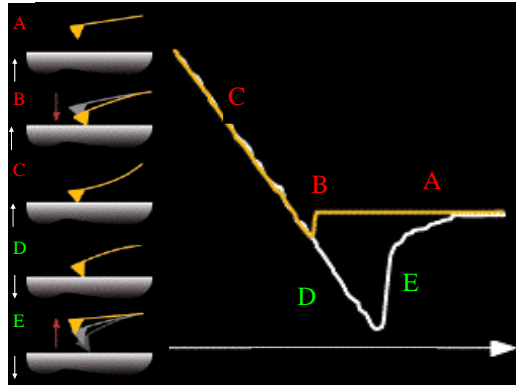
Nanobiosensor



- charakterizace povrchů biosensorů
- hrot je možné modifikovat imobilizací vhodných biorekogničních molekul, čímž dostáváme biosensor teoreticky schopný detekovat jednotlivé molekuly analytu
- tento postup byl použit pro přímé měření síly potřebné k přerušení některých bioafinitních interakcí „roztržením“ existující vazby; některé výsledky jsou shrnuty v tabulce.

„Force-distance“ křivky

- hrot se pohybuje pouze vertikálně v ose Z bez skenování v X-Y ploše
- výchylka je zaznamenávána jako funkce posunu Z
- měří se přibližovací a oddalovací fáze:



A kantilever se nedotýká povrchu, pohybuje se volně a necítí žádnou sílu bez deflektce

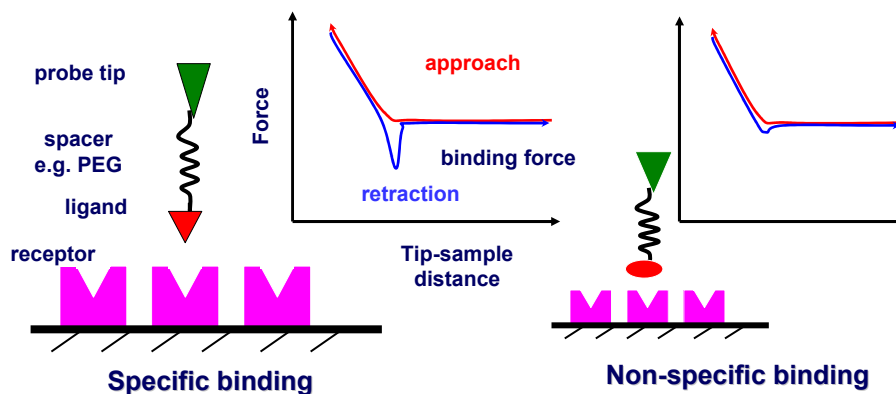
B přibližuje se k povrchu a dochází ke „kontaktnímu saltu“ při nástupu přitažlivých sil

C došlo ke kontaktu s povrchem, zvětšuje se výchylka

D po dosažení konečné stabilní síly je proces obrácen. V průběhu oddalování je nutné překonat adhezi a hysterezní síly

E v tomto bodě jsou překonány adhezivní síly a kantilever je volně nad povrchem. – Tato vzdálenost je důležitým parametrem křivky.

Ligand-receptor vazebné děje

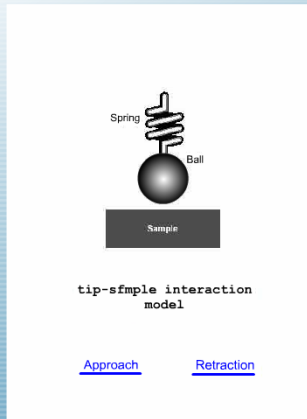


- v přítomnosti specifické interakce je pro "přetržení" vazby potřeba přídavná síla
- takto změřená síla charakterizuje danou biointerakci

Spektroskopické techniky

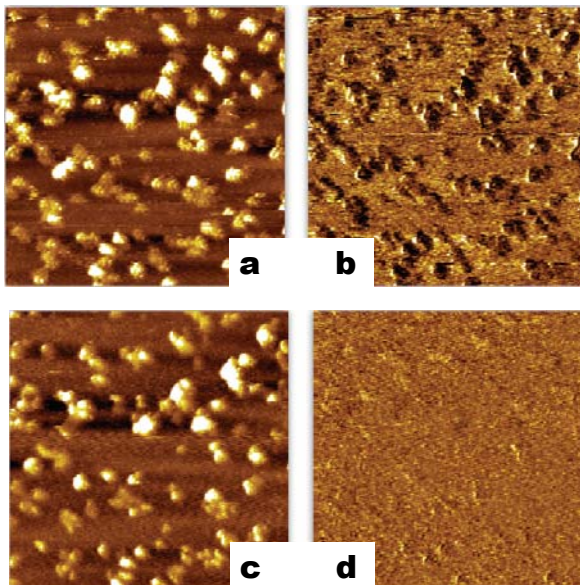
Spectroscopies:

- Force-distance curves
- Adhesion Force microscopy
- Amplitude-distance curves
- Phase-distance curves
- Frequency-distance curves
- Full-resonance Spectroscopy



SFM can be used not only as tool for topography acquisition. **SFM** can also be used as a tool for **force spectroscopy** – measuring **forces** as a function of **distance**. For **oscillating cantilever** tip-sample force can affect some other characteristics of cantilever oscillation – **amplitude, frequency, phase, dissipation** etc. Correspondingly dependence of these characteristics upon tip-sample distance can also be regarded as **spectroscopic data**.

AFM – biotinylovaný hrot



- MAC Mode AFM and TREC images with biotin modified tip of
- (a) topography and (b) recognition of avidin on mica.
- (c) topography and (d) recognition images of the same sample taken after streptavidin was added to the solution. The avidin molecules are not recognized because the biotin tip is blocked
- 1 μm x 1 μm

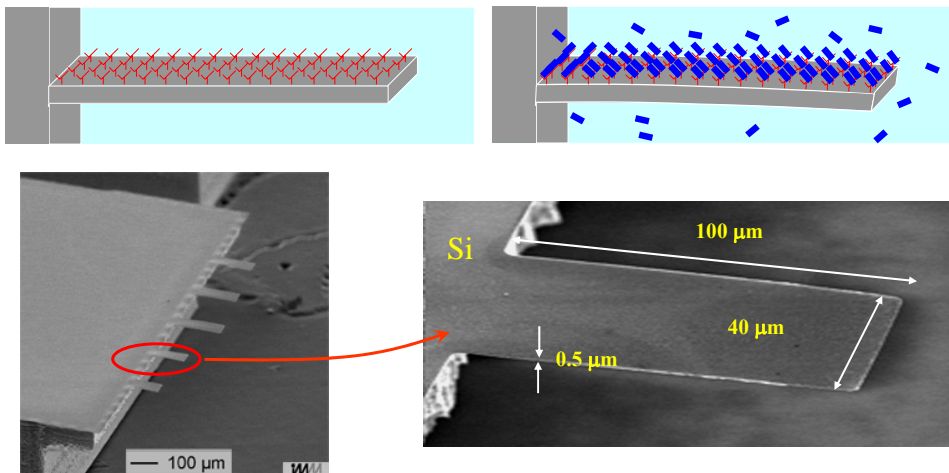
Interakční síly změřené AFM

Interakce	Síla (pN)	ΔG (kJ/mol)	ΔH (kJ/mol)
avidin - biotin	160 ± 20	60	90
streptavidin - biotin	260 ± 120	77	134
anti biotin IgG - biotin	240 ± 20	variabilní	variabilní
(ACTG) ₅ - (CAGT) ₅	1500 ± 200	117	430

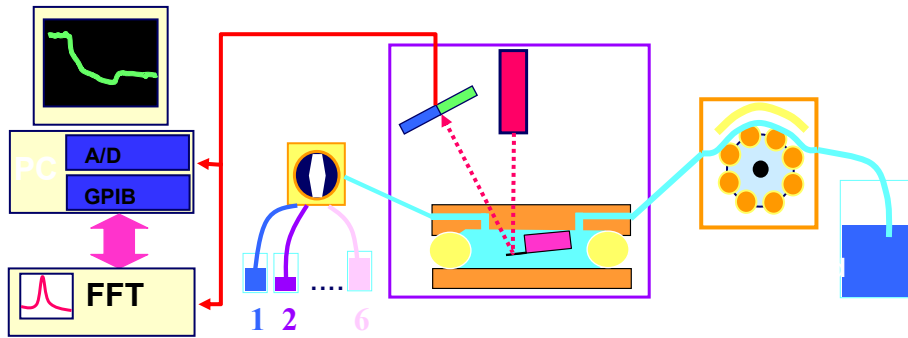
Intermolekulové adhezní síly změřené pomocí AFM porovnané s volnou energií a reakční entalpií pro typické afinitní interakce

Mikrokantilevry jako biosensory

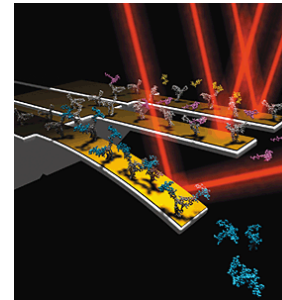
mechanický převodník – ohýbá se v důsledku rozdílného povrchového napětí na protilehlých stranách



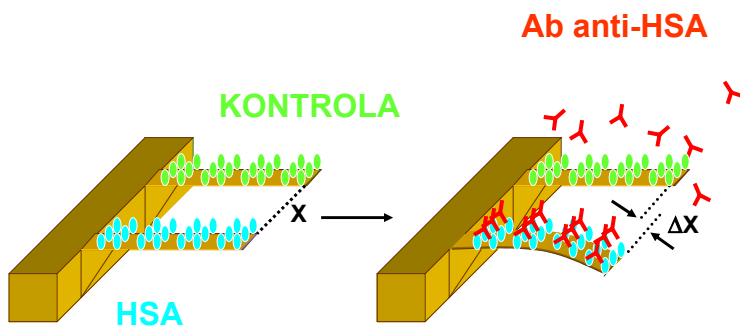
Experimentální uspořádání



Diferenciální uspořádání

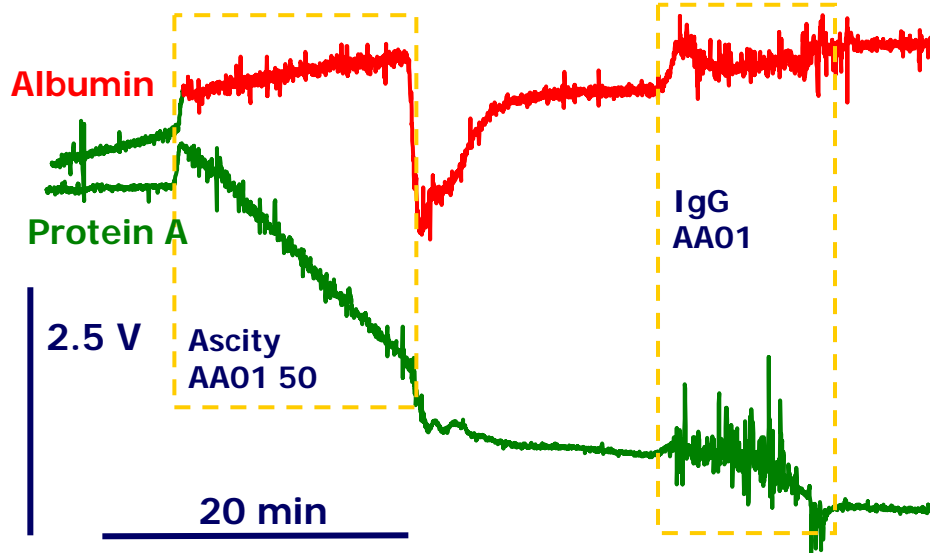


korekce nespecifické vazby

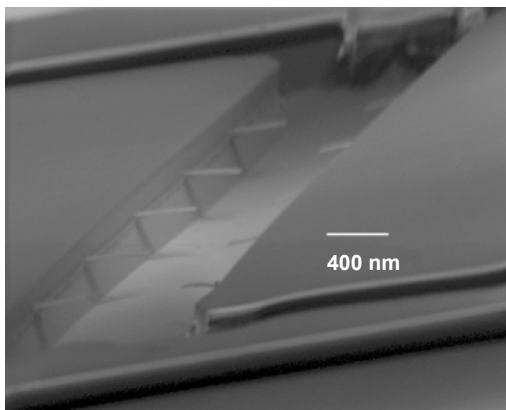


Diferenciální měření

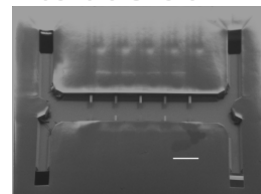
kantilevry modifikované albuminem a Proteinem A



Integrovaný mikrobiosensor

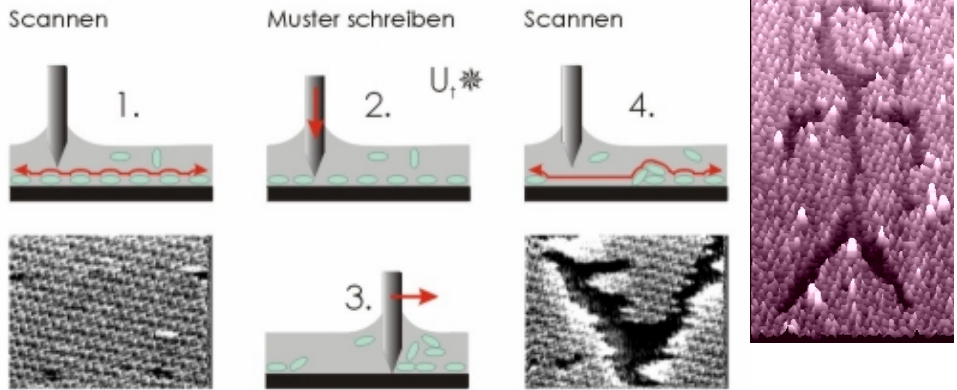


- piezorezistivní kantilevry – bez optického systému
- průtočná cela s několika integrovanými kantilevry
- multikanálové měření
- miniaturizace
- masová produkce
- pohled dovnitř cely před zakrytím horním těsnícím dílem z boku a shora

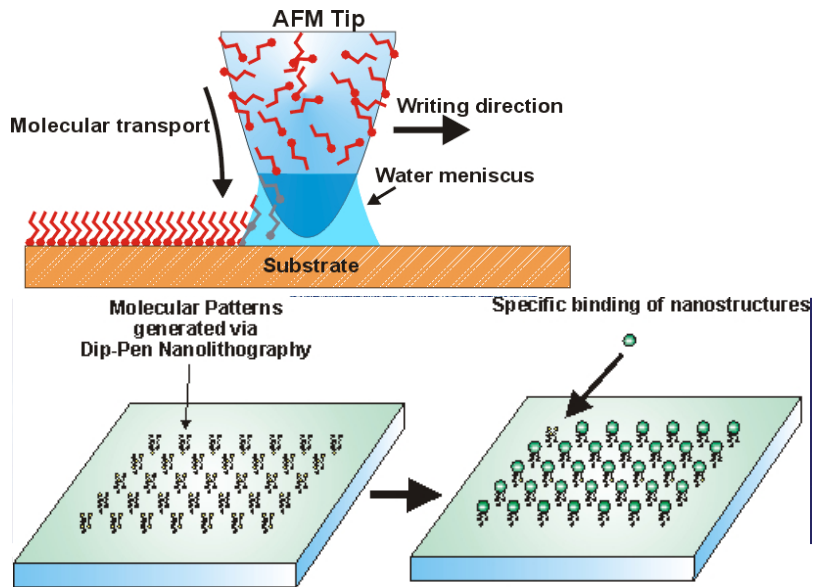


Scanning Probe Lithography

Self assembled monolayer of PTCDA (3,4,9,10-perylenetetracarboxylic dianhydride)



AFM dip pen lithography



<http://www.chem.nwu.edu/~mkngrp/dippen.html>

SPM Lithography



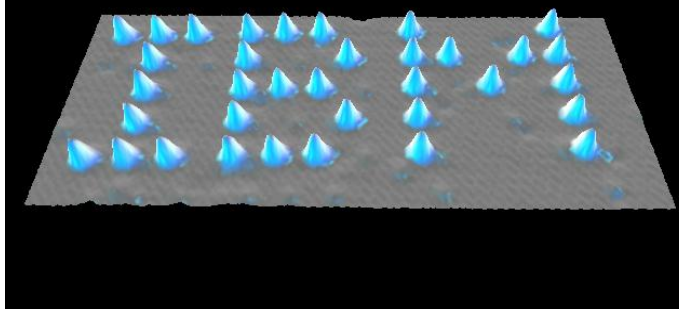
Lithographies:

- AFM Oxidation Lithography
- STM Lithography
- AFM Lithography - Scratching
- AFM Lithography - Dynamic Plowing



AFM atomy

atomy xenon na Ni (110) substrátu



- D.M. Eigler, E.K. Schweizer. Positioning single atoms with a scanning tunneling microscope. Nature 344, 524-526 (1990)

SPM - Interdisciplinární aplikace

- molekulární a buněčná biologie, virologie
 - studium polymerů
 - mikro- a nanoelektronika
 - základní výzkum ve fyzice a chemii povrchů
 - nanotechnologie
 - nanobiosensory
- navštivte nás:
- A4 laboratoř O.60 (suterén)
 - <http://biosensor.chemi.muni.cz/nanobio>

SECM

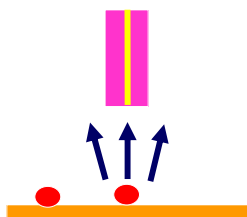
Scanning electrochemical microscopy

Proba = mikroelektroda měřící elektroaktivní látky, pohybuje se přes skenovaný povrch (X -Y) v konstantní vertikální vzdálenosti (Z ~ 15 μm)

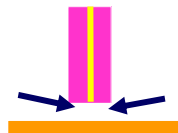
Způsoby činnosti:

generující substrát

(např. oxidasa \rightarrow H_2O_2)

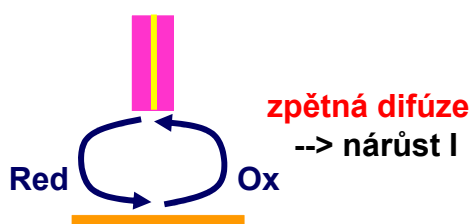


indikátory - $\text{Ru}[(\text{NH}_3)_6]^{2+}$



blokovaný přenos

\rightarrow pokles proudu I



zpětná difúze

\rightarrow nárůst I