



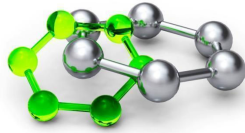
Central European Institute of Technology
BRNO | CZECH REPUBLIC

BioAFM – od molekul k buňkám

aneb na co si nesáhnu, tomu nevěřím

Jan Přebyl

CEITEC MU, Masarykova univerzita
Kamenice 5/A35, CZ-62500 Brno
pribyl@nanobio.cz



EVROPSKÝ UNIKÁLNÍ
RESEARCHER DEVELOPMENT FUNDING
PROGRAMME



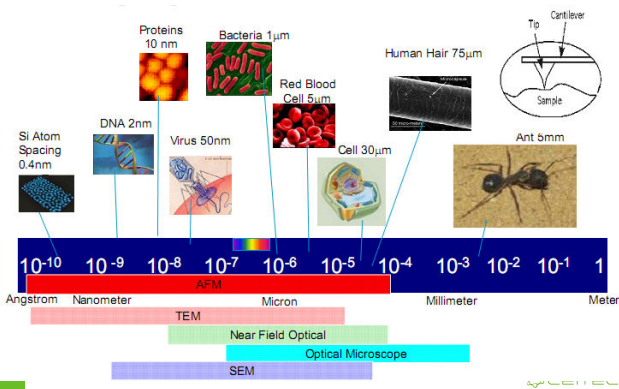
CEITEC MU
University Campus Bohunice



2

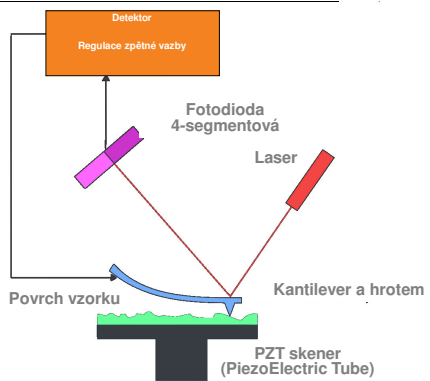


Rozlišení mikroskopických metod

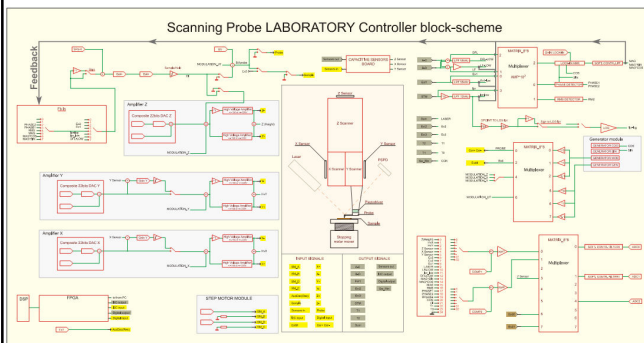


Mikroskop atomárních sil: základní popis instrumentace

AFM mikroskop základní komponenty



AFM mikroskop blokové schéma

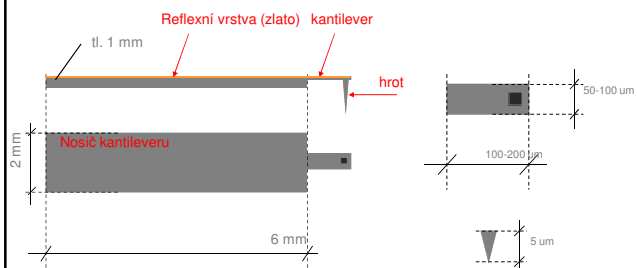


Kantilever a hrot

7

CEITEC

Kantilever a hrot



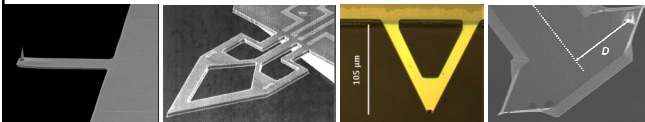
- Nosič kantileveru je poměrně univerzální pro všechny typy AFM mikroskopů
- Kantilever a hrot se liší velmi – tvar, velikost, materiál, vlastnosti.

8

CEITEC

Druhy kantileverů

Dle



Dle materiálových vlastností
– vyjádřeno konstantou tuhosti Force Constant [N/m]

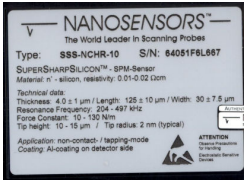
K. tuh. [N/m]	10-130	1-10	0.1-1.0	0.005-0.1
Materiál	kr. křemík	pol. křemík	sklo	Si ₃ N ₄
Res. f. [kHz]	200-500	100-200	15-100	1-20

Speciální aplikace – další materiálové vlastnosti: vodivé, magnetické, koloidní hroty

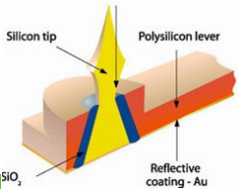
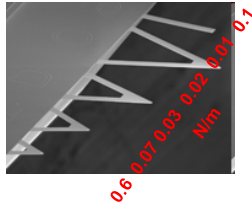
9

CEITEC

Charakteristika kantileverů uvedená na krabičce s nimi



Kantileverové pole – výběr dle konstanty tuhosti



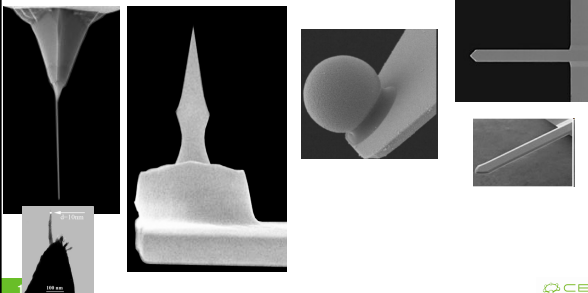
Skutečná konstrukce kantileverů a hrotů je velmi složitá

Druhy hrotů

Tvar – vyjádření pomocí poloměru zakřivení Curvature Radius R [nm]

R 1 nm 10 nm 100 nm NA

Ultraostré Standardní Speciální aplikace Bezhrtové

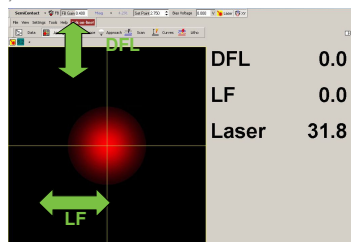


Změna vlastností kantileveru

Při kontaktu s povrchem

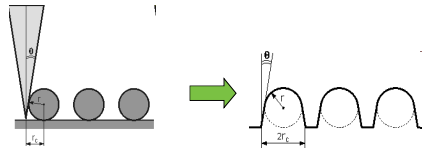


Projeví se jako změna polohy odraženého laserového paprsku na detekční fotodiodě

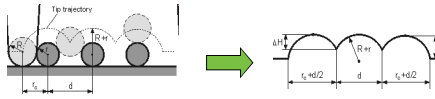


Efekt ostrosti hrotu R na rozlišení mikroskopu

Ultraostrý hrot
= reálný obraz



Standardní hrot
= $R \sim$ velikosti
studovaného objektu



Neostrý hrot
= nemožnost sledovat
detailní strukturu



13

CEITEC

Laser, fotodioda a kantilever

14

CEITEC

Fotodioda
4-segmentová

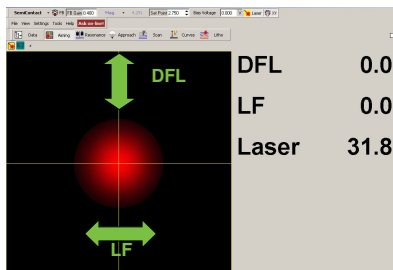
Laser

Kantilever a hrotem

Odraz laserového paprsku od horní
plochy kantileveru je detekován na
čtyřsegmentové fotodiodě.
= detekce ohybu kantileveru
(\rightarrow interakce hrot-povrch)

Lze sledovat v okně
Aiming, ale program
Nova si převádí obraz z
fotodiody do podoby 2D
obrázku automaticky.

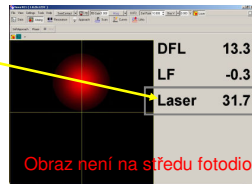
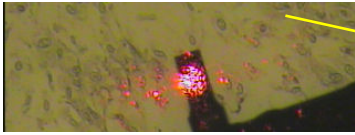
Okno **Aiming** je tedy
dobré jen k **počátečnímu**
nastavení laseru.



15

Aiming: počáteční nastavení laseru

Obraz laseru co nejbližší špičce a zároveň co nejvyšší signál

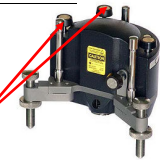


Obraz není na středu fotodiody

Jednotky LASER jsou relativní a u každého typu kantileveru mohou nabývat jiných hodnot (obecně lze konstatovat, že by hodnota měla být vždy vyšší než 20)

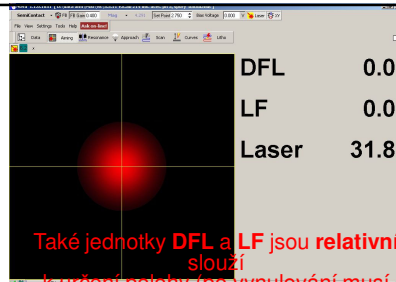


Poloha a intenzita LASER se ladí pohybem laserové LED pomocí koleček s označením LASER.



16

Aiming: počáteční nastavení laseru

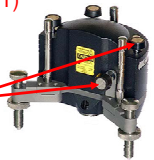


Také jednotky DFL a LF jsou relativní slouží k určení polohy (pro vynulování musí být < 0.1)



"vynulování" polohy laseru pohybem fotodiody na střed obrazu laseru:

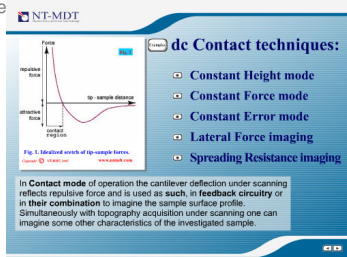
Provede se pohybem koleček PHOTODIODE (na měřící hlavě)



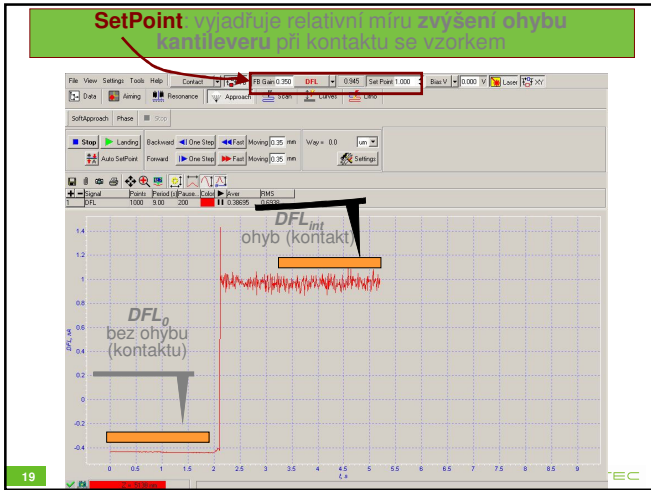
17

Kontaktní mód

- Měřenou veličinou v kontaktním módu je ohyb kantileveru (= deflection, DFL)
- V programu Nova se zobrazuje ohyb kantileveru (resp. pohyb obrazu laseru na fotodiode v důsledku ohybu kantileveru) jako veličina DFL [nA].
- Veličina DFL je převáděna program automaticky do výškového profilu a má tedy význam spíše pro přiblížení



18



Semikontaktní mód

- Měřenou veličinou v semi kontaktním módu je **amplituda kmitu** (= magnitude, **MAG**)
- V programu **Nova** se zobrazuje amplituda kmitu kantileveru jako veličina **MAG [nA]**, což je relativní veličina přímo úměrná velikosti amplitudy. Reálnou velikost amplitudy lze však určit až pomocí MAG-výška křivky.
- Veličina **MAG** je **převáděna** program automaticky do výškového **profilu** a má tedy význam spíše pro přiblížení k povrchu vzorku.

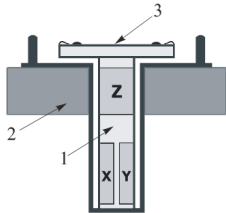
20

SetPoint vyjadřuje relativní míru utlumení (snížení) volné amplitudy při kontaktu se vzorkem

21

PZT

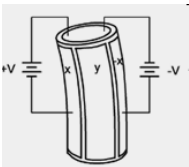
Piezo-elektrody



22

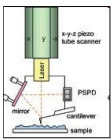
CEITEC

Piezo-elektrody PZT



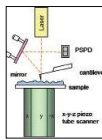
- Duté elektrody z keramického materiálu potažené kovovými elektrodami.
- Aplikace napětí způsobuje změnu velikosti krystalové mřížky → posun vzorku / hlavy
- Přesné řízení napětí = přesné řízení pohybu (rozlíšení v řádu pm)

Dva základní typy AFM mikroskopie - dle pozice PZT:



- Skenování průbou
- Pohyb v x,y,z osách i oscilací ve sken. hlavě
 - Rozsah 100-150 um
 - Horší rozlišení

- Skenování vzorkem
- Pohyb v x,y,z osách vzorek
 - Oscilátor ve sken. hlavě
 - Rozsah 3-7 um



- Výborné rozlišení, nízký šum

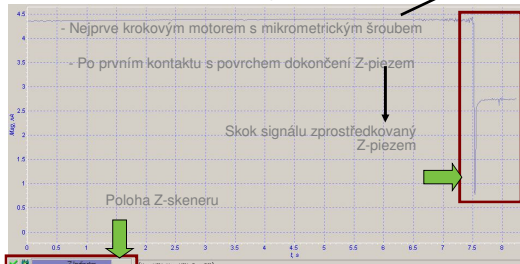
23

CEITEC

Piezo-elektrody PZT

V softwarovém nastavení programu Nova

1. Přiblížení hrotu k povrchu:

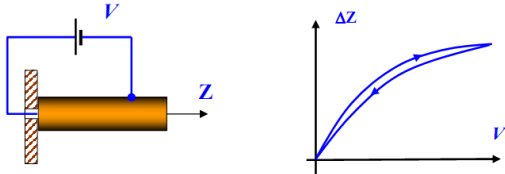


Přiblížení k povrchu probíhá automaticky po kliknutí na ikonu LANDING v okně Approach.

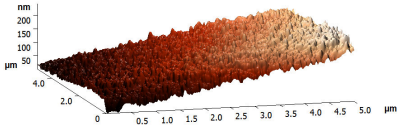
24

CEITEC

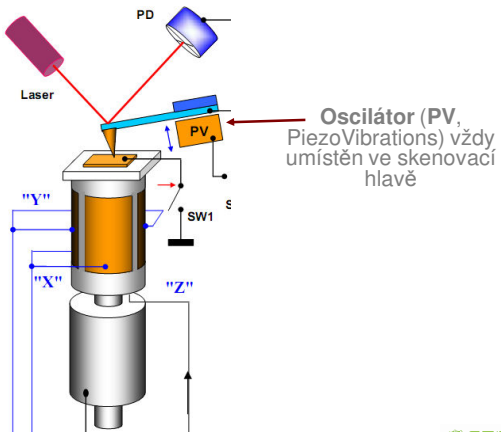
Nelineární průběh pohybu piezo-elektrod v závislosti na aplikovaném napětí



Nativní data z AFM mikroskopu jsou **nakloněná**. Při vyhodnocování se odstraňuje např. polynomální regresí



Oscilátor



Parametry oscilátoru se nastavují v okně **Resonance**

Amplitude = napětí aplikované na oscilátor [V]

Gain = Lock-In zesilovač signálu

DFL x = prostě matematické vynásobení intenzity signálu (zesílí i šum)

Intenzita oscilace kantileveru je vyjádřena relativním parametrem **MAG [nA]**, který je úměrný reálné hodnotě kmitu kantileveru, ale pro její určení je potřeba provést MAG-výška spektroskopii

Další komponenty

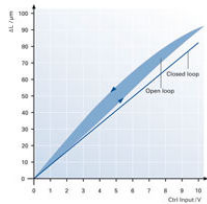
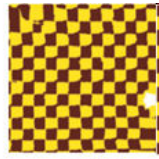
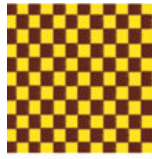
32

ClosedLoop smyčka (v ose X, Y)

Založeno na senzorech elektrické kapacity

Sensory elektrické kapacity

- Korekce teplotního driftu
- Linearizace posunu piezo-elektrod

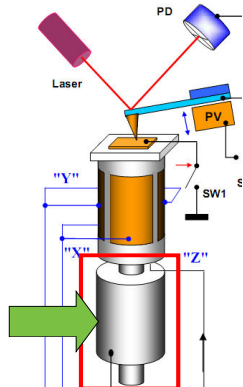


33

Krokový motor s mikrometrickým šroubem (motorized stage)

Pro přiblížení vzorku do dosahu (rozsahu) piezo-elektrod

(Ize ovládat i ručně)



34

CEITEC

Příprava nosičů a vzorků

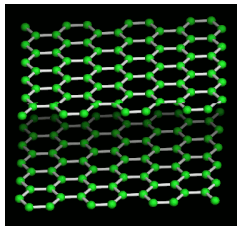
35

CEITEC

Atomárné rovné povrchy

1. HOPG Highly Ordered Pyrolytic Graphite

- Kishův grafit, původně odpadní produkt při výrobě oceli
- Hexagonální, planární struktura
- C-C vazba 142 pm, vzdálenost mezi rovinami 335 pm
- Vodivý, vysoce hydrofóbní
- Planární struktura – čištění loupáním
- Syntetická forma grafitu, vysoká chemická čistota
- Tradiční podklad pro imobilizaci vzorků pro elektronovou mikroskopii, použitelný pro SEM, STM i AFM (→ vodivost)
- Imobilizace spontánní adsorpcí na povrch (→ hydrofobita)



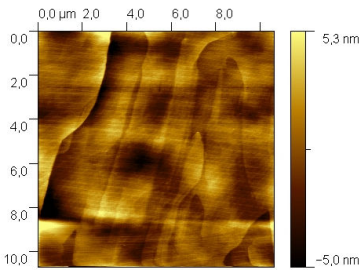
36

CEITEC

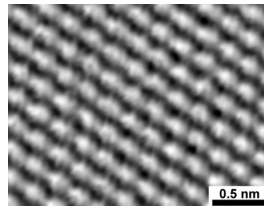
Atomárně rovné povrchy

1. HOPG Highly Ordered Pyrolytic Graphite

Na větších plochách jsou viditelné šupiny



Na malých plochách atomárně rovné



37

CEITEC

Atomárně rovné povrchy

2. Slída (muskovit, Mica)

• „Kočičí stříbro“, jméno Muskovit dle města Moskvy (těžba nejvyšší kvality suroviny)

• Chem. struktura: $K_2O \cdot Al_2O_3 \cdot SiO_2$

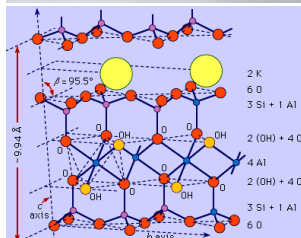
• Vysoce hydrofilní povrch

• Dobře chemicky modifikovatelný

• Imobilizace iontovou interakcí i kovalentní vazbou biomolekul

• $pK_a \sim 3$, při fyziologickém pH je povrch záporně nabitý

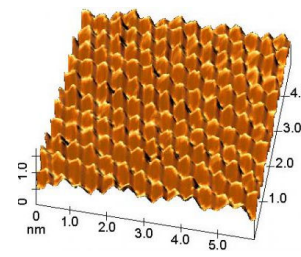
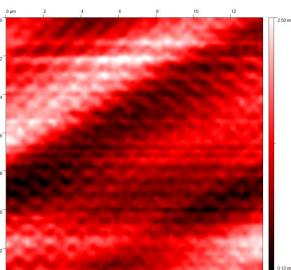
• Mica = křemičitan, z hlediska chemické modifikace lze povrch popsat jako hydratovaný oxid křemičitý Si-OH



38

Atomárně rovné povrchy

2. Slída (muskovit, Mica)



Velice rovná na větších i malých plochách

39

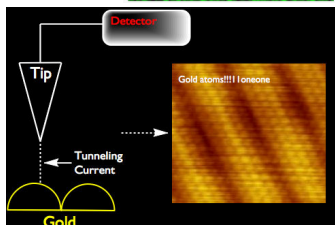
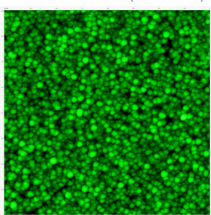
CEITEC

Ostatní povrchy

1. Zlato

- Inertní kov používaný zejména v elektrochemii jako pracovní elektroda
- Vodivost: použitelný pro STM i AFM
- Hydrofóbní: spontánní adsorbce biomolekul (proteinů)
- Chemická vazba pomoci koordinace-kovaleนต์ní thiolů (-SH) vazby
- Příprava zlatých vrstev napařením
- Ve vodě nestabilní, potřeba aplikovat adhezivní vrstvu (Al/Cr/Ti)

Napařená vrstva zlata: tvořená nanočásticemi (4-50 nm)



40

Ostatní povrchy

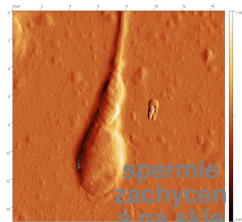
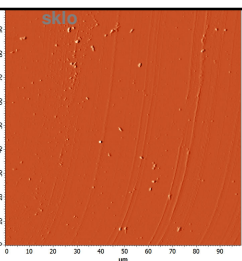
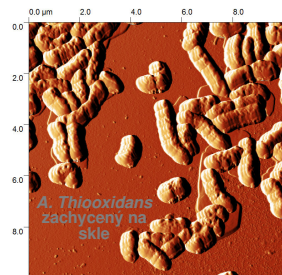
2. Sklo

- Nekrystalická (amorfní) hmota (podchlazená kapalina)
- Laboratorní sklo: 75% SiO₂ plus Na₂O, CaO, borát a aditiva v minoritním zastoupení
- Z hlediska chemické modifikace k němu přistupujeme jako ke slídě, tj. je to hydratovaný oxid křemičitý Si-OH
- Méně hydrofilní než slída
- Drsnost povrchu (amorfnost materiálu, příprava lisováním) je mnohem vyšší než u slídy
- Nelze použít pro zobrazování malých molekul
- Typicky použití tam, kde i při optické mikroskopii, tj. pro velké (např. chromozóm) či celobuněčné útvary (bakterie, buňka, spermie)

41

CEITEC

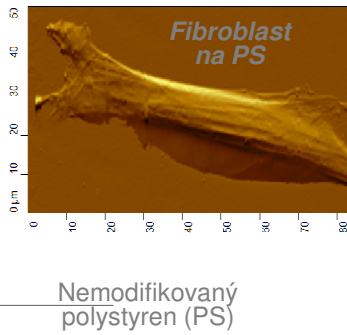
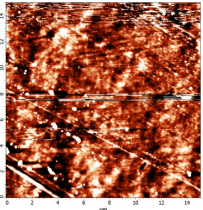
Makroskopické útvary na skle



42

Ostatní povrchy

3. Plasty



- Plastové povrchy většinou jako součást standardních pomůcek (PS/PP misky)
- Neobsahují fční skupiny vhodné pro kovaletní imobilizaci

45 Hydrofóbní povrchy: spontánní (nespecifická) adsorpce biomolekul

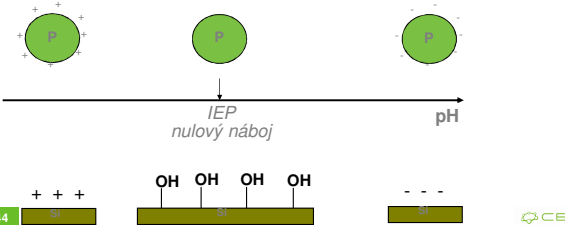
Imobilizační postupy

1. Proteiny

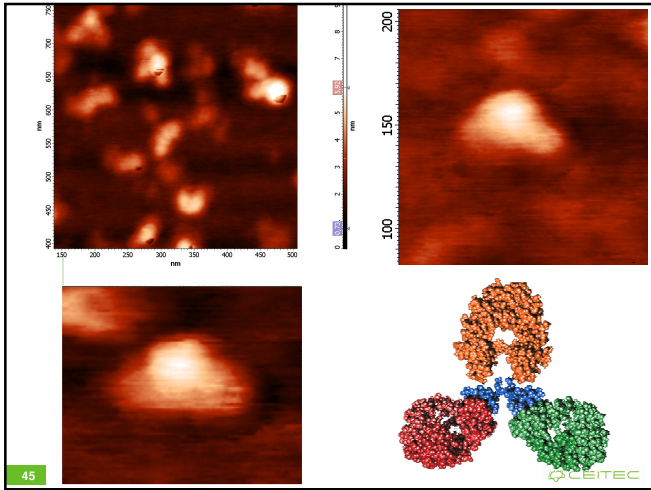
Povrchy: slída nebo HOPG (velmi nízká drsnost)

Protein: náboj se řídí dle IEP a pH prostředí

Imobilizace proteinu na slídu: $pK_a(\text{slída}) < pH < IEP$



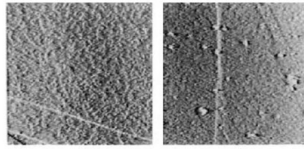
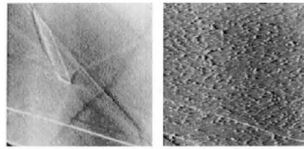
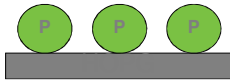
44



45

Imobilizace proteinu na HOPG

A. Imobilizace **spontánní** (nespec.) **adsorpce** proteinu na hydrofóbní povrch (nejlépe při pH = IEP)



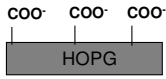
Adsorpce lysozymu na HOPG

46

CEITEC

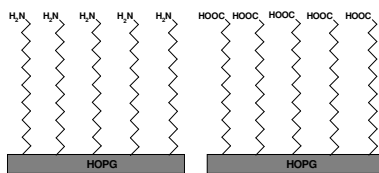
B. Imobilizace **iontovou interakcí**
→ Vytvoření náboje na povrchu HOPG

Vytvoření karboxylových skupin elektrochemicky (E ~ 2 V vs. Ag/AgCl)



Možnost využití záporného náboje pro imobilizaci iontovou interakcí

Nebo kovalentní vazba: aktivace karboxylu (např. NHS-ester, vazba NH₂-skupiny)



Adsorpce dlouhořetězcových (C₁₅/C₁₈) alkanů zakončených vhodnou funkční skupinou

47

CEITEC

Imobilizační postupy

2. DNA

Povrchy: **slída** nebo HOPG (velmi nízká drsnost)



slída

Problém:

DNA (cukr-fosfátová kostra) i slída za fyziologického pH **shodný** (záporný) **náboj**

→ Na povrch slídy je nutno zavést **kladný** náboj

48

CEITEC

OH OH OH OH OH OH $\xrightarrow[\text{cat.}]{\text{N(Et)}_3}$ O⁻ O⁻ O⁻ O⁻ O⁻ O⁻

Silanizace
 = chemická modifikace povrchu slídy
 - Kovalentní modifikace povrchového SiOH alkoxyxiloxany
 - cíl: zavedení požadované fční skupiny na povrch slídy
 - lze použít i pro sklo, křemen, křemík, titan a TiO₂
 - katalýza silnou bází
 - průběh reakce lze dobře sledovat změnou kontaktního úhlu

$\text{H}_3\text{C}-\text{O}-\text{Si}(\text{O}-\text{CH}_3)_2-\text{O}-\text{R}$
R-propyltrimethoxysilane

$\text{Si}-\text{OH} + \text{R}-\text{Si}(\text{O}-\text{CH}_3)_2-\text{O}-\text{R} \rightarrow \text{Si}-\text{O}-\text{Si}(\text{O}-\text{CH}_3)_2-\text{O}-\text{R} + \text{H}_2\text{O}$

Silanizace → Hydrofobizace

49 CEITEC

Nejčastěji používané alkoxyxiloxany

$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{Si}(\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$
(3-Aminopropyl)trimethoxysilane APTES

$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{Si}(\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_3)_2-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$
3-(Ethoxydimethylsilyl)propylamine APDMES

$\text{HS}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{Si}(\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$
(3-Mercaptopropyl)trimethoxysilane MPTS

50 CEITEC

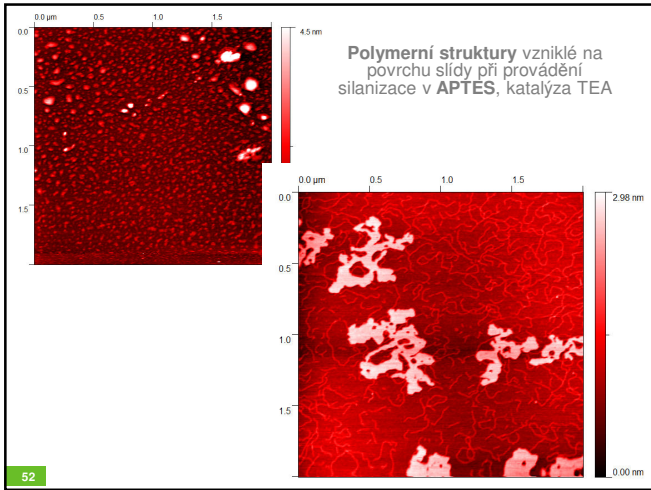
Problém praktického provádění: self-polymerizace

$\text{R}_1-\text{Si}(\text{O}-\text{R}_1)_2-\text{O}-\text{R}_2 + \text{R}_1-\text{Si}(\text{O}-\text{R}_1)_2-\text{O}-\text{R}_2 \xrightarrow[\text{-R}_1\text{OH}]{\text{H}-\text{O}-\text{H}} \text{R}_1-\text{Si}(\text{O}-\text{R}_1)_2-\text{O}-\text{Si}(\text{O}-\text{R}_1)_2-\text{O}-\text{R}_2$

- Zejména při použití APTES a provádění silanizace v kapalině
 - Stačí i stopy vodních par pro spuštění
 - Vzniklé útvary ruší topografickou studii povrchu
- Řešení: provádění silanizace v parách (vakuum, sušidlo)
- Nové monoalkoxy-deriváty siloxanů, nemohou polymerovat:

$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{Si}(\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_3)_2-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$
3-(Ethoxydimethylsilyl)propylamine APDMES

51



Imobilizační postupy

2. DNA na povrchu HOPG

Vytvoření kladného náboje na povrchu HOPG:

Adsorpce dlouhořetězcových (C₁₆/C₁₈) alkanů zakončených vhodnou fční skupinou

53

Imobilizační postupy

3. Nanočástice

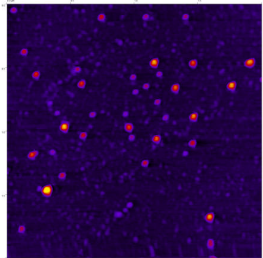
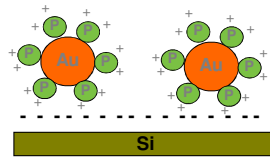
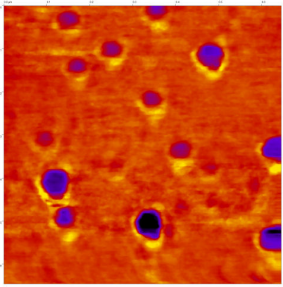
Povrchy: nejčastěji **slída** nebo **HOPG** (velmi nízká drsnost) ale také sklo, zlato, atp.

Např. pro studium zlatých nanočástic (AuNP) lze použít slídu modifikovanou merkapto-derivátem siloxanu (SH-mica)

(3-Mercaptopropyl)trimethoxysilane
MPTS

54

CEITEC

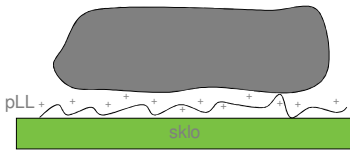


AuNP konjugované s proteinem se zachycují na podkladní přes můstek tvořený navázaným proteinem

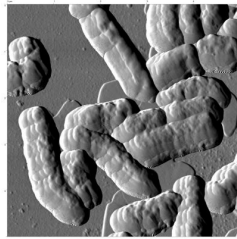
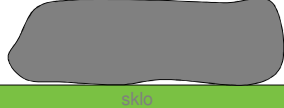
Imobilizační postupy

4. Bakterie, spory

Některé bakterie přes adhezivní vrstvu poly-L-lysinu:



Jiné standardním nátěrem na podložní sklo:

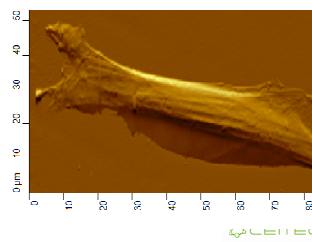
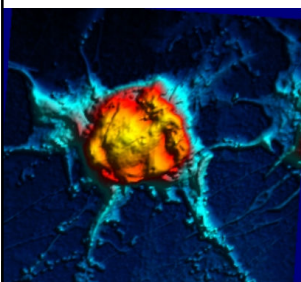


Imobilizační postupy

5. Eukaryotické buňky

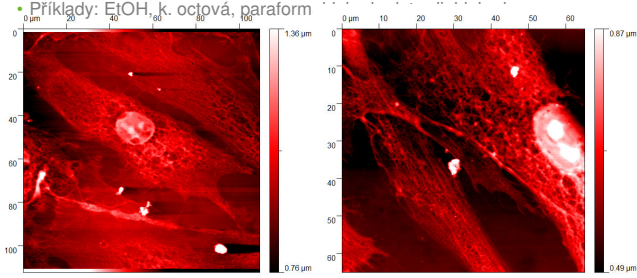
Standardní pěstování buněčných kultur v PS miskách

Vhodné je použití adhezivní vrstvy pLL nebo adhezivních proteinů



Použití fixačních činidel

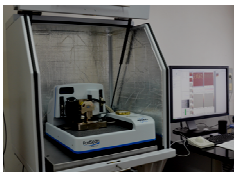
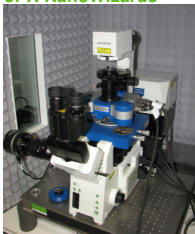
- Problém s adhezivitou buněk mimo inkubátor (37°C, 5% CO₂)
- Umožňuje studium buněk i dlouho po vyjmutí z inkubátoru
- Poškozuje skutečnou strukturu buněk, nelze studovat procesy na živých buňkách
- Příklady: EtOH, k. octová, paraform



CEITEC AFM CoreFacility

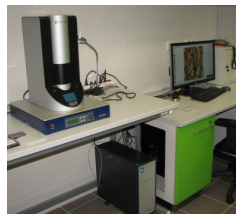
CEITEC AFM CoreFacility

JPK NanoWizard3



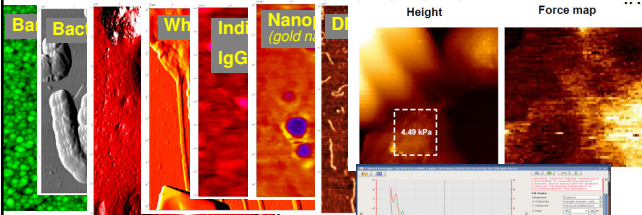
Bruker FastScan Bio

NTMDT NTgra Vita



NTMDT Solver Next

AFM visualization of biomolecules and bioobjects



Cooperation:

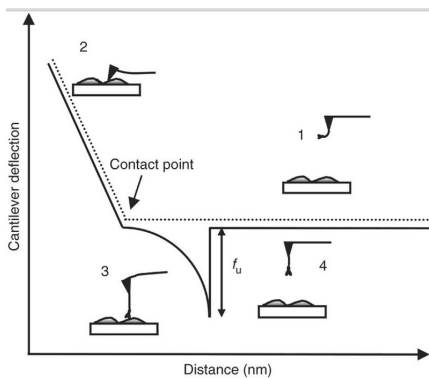
- J. Hejártko – YM mapping
- P. Bouchal – YM mapping
- J. Paleček - DNA
- M. Peší, V. Rotrekl CMCs
- J. Sládková – CMCs
- A. Meli - CMC
- M. Kalbáčová – TiO₂ NT
- H. Kolářová - DNA
- I. Crha - sperms

61

AFM spektroskopie
Automatizace AFM

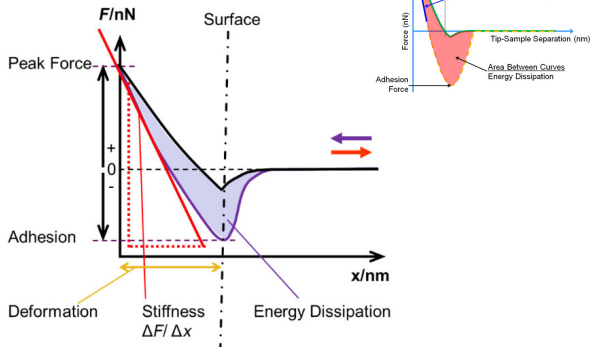
62

Force Distance curves (FD curves)



63

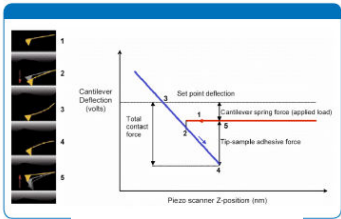
FD křivka - popis



64

CEITEC

ScanAssyst – Automatizace AFM měření

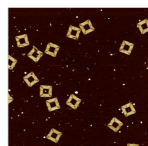
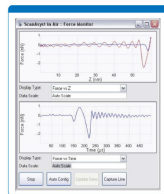
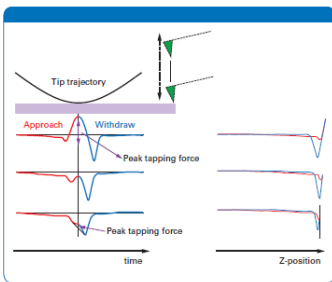


BRUKER

65

CEITEC

ScanAssyst - princip



66

CEITEC

Děkuji za pozornost
