

Technologické aspekty biosensorů

- **miniaturizace**
- **nanotechnologie**
- **nanobiotechnologie**
- **nanobiosensory**



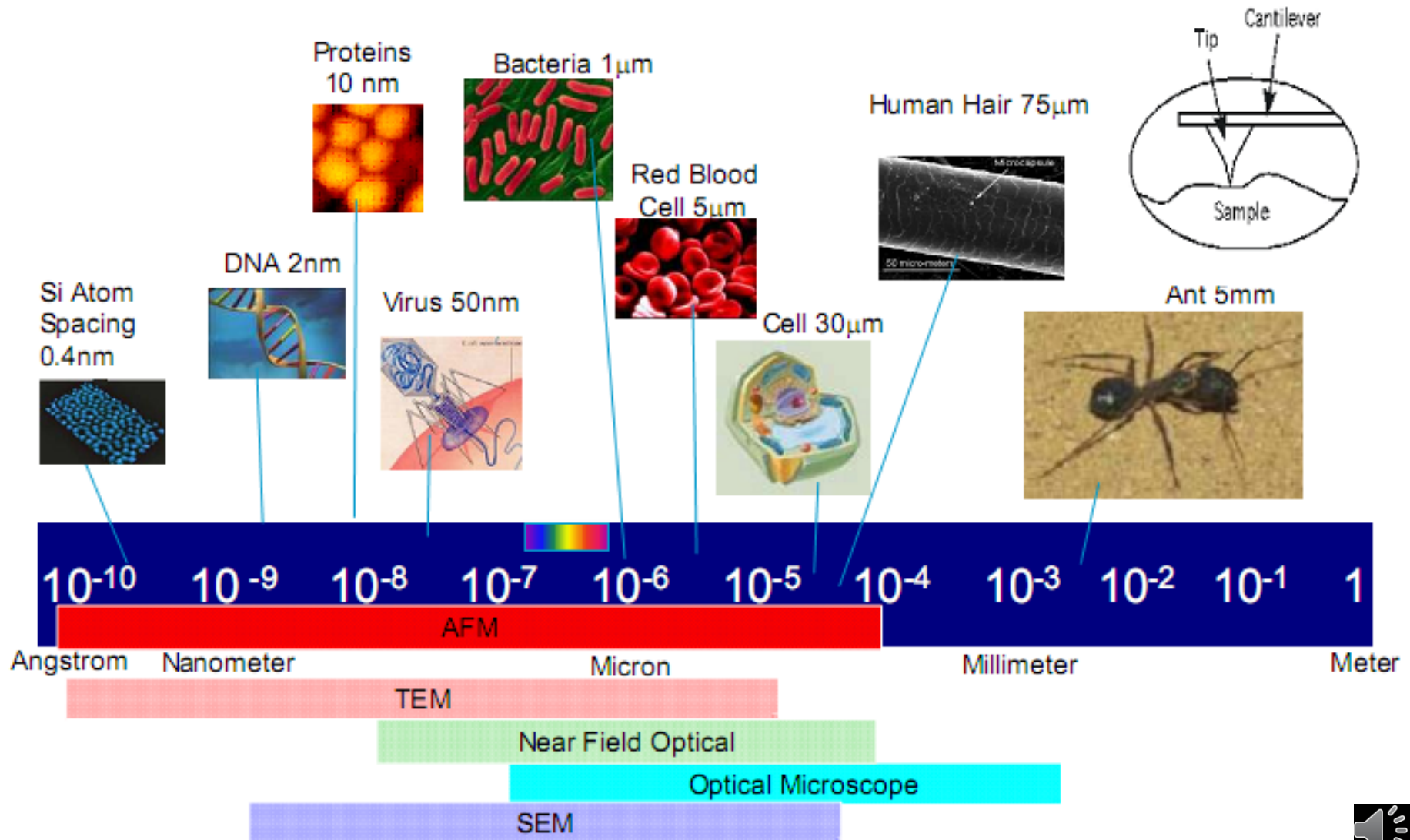
Co to je nanobiotechnologie

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

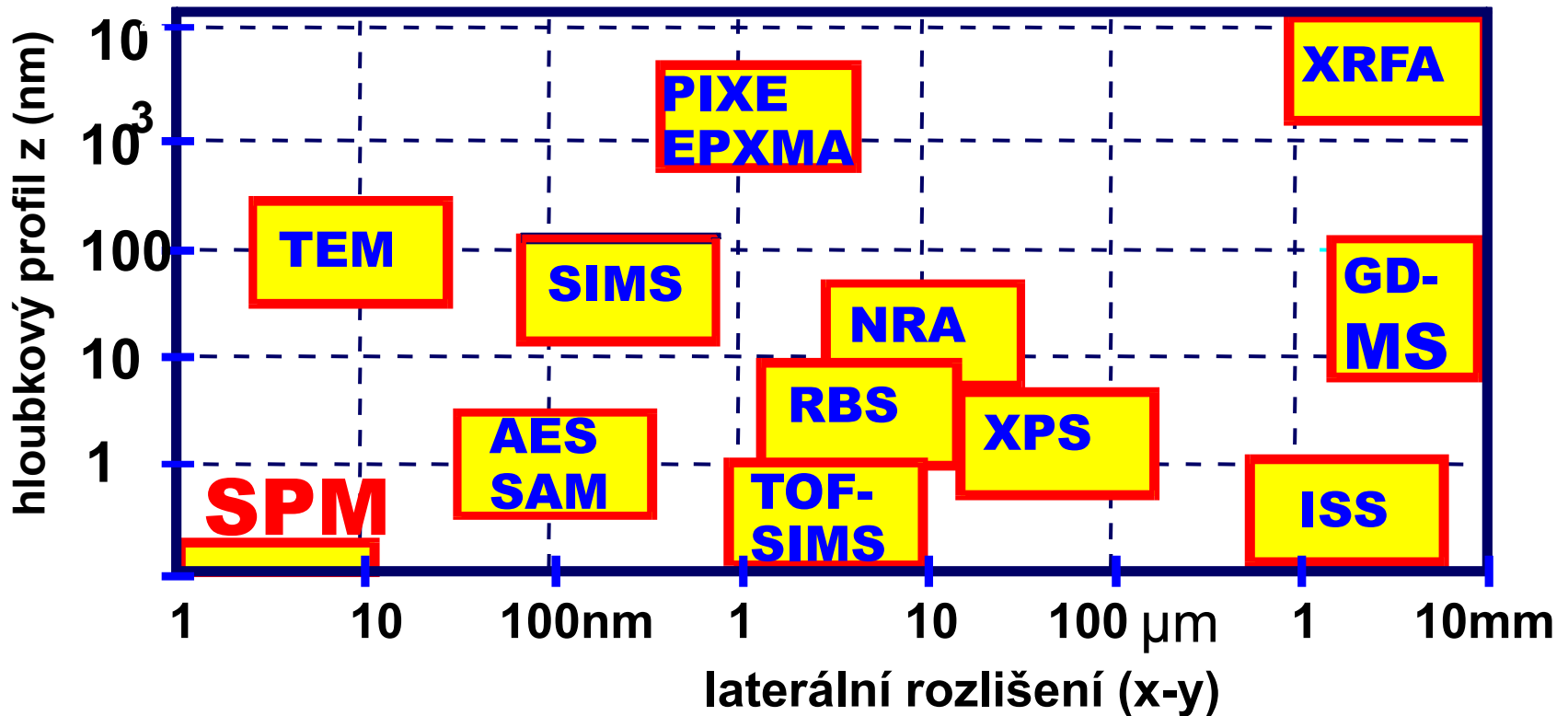
Nanobiotechnologie využívá biologické nanosystémy (biomolekuly, proteiny, nukleové kyseliny, vícemolekulární komplexy, viry, buněčné komponenty, ...) v technických systémech. Používá nanotechnologické postupy při zkoumání biologických systémů, s cílem získat informace obtížně dostupné „klasickými“ technikami.



Rozlišení mikroskopických metod



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		





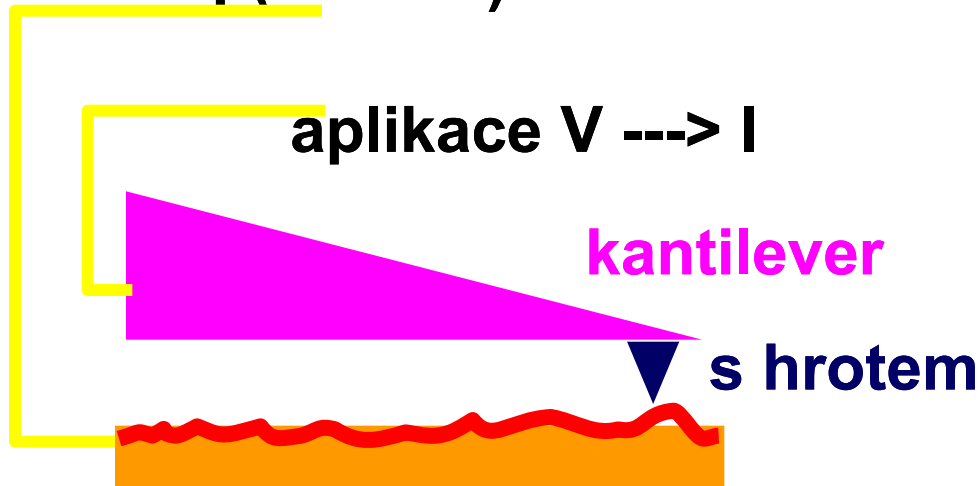
Principy SPM a AFM

Scanning tunneling microscopy

1982 (G. Binnig, H. Rohrer)

tunelování elektronů mezi hrotem próby a vodivým povrchem

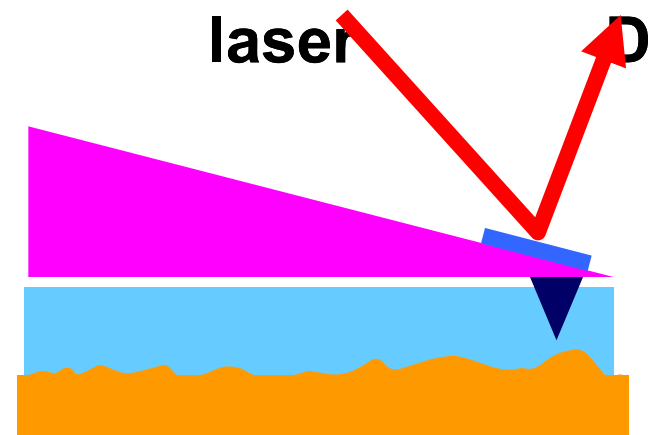
$$I \sim V \exp(-A\Phi^{1/2}d)$$



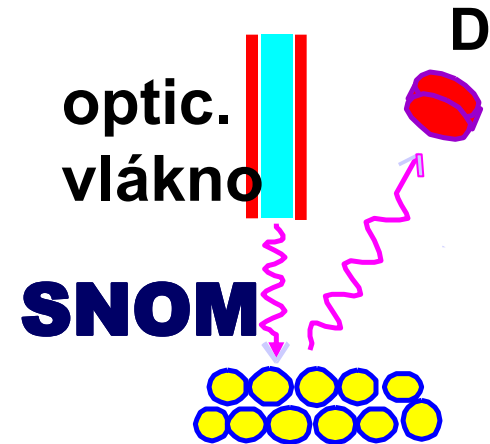
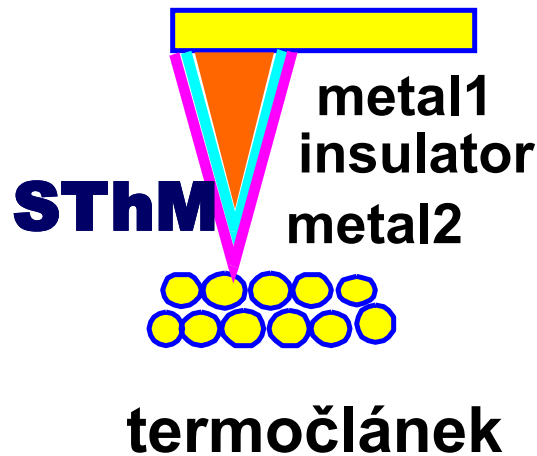
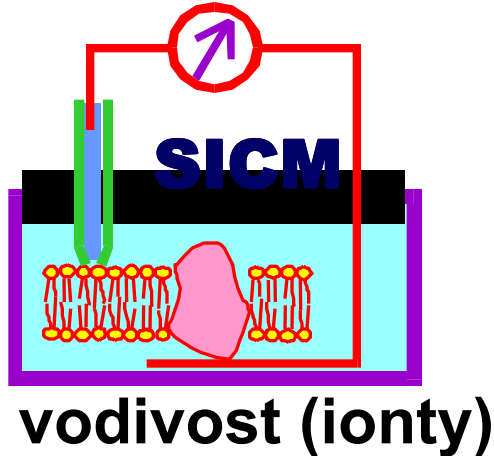
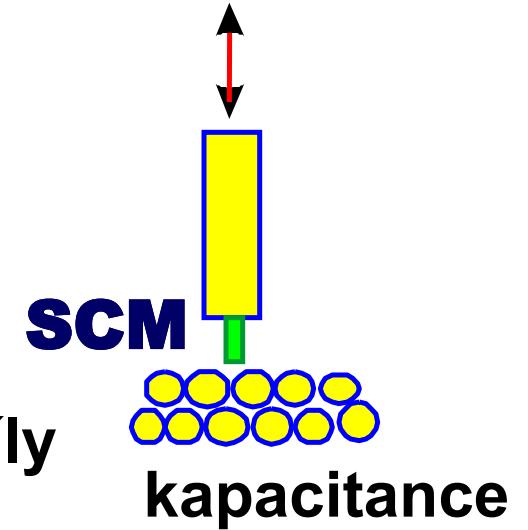
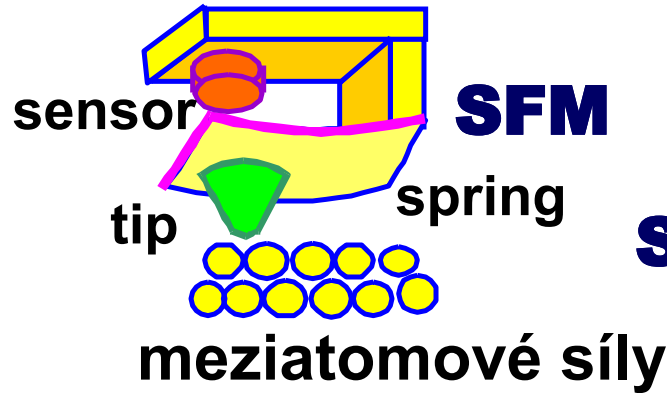
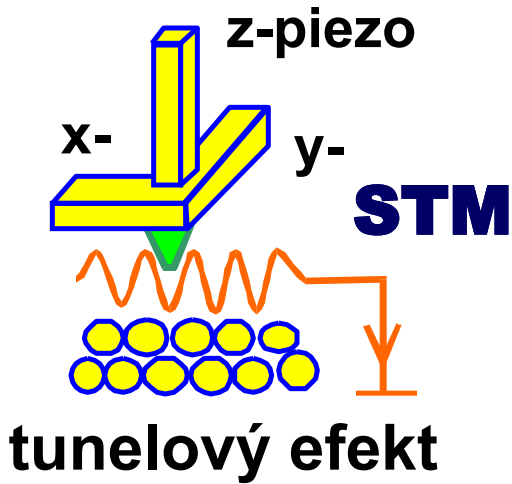
Atomic force microscopy

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

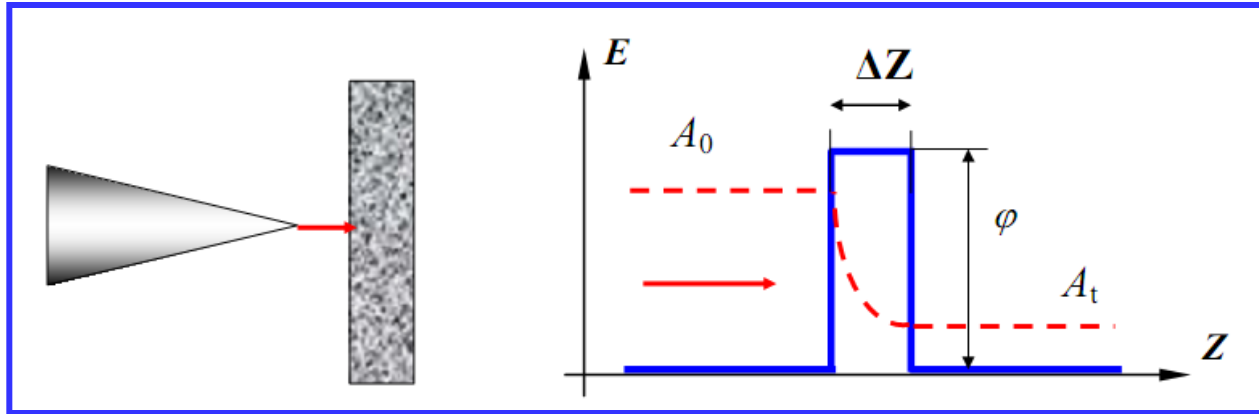
Lenard-Jonesův potenciál
vhodné pro nevodivé povrchy a měření přímo v kapalinách



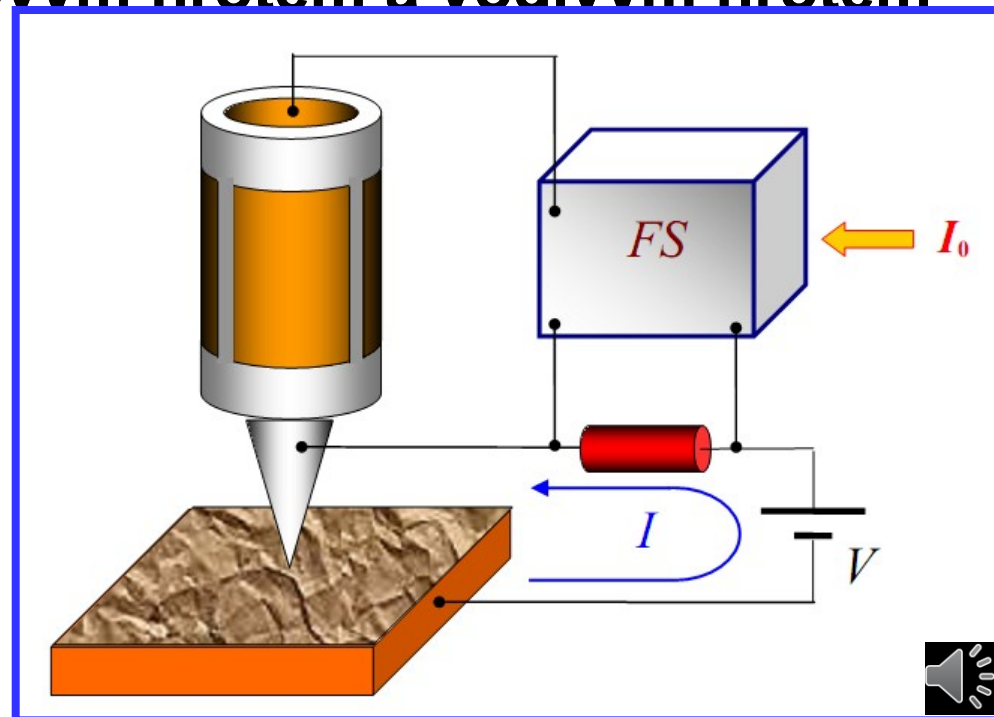
SPM (scanning probe microscopies)



STM scanning tunneling microscopy

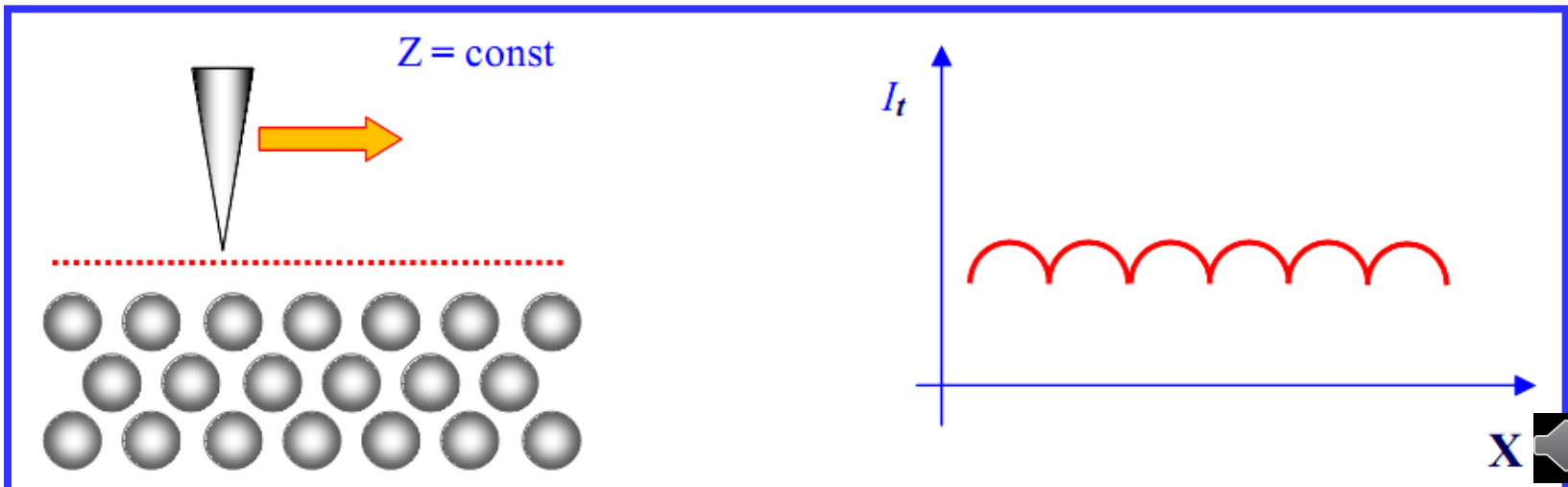
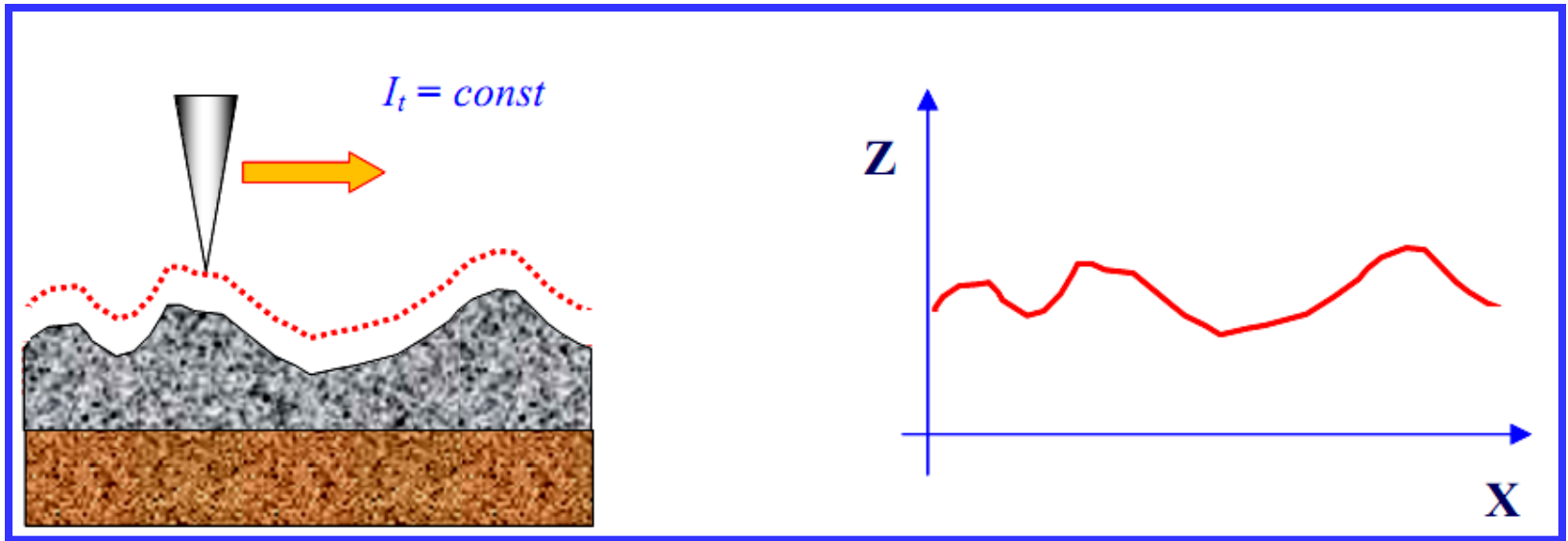


- založeno na tunelování elektronů přes potenciálovou bariéru mezi ostrým kovovým hrotem a vodivým hrotem v přítomnosti el. pole

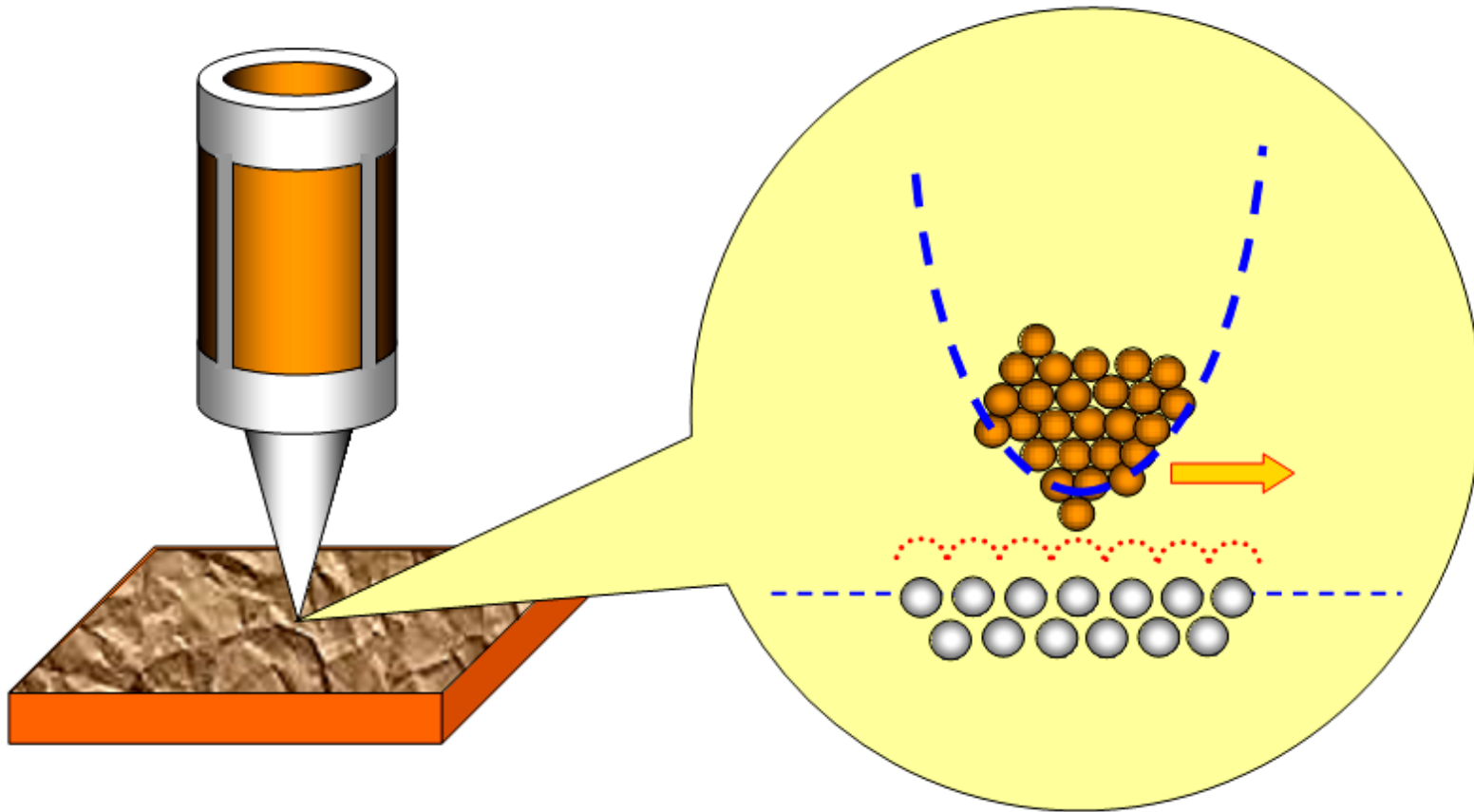


STM mody

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



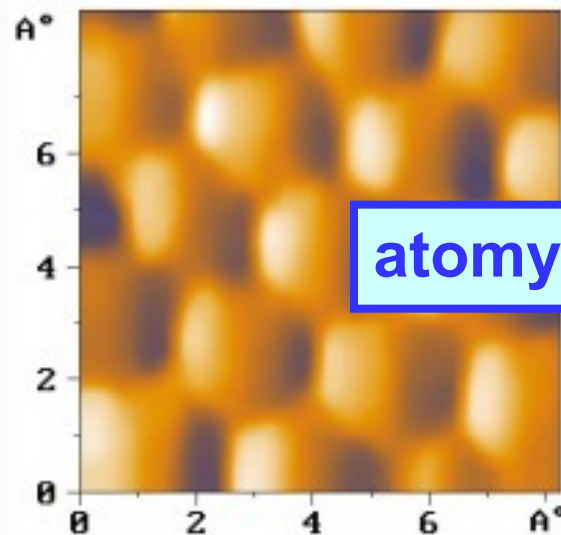
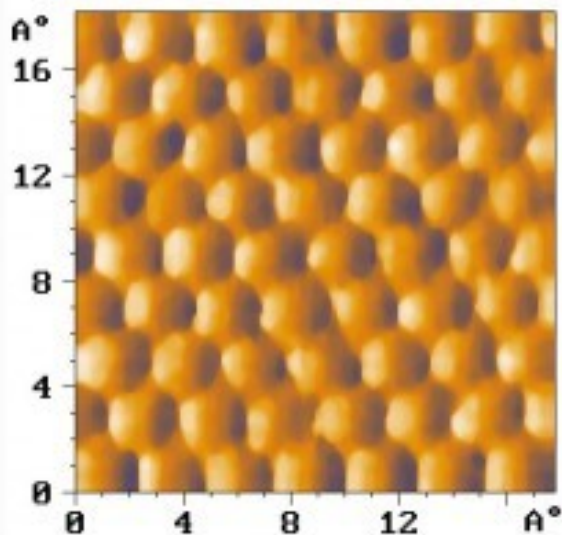
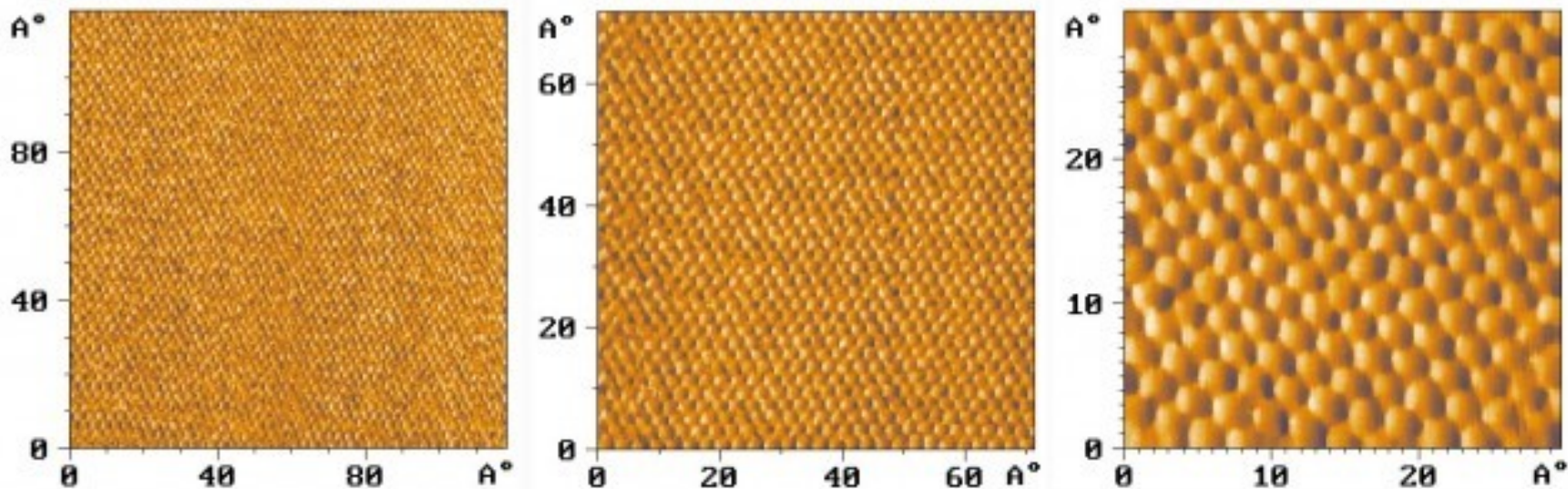
Atomární rozlišení



- atomy na povrchu hrotu a povrchové atomy vzorku spolu interagují



Atomární rozlišení

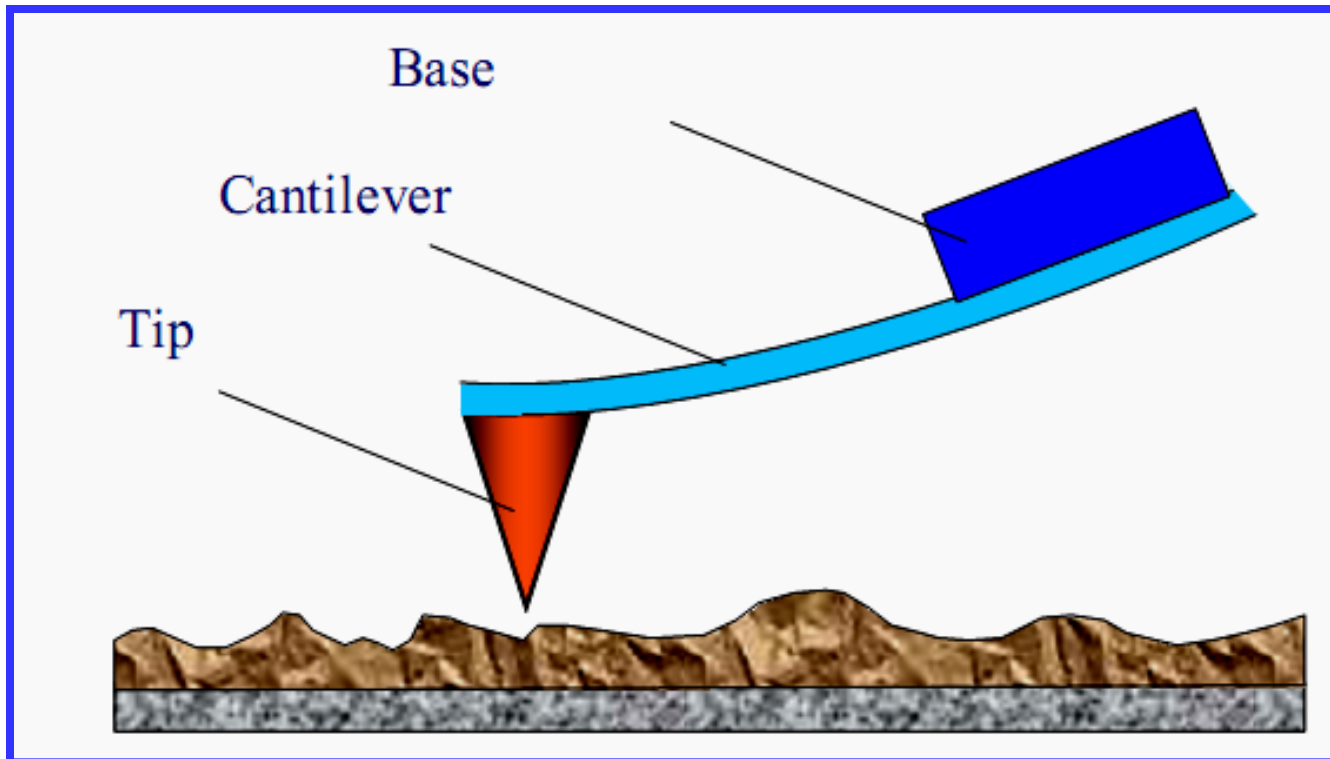


atomy uhlíku



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

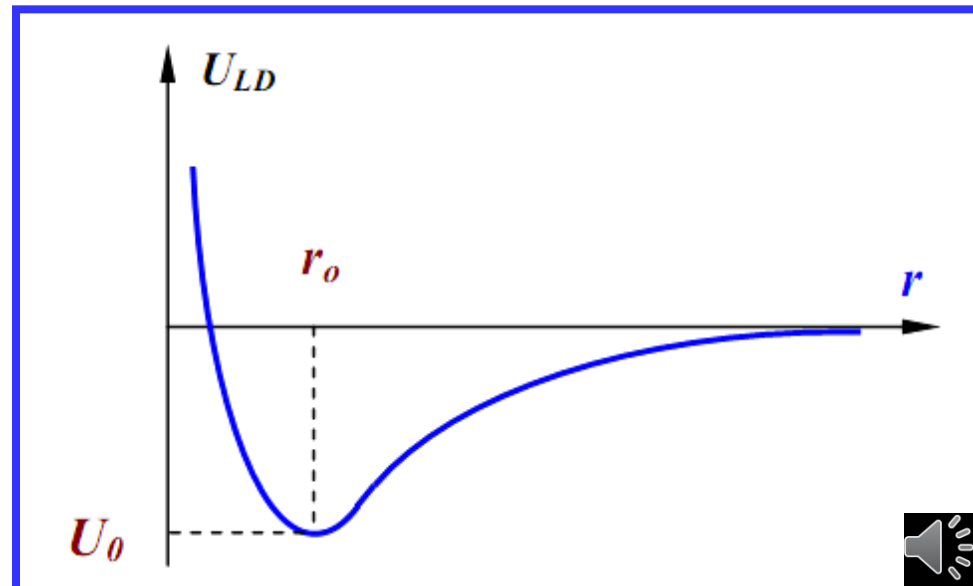
van der Waalsova potenciálová energie mezi dvěma atomy ve vzdálenosti r je aproximována exponenciální funkcí - Lennard-Jonesův potenciál

první člen v sumě popisuje vzdálené přitažlivé síly dané interakcí dipólů

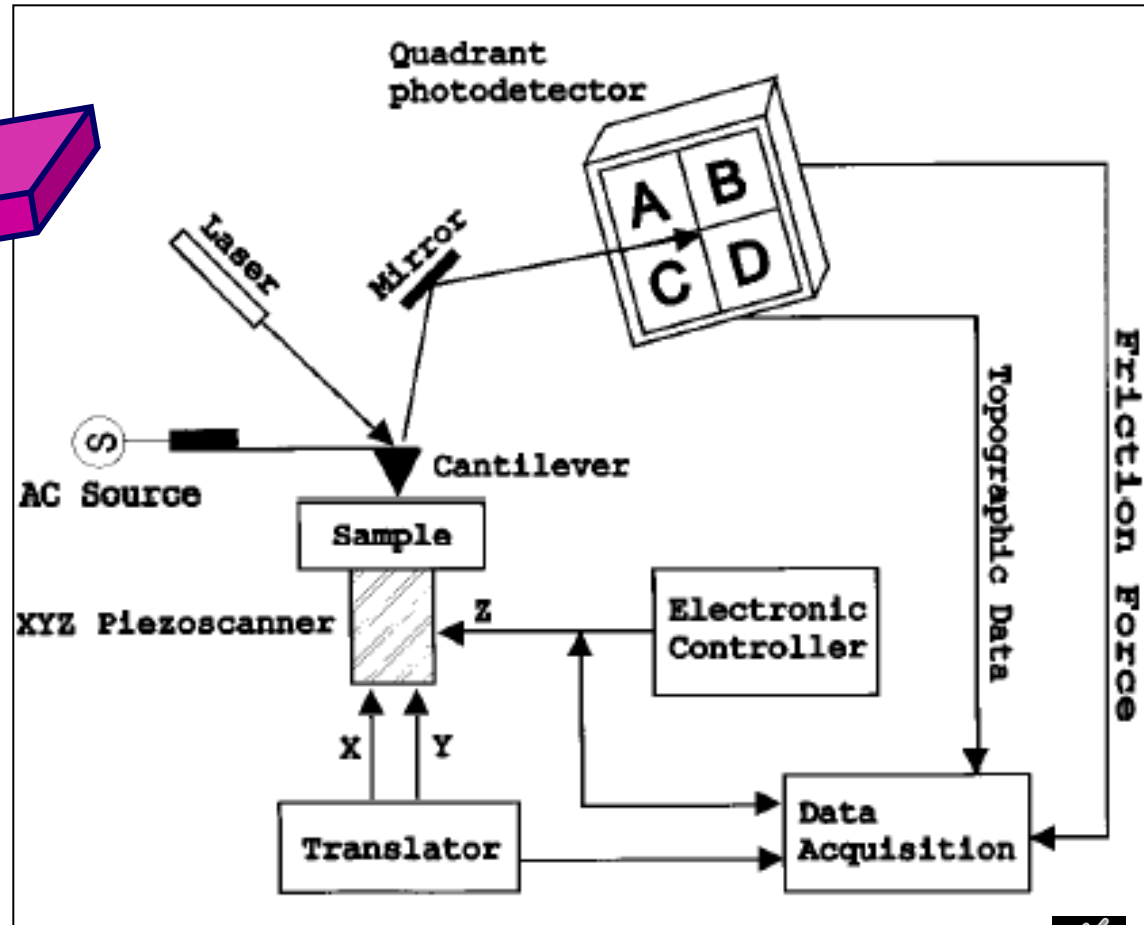
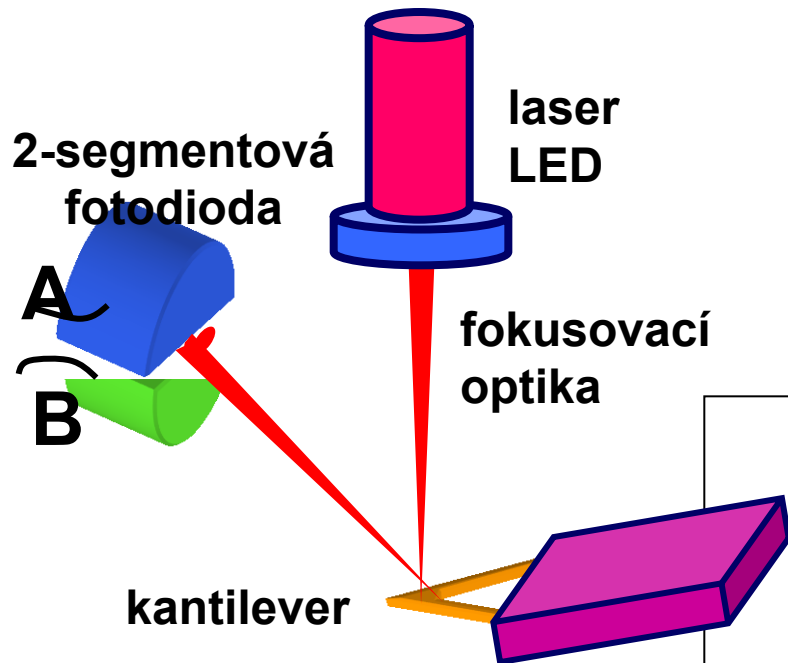
druhý člen se uplatní na kratší vzdálenosti - repulze daná Pauliho vylučovacím principem

r_0 je rovnovážná vzdálenost mezi atomy, hodnota energie je minimální

$$U_{LD}(r) = U_0 \left\{ -2 \left(\frac{r_0}{r} \right)^6 + \left(\frac{r_0}{r} \right)^{12} \right\}$$



Optický „zesilovací“ systém

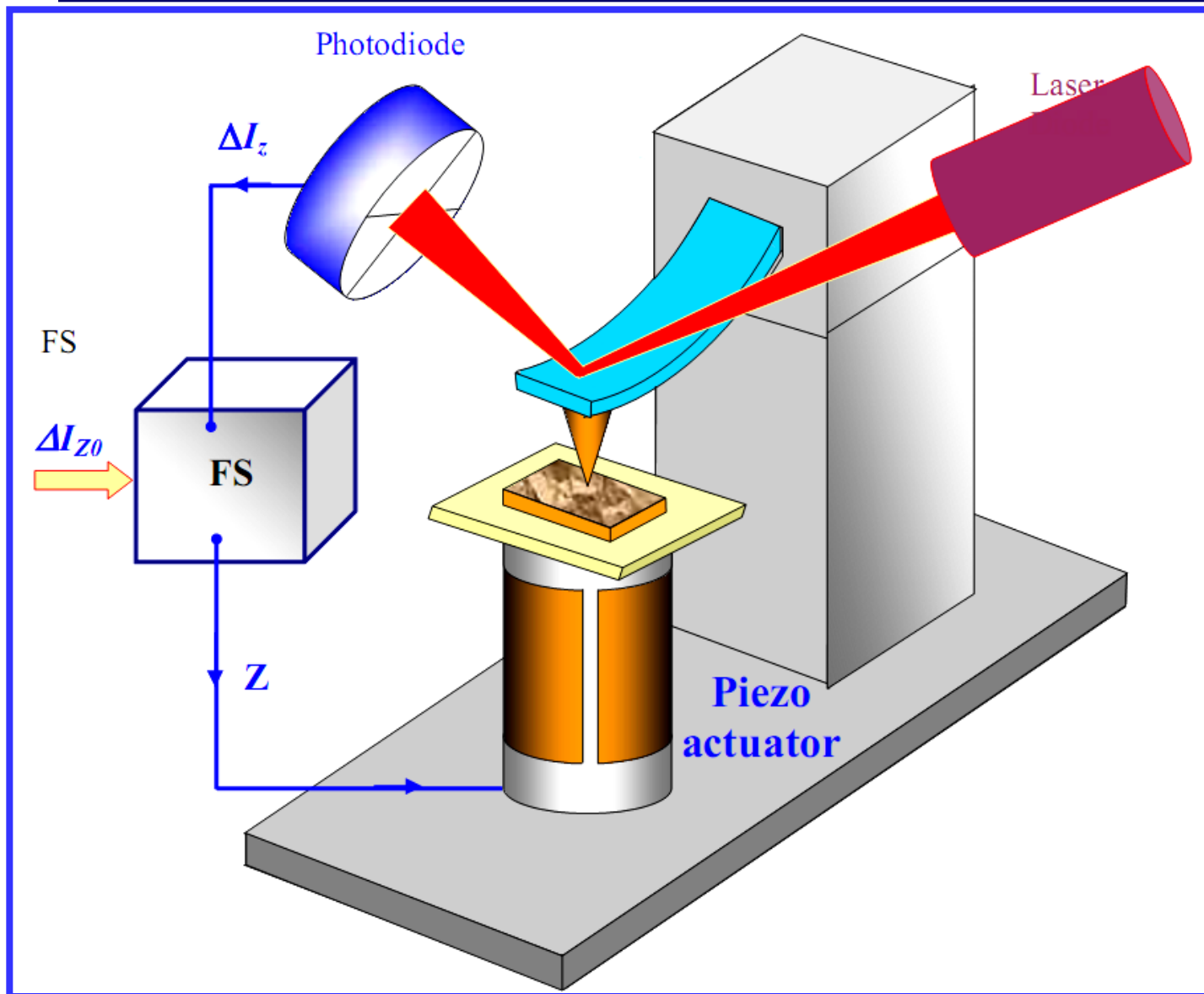


Schematické znázornění systému pro citlivé sledování vychylování kantilevru

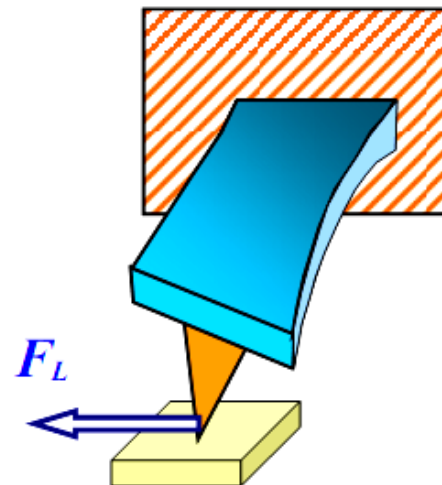
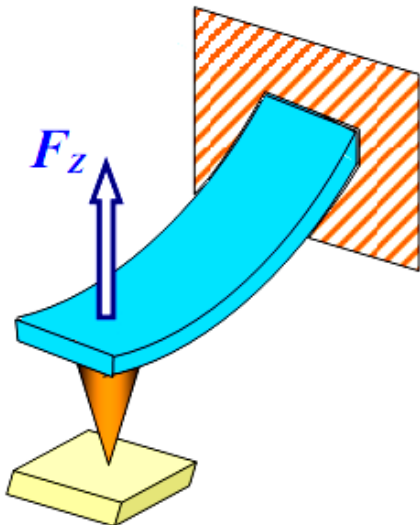
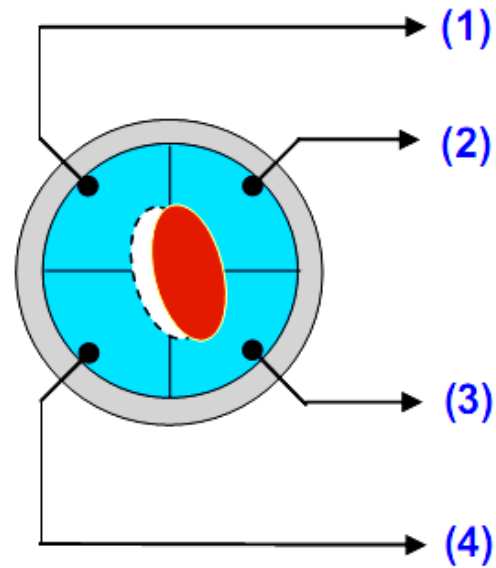
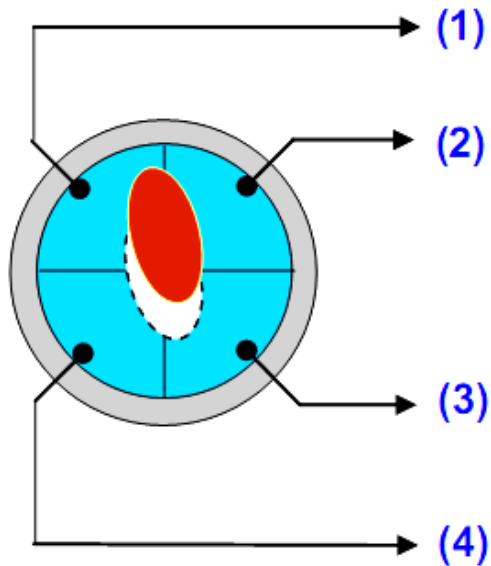
Rozdíl signálu A-B výstupních napětí segmentů fotodiody je úměrný velikosti výchylky kantilevru



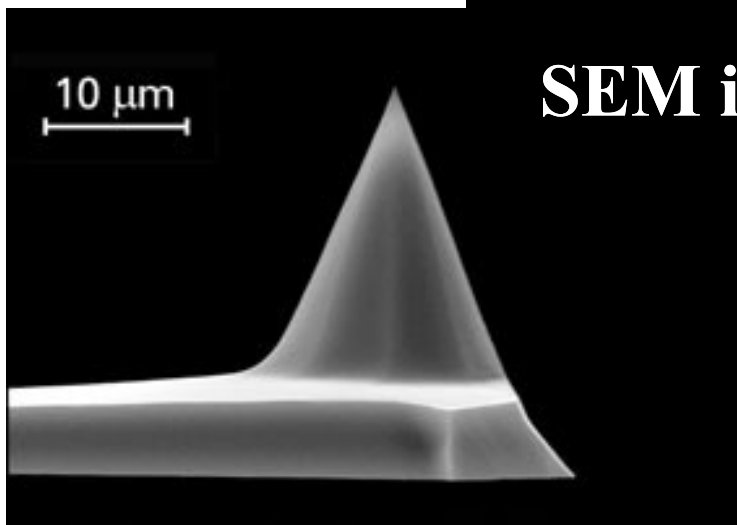
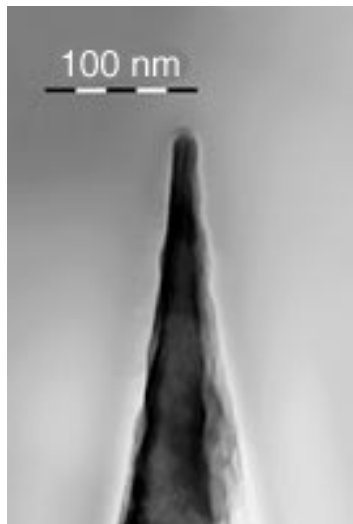
Zpětná vazba



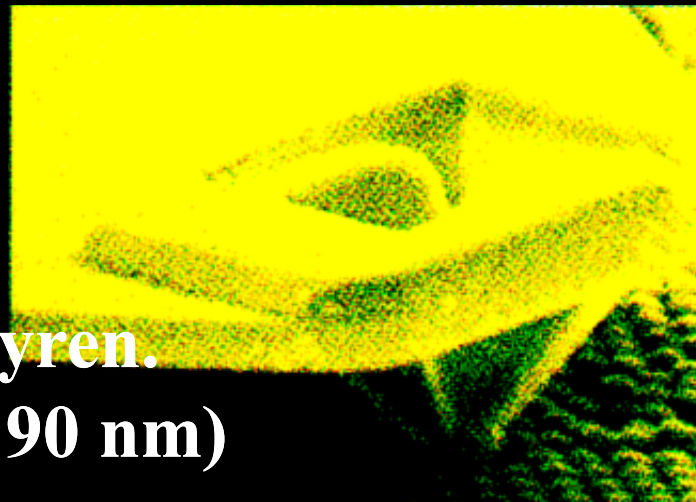
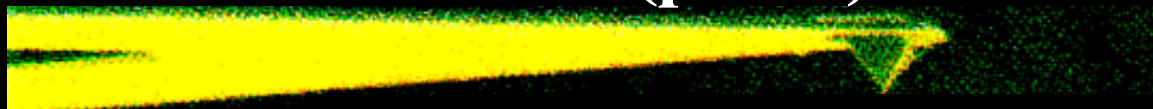
Vychylování nosníku



AFM

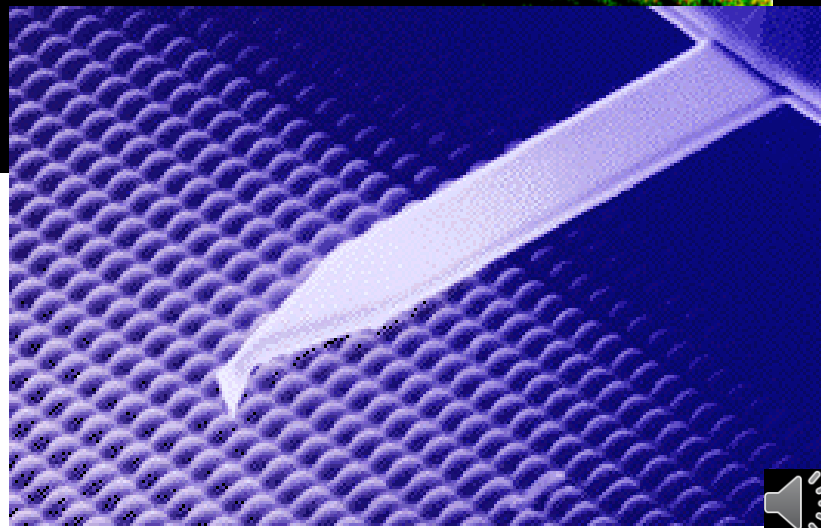


kantilever (proba)

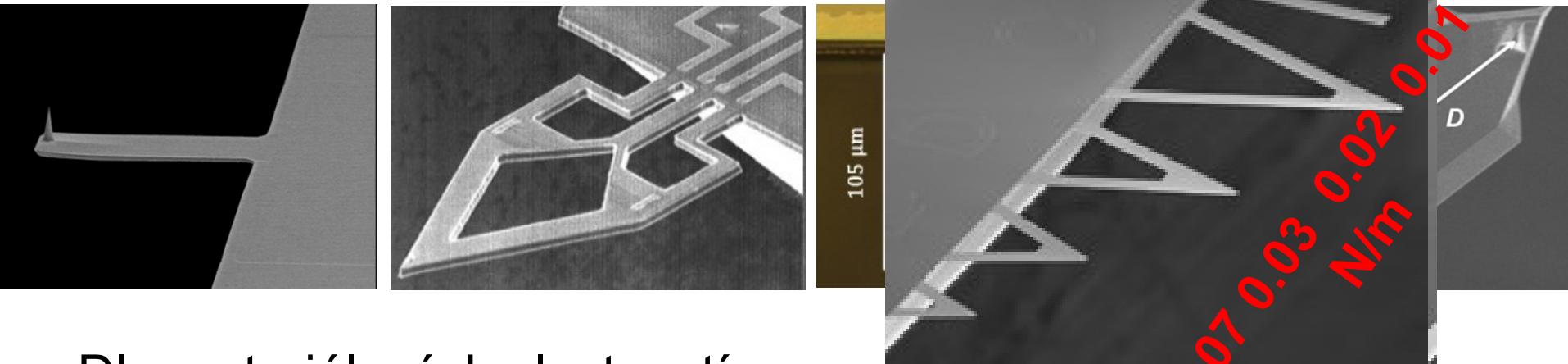


skenování polystyren.
kuliček (průměr 90 nm)

SEM image



Druhy kantileverů



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
----------------------	--------	------	---------	-----------

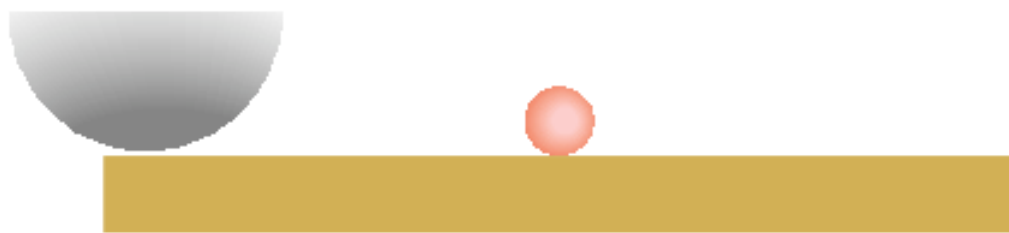
Materiál	kr. křemík	pol. křemík	sklo	Si ₃ N ₄
-----------------	------------	-------------	------	--------------------------------

Res. f. [kHz]	200-500	100-200	15-100	1-20
----------------------	---------	---------	--------	------

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

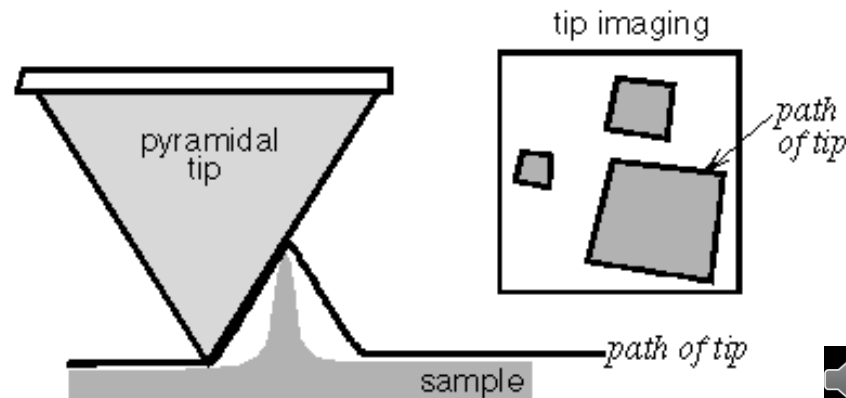
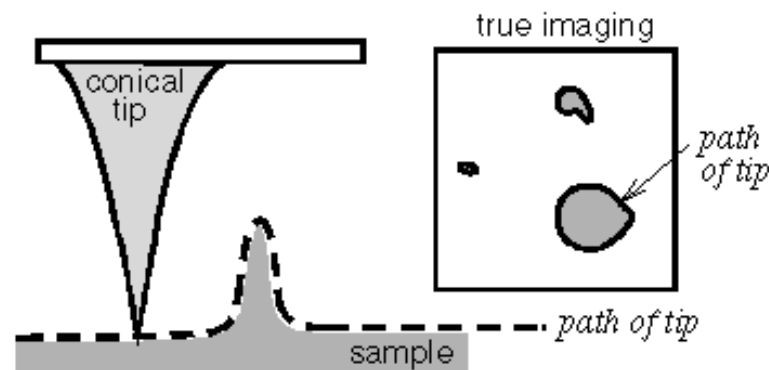


AFM: laterální rozlišení



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

konvoluční efekt hrotu-vzorku

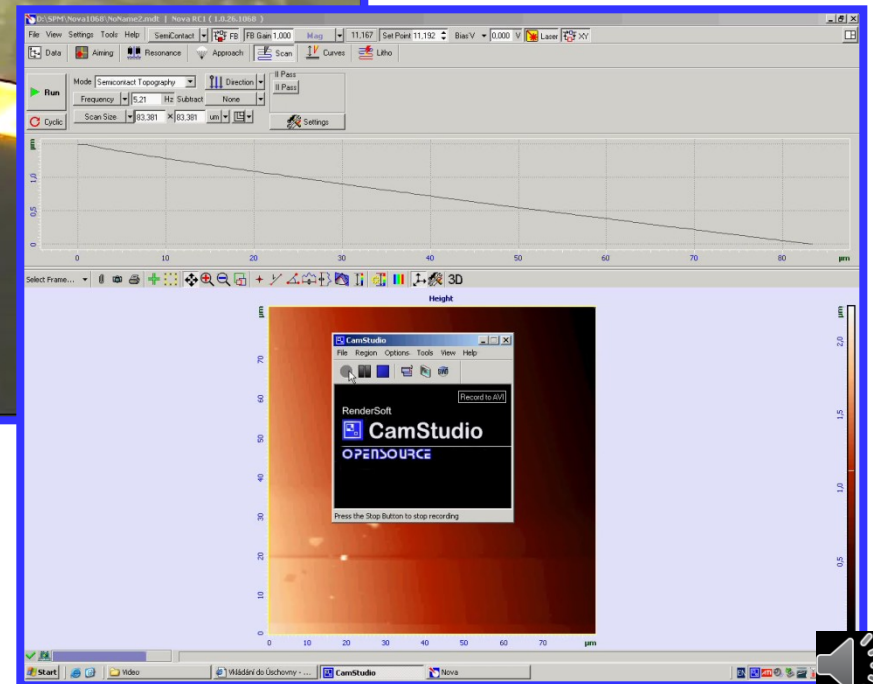
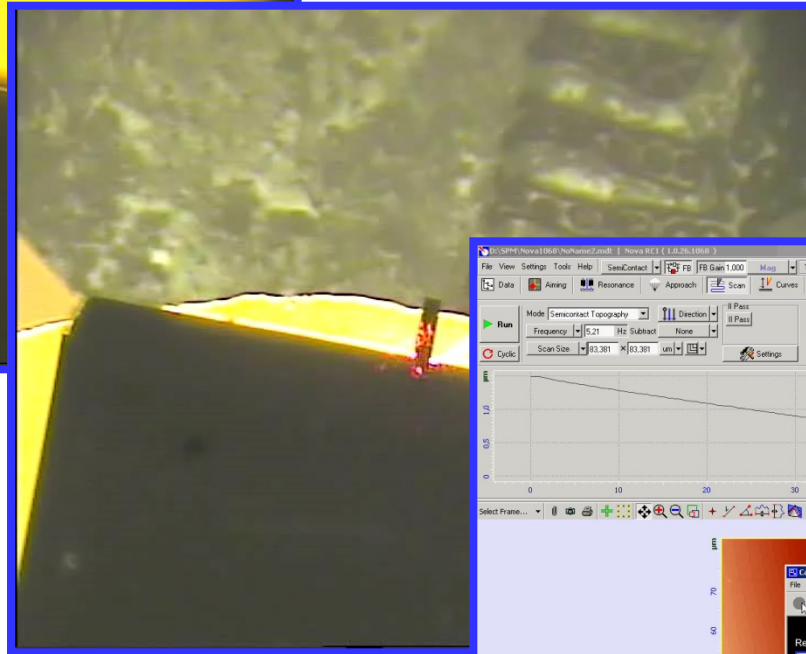


- vliv konvoluce na topografii



Nastavení, sken, zobrazení

integrováný videomikroskop
přesné nastavení na
zkoumanou oblast



Instrumentace

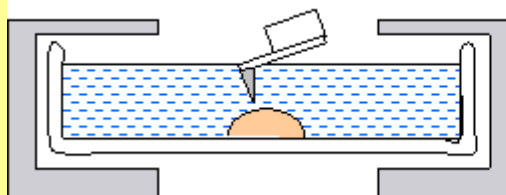
- MultiMode, Digital Instruments (Veeco)
- PicoPlus, Molecular Imaging
- skenovací hlava



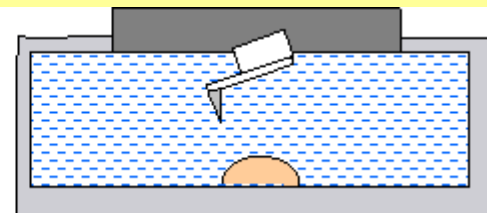
AFM systém Ntegra Vita



cely pro práci v kapalinách



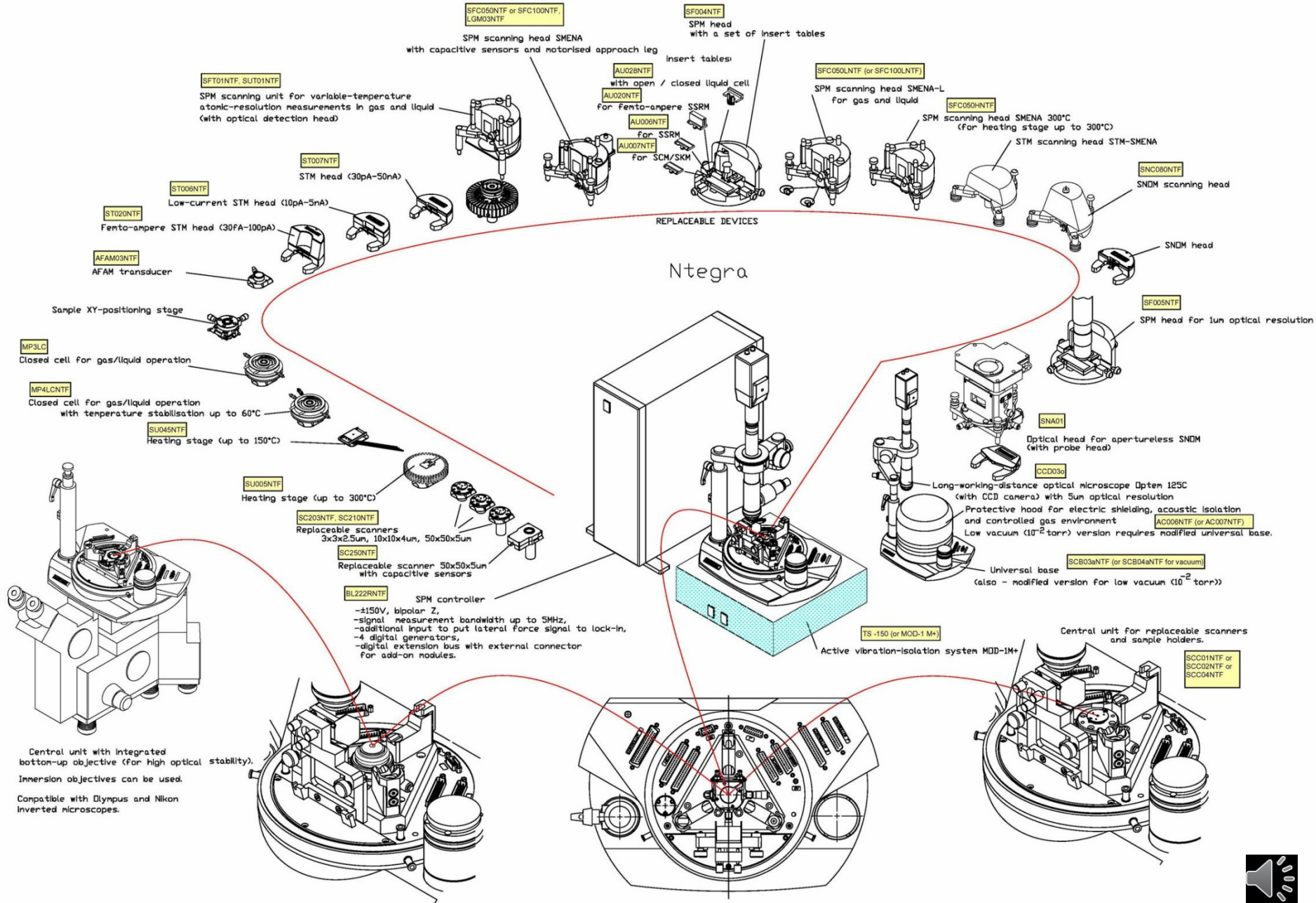
**otevřená
pro petriho misky**



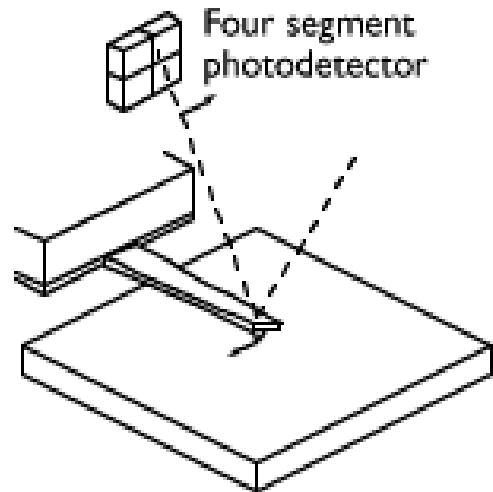
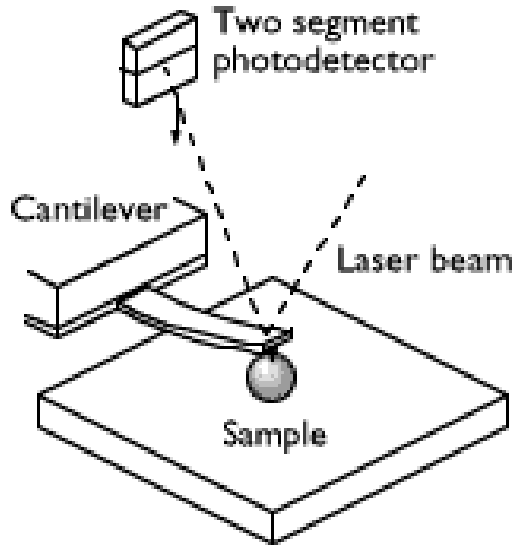
**uzavřená
průtočná, vč.
temperace**



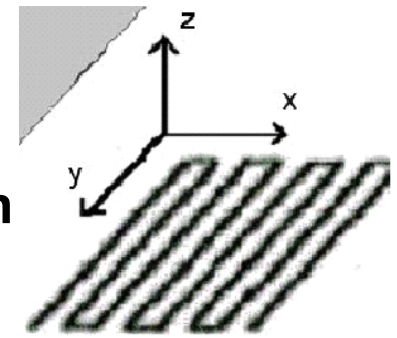
... modulární systém



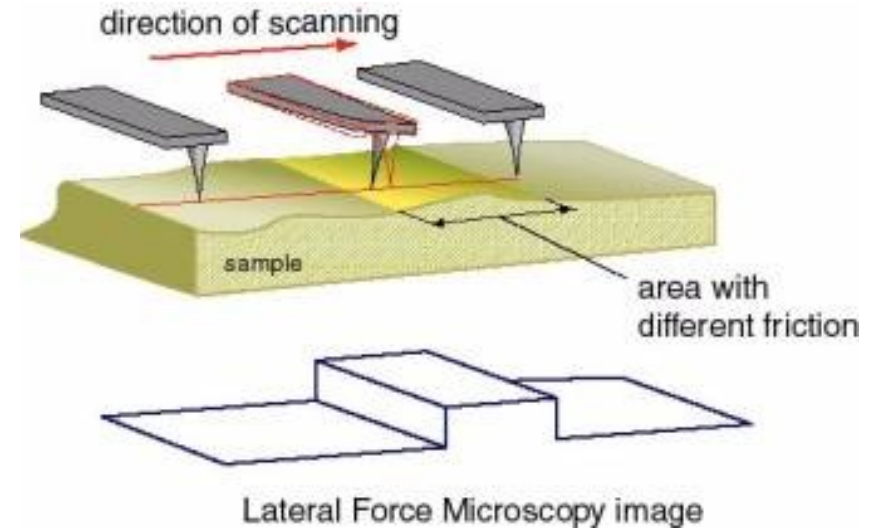
AFM: kontaktní mod



rastrový sken



- vertikální výchylka (deflektce) = topografie



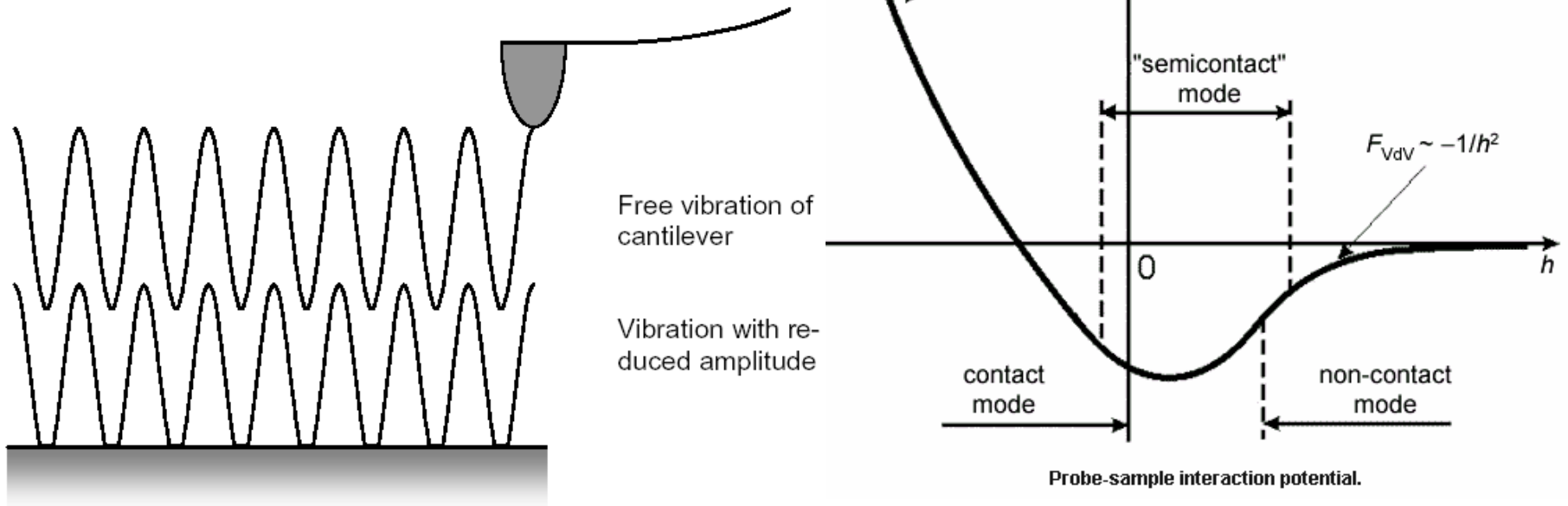
- laterální výchylka = frikční síly



Contact modes



AFM: „tapping“ mod



- 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



Semiconductors



Non-contact modes



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)

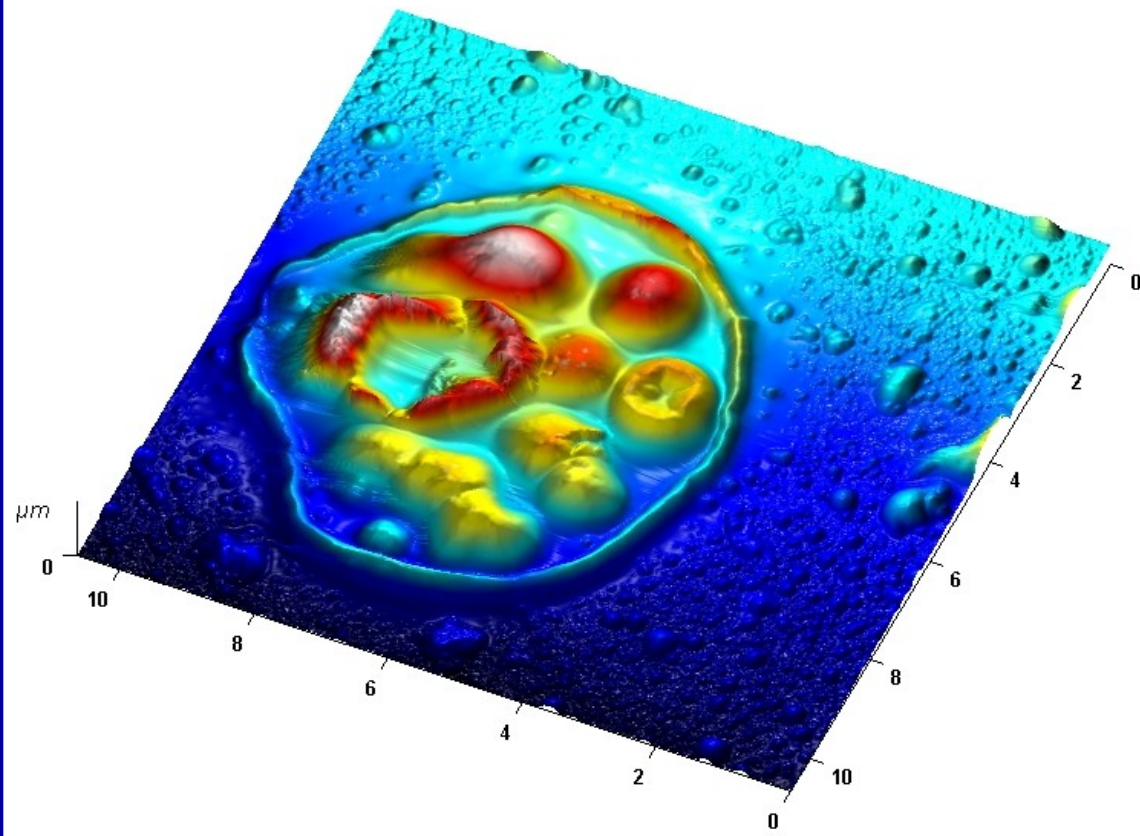
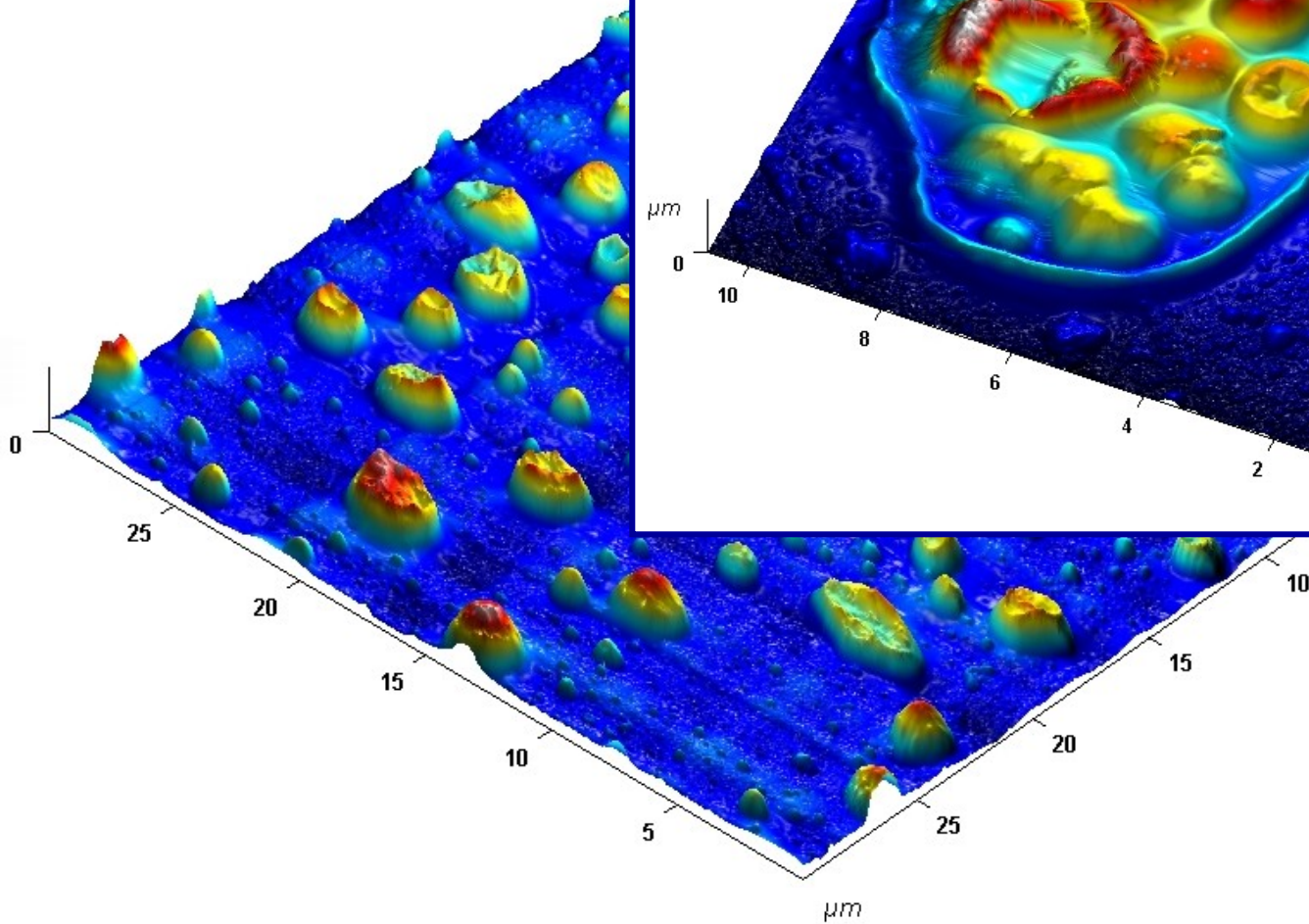
- + {
 - vyšší laterální (xy) rozlišení (1 až 5nm)
 - menší síly a menší poškození měkkých objektů na vzduchu
 - eliminace laterálních interakcí

- {
 - nízká rychlost skenování

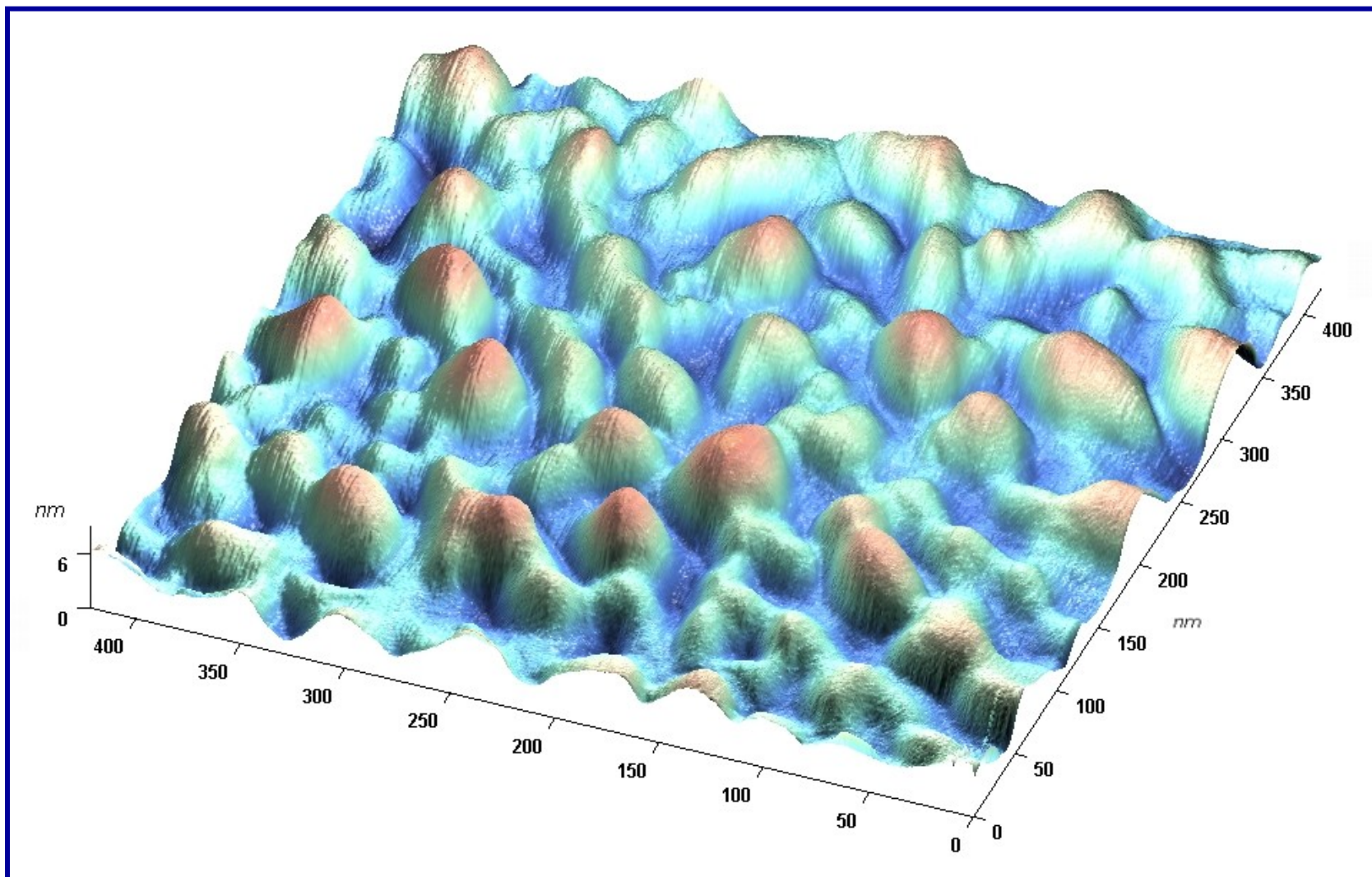


Electropolymerizované vrstvy

- 1,4-diaminobenzen
a resorcinol



Au nanočástice



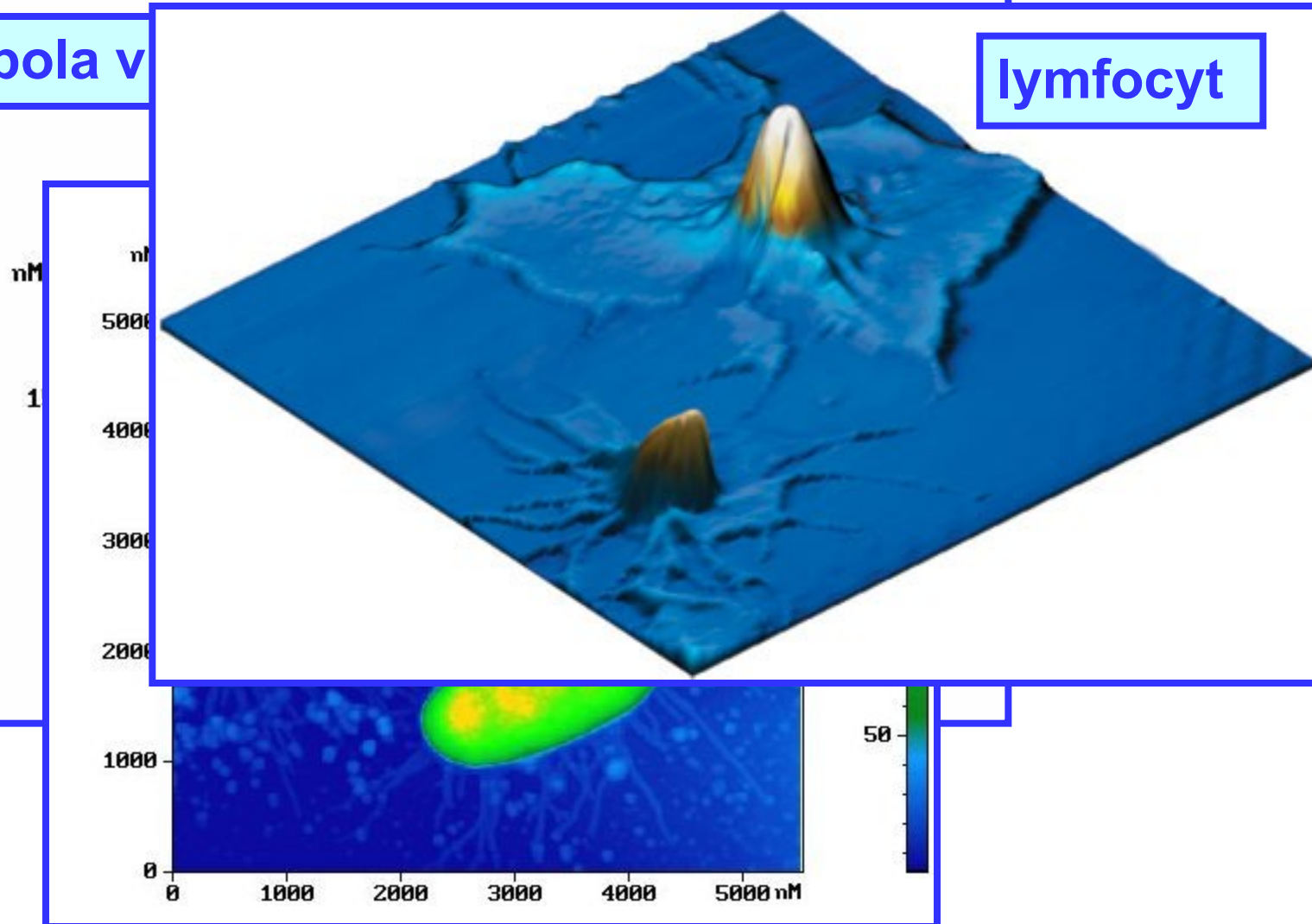
■ slída (mica) silanizovaná thiol-modifikovaným silanem



Viry a buňky (web NT-MDT)

Ebola v

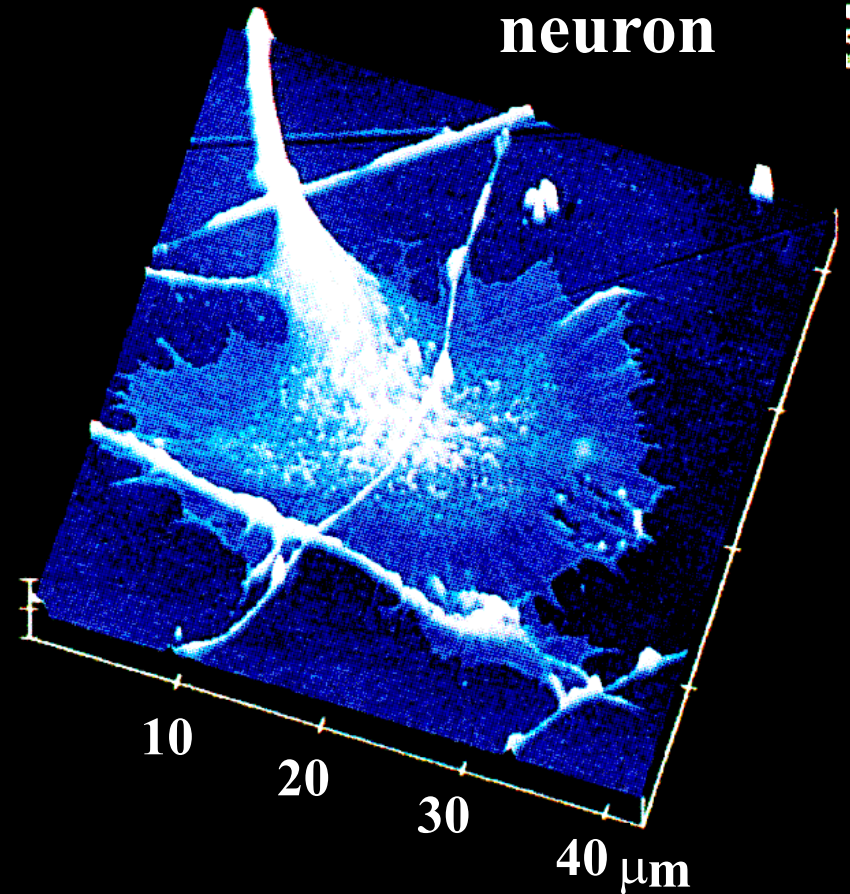
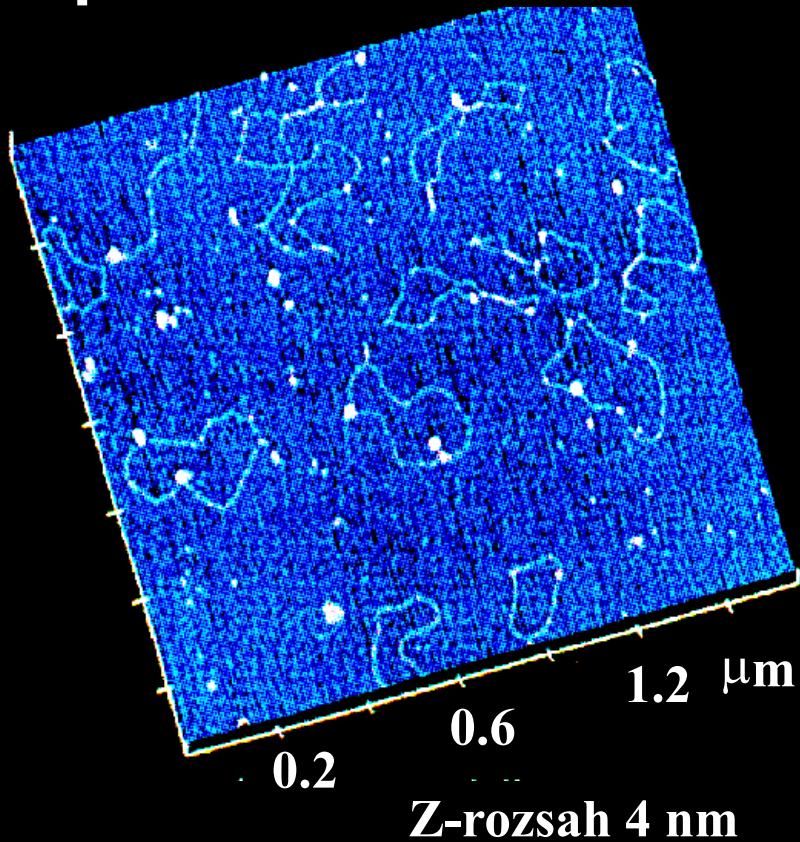
lymfocyt



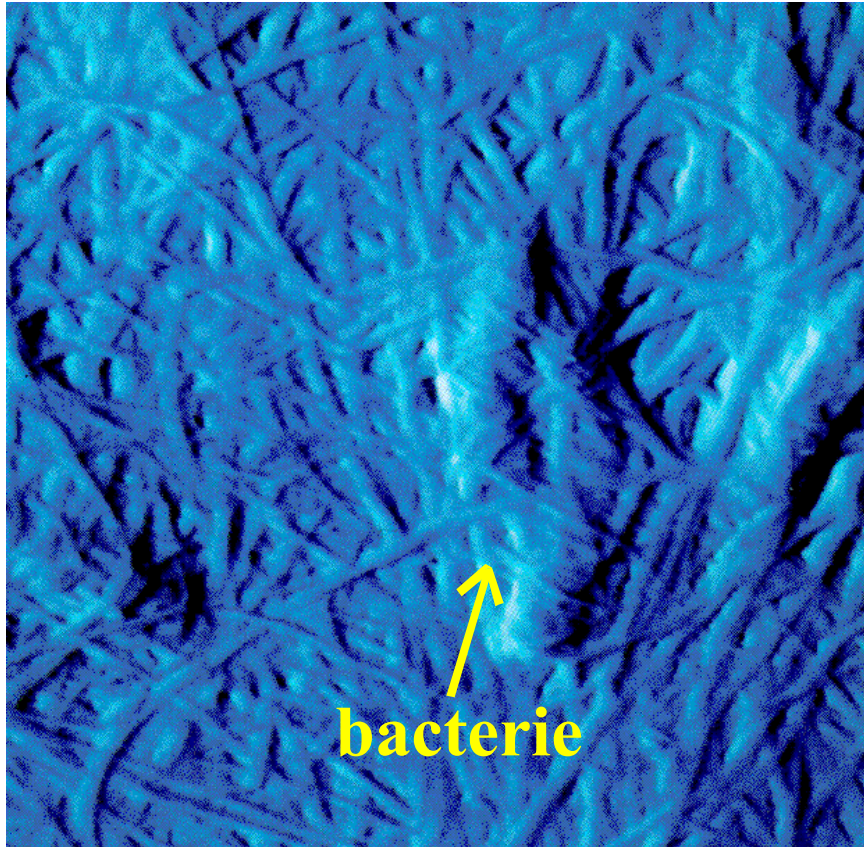
AFM DNA

BioScope (zvětšení až 10^7 x)

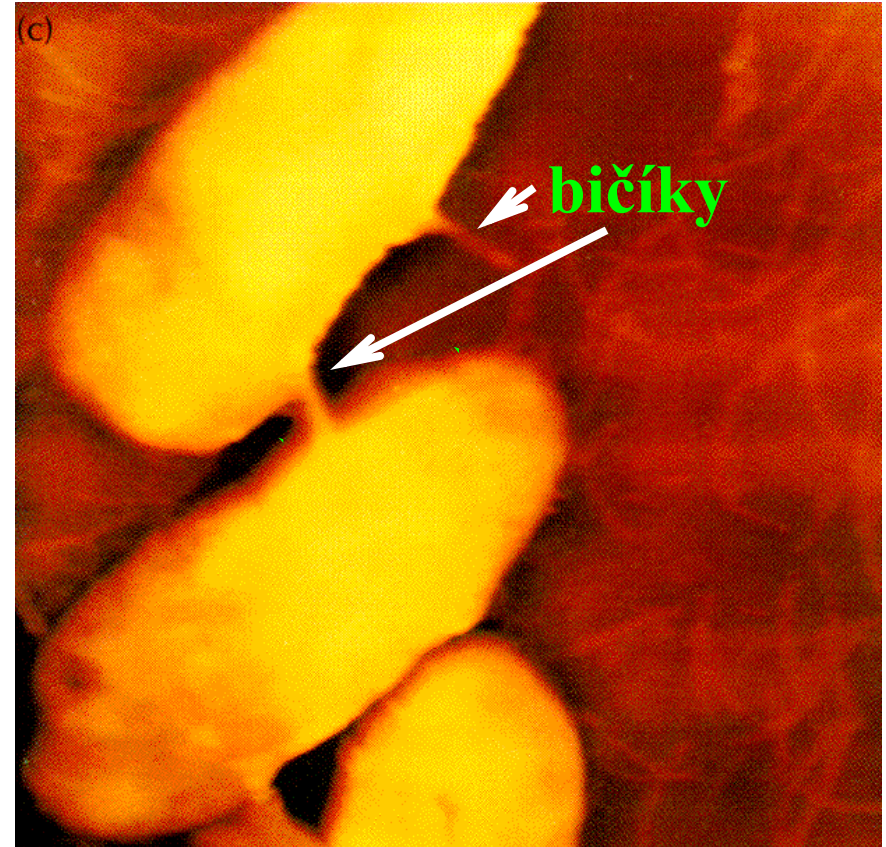
EcoRI v komplexu
s plazmidovou DNA



AFM bakterie



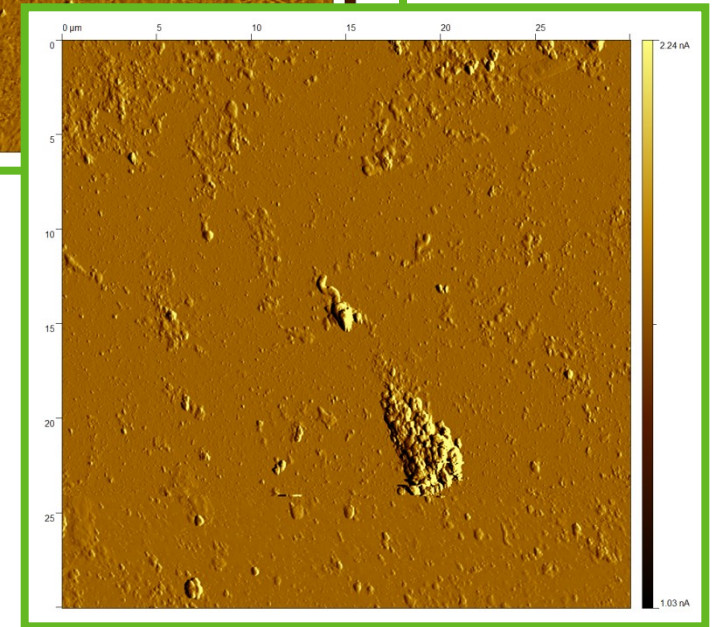
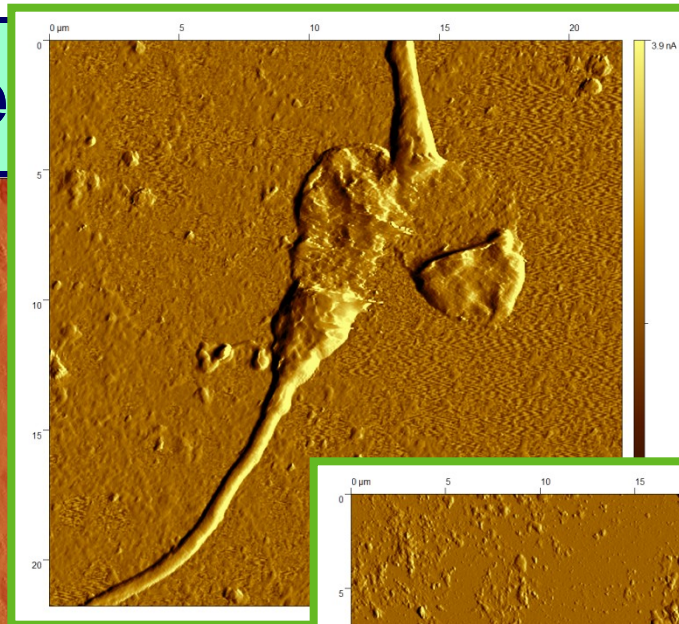
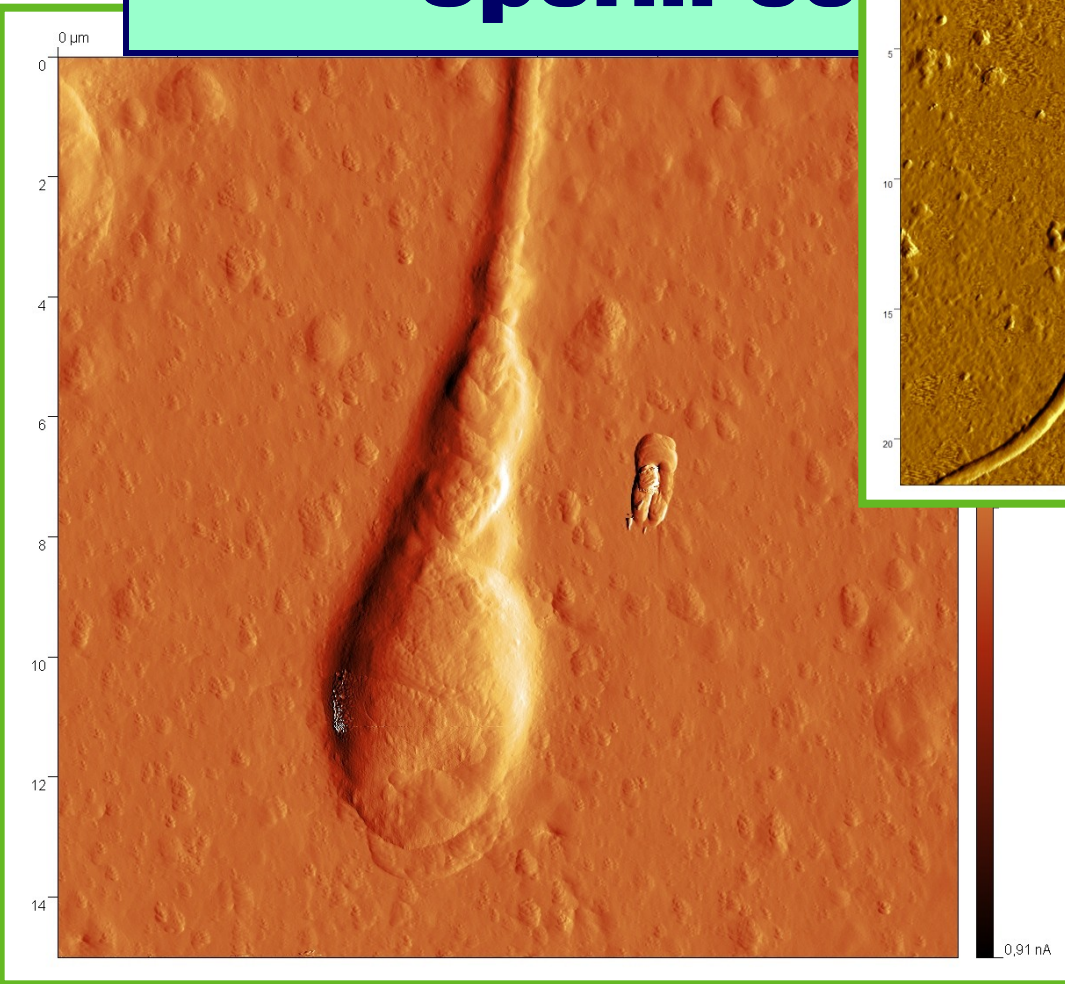
celulosa napadená bakterií
8x8 μm



Pseudomonas putida
5x5 μm max. výška 500 nm



Sperm ce

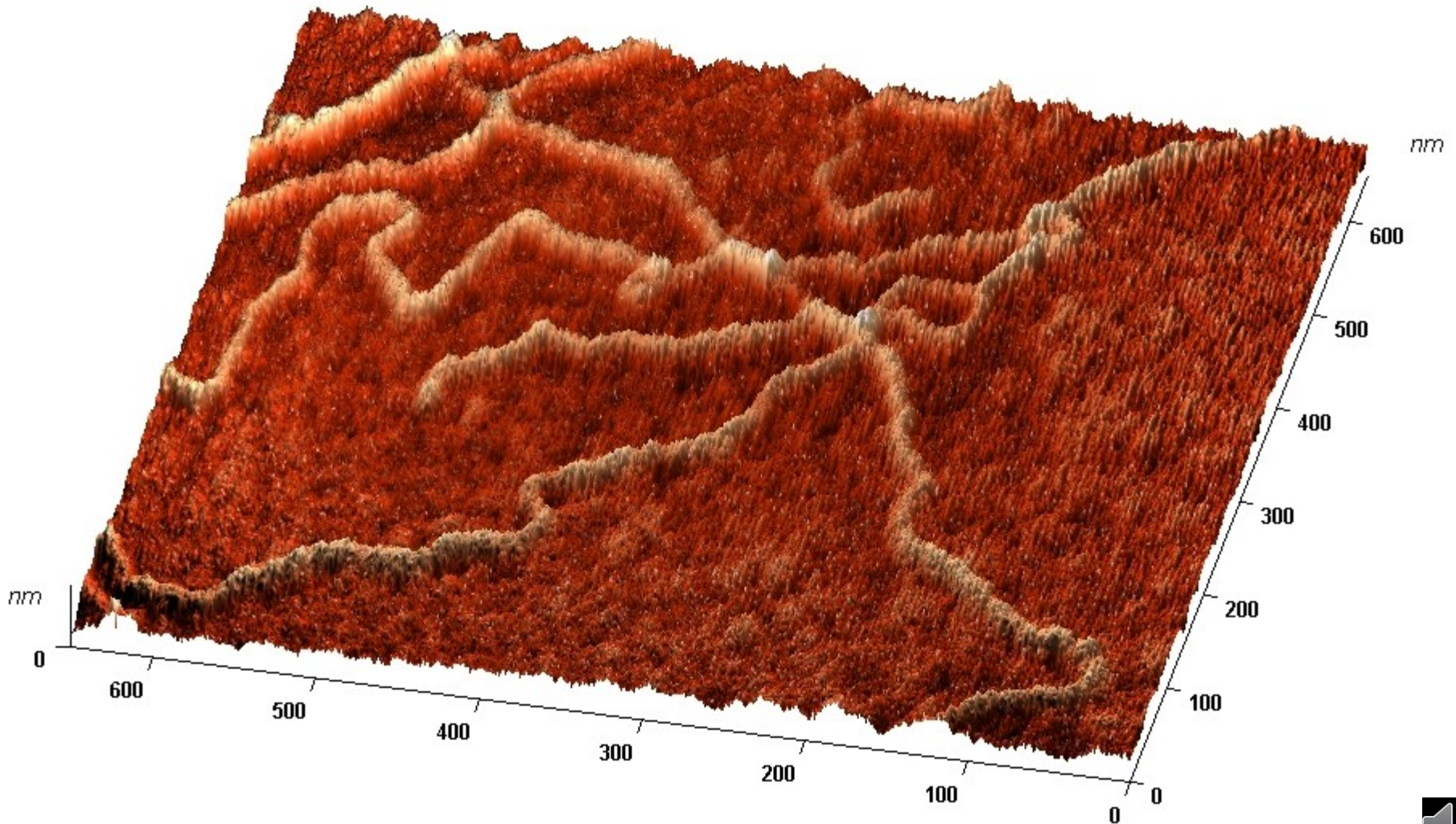


- Jan Přebyl (NCBR) and Igor Crha (Medical Faculty) investigate sperm cells and effects of oxidative stress (hydrogen peroxide as simulator)

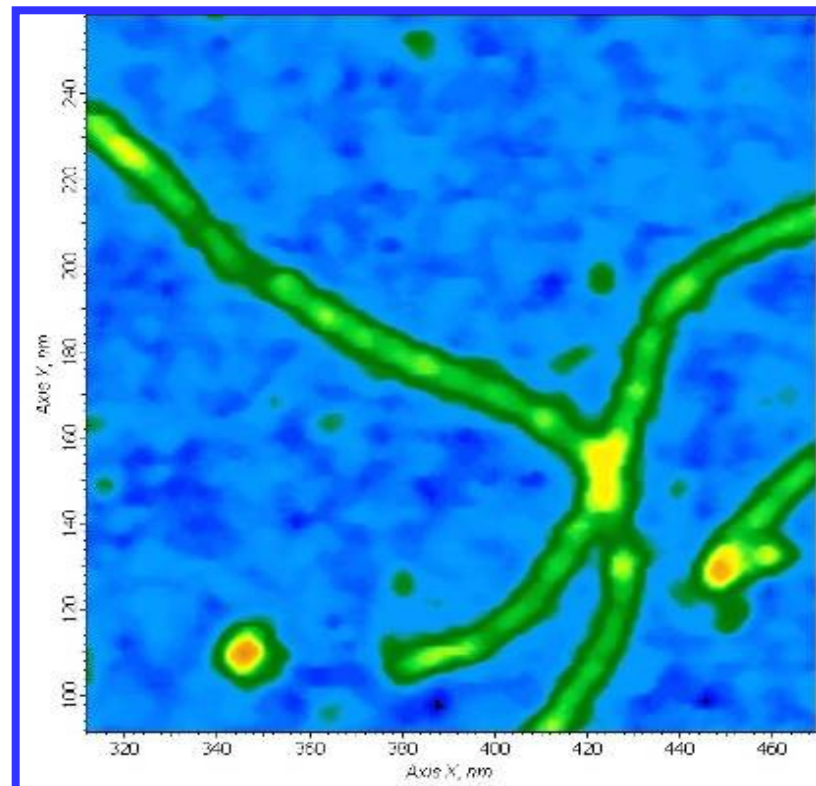
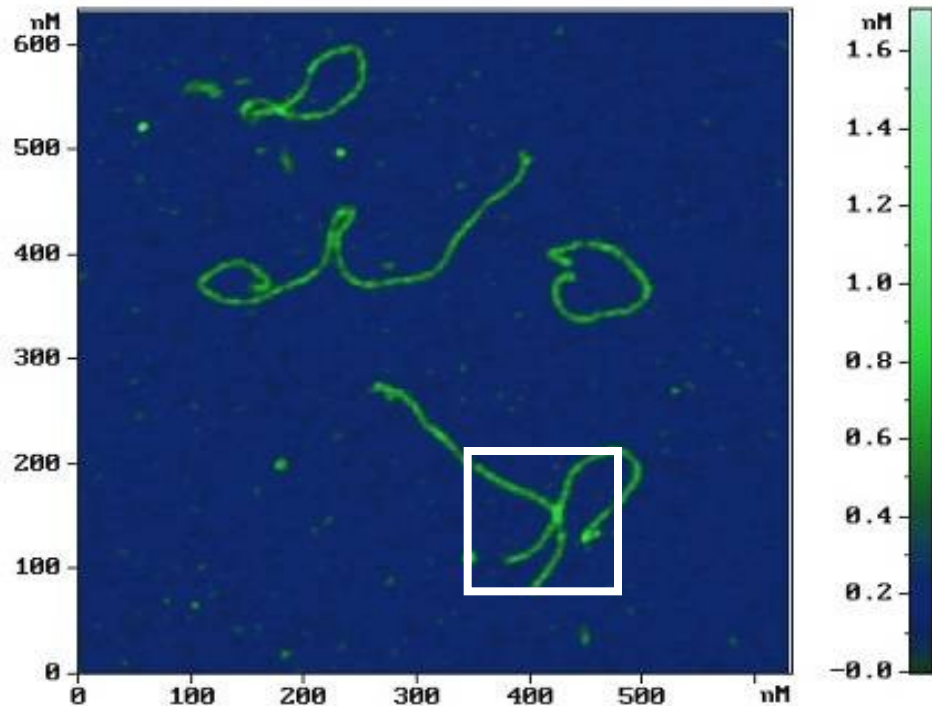


AFM nukleových kyselin

- DNA z telecího brzlíku na slídě modif. Mg^{2+}



Biomolekuly ...

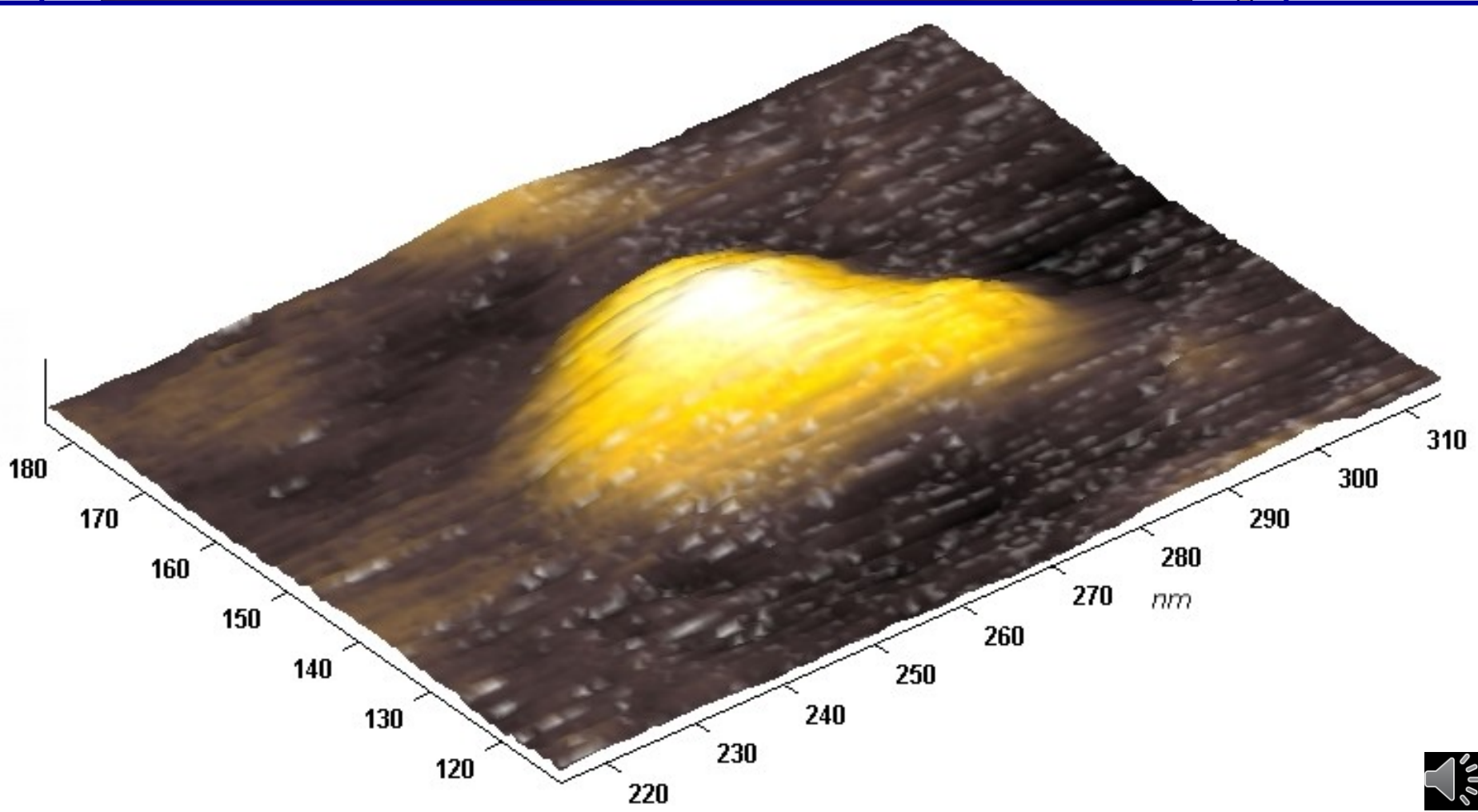
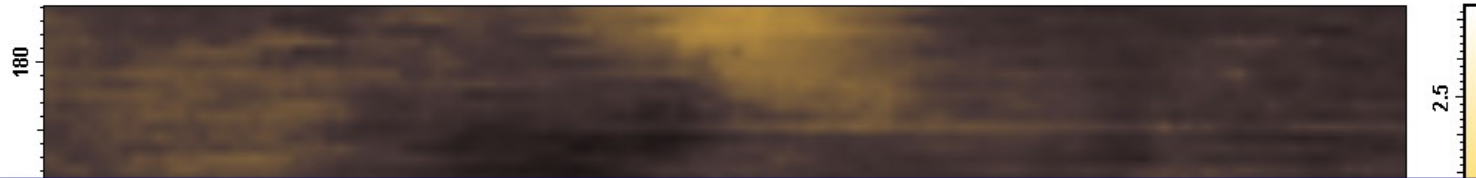


kolagen typu I-III, vpravo
zvětšeno a přebarveno

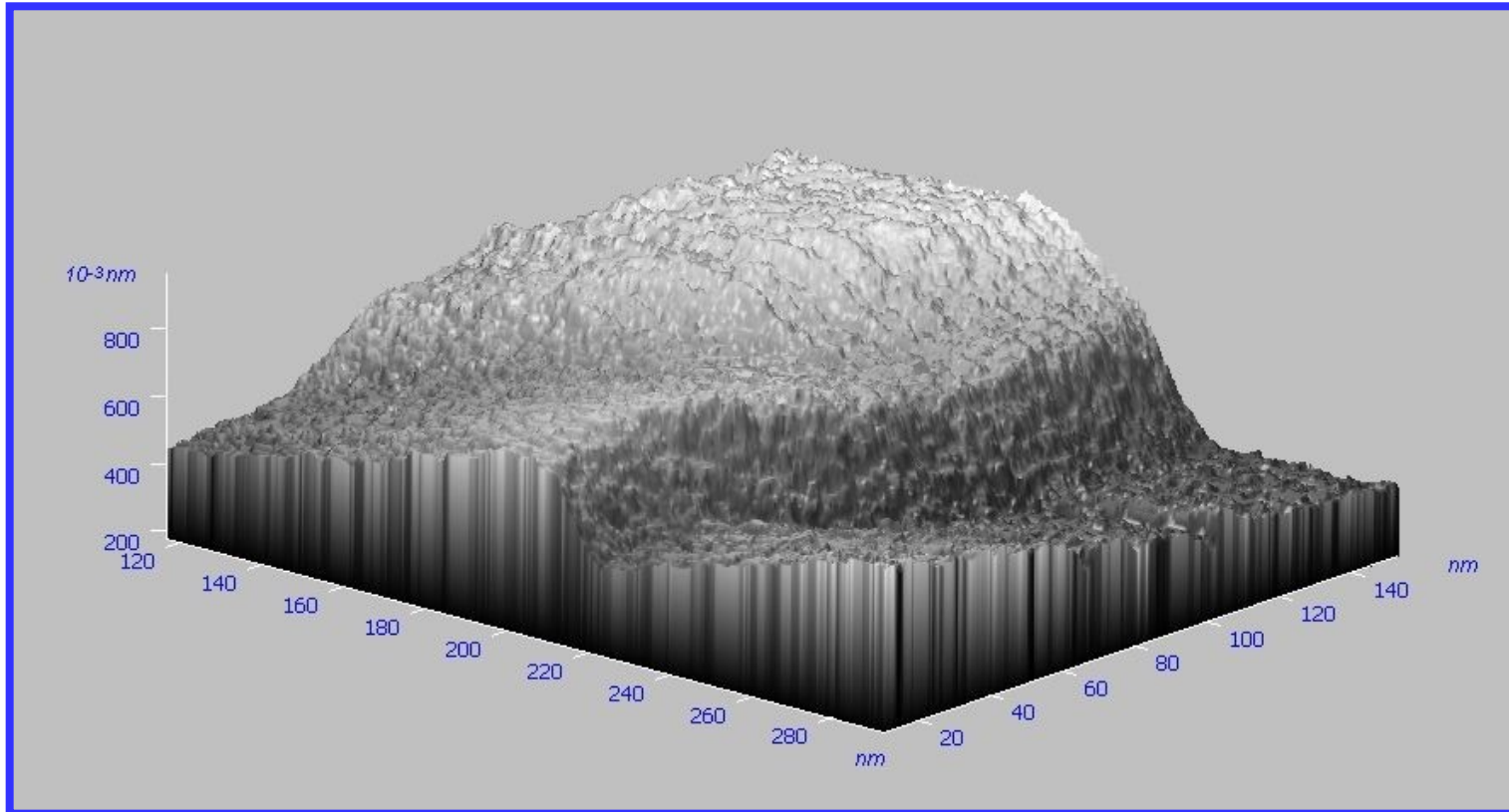


IgG detaily

Height



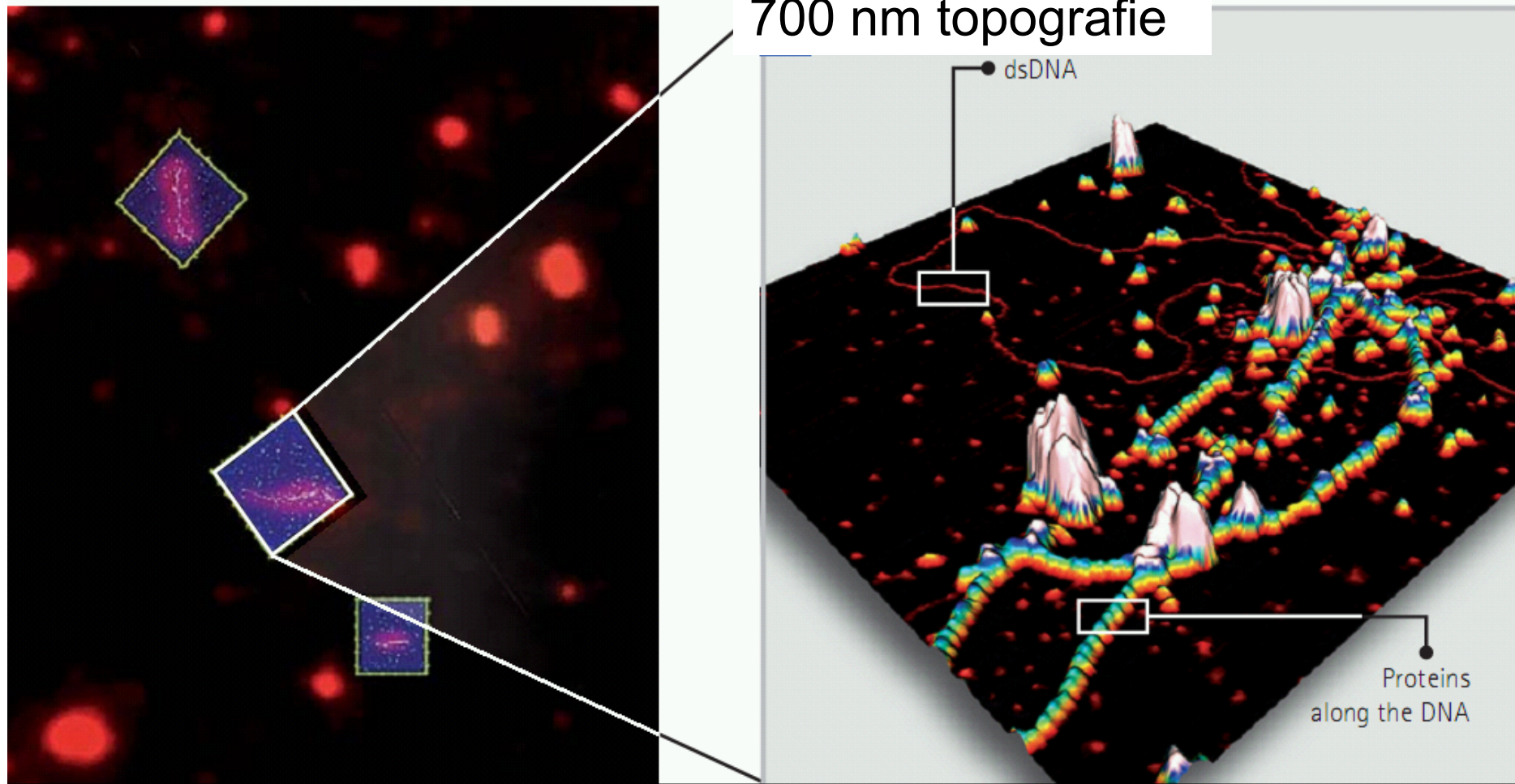
Atomární rozlišení



**jednotlivé vrstvy atomů
uhlíku v orientovaném
pyrolytickém grafitu**



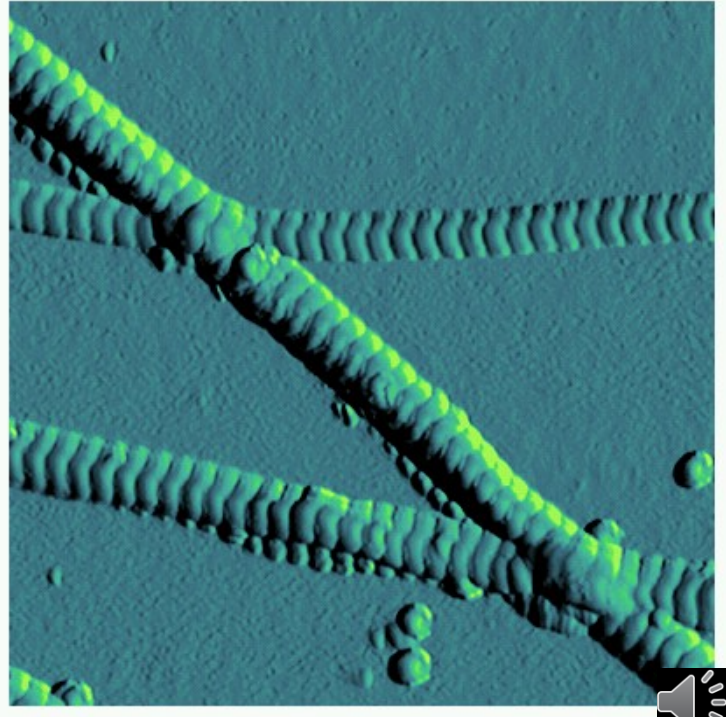
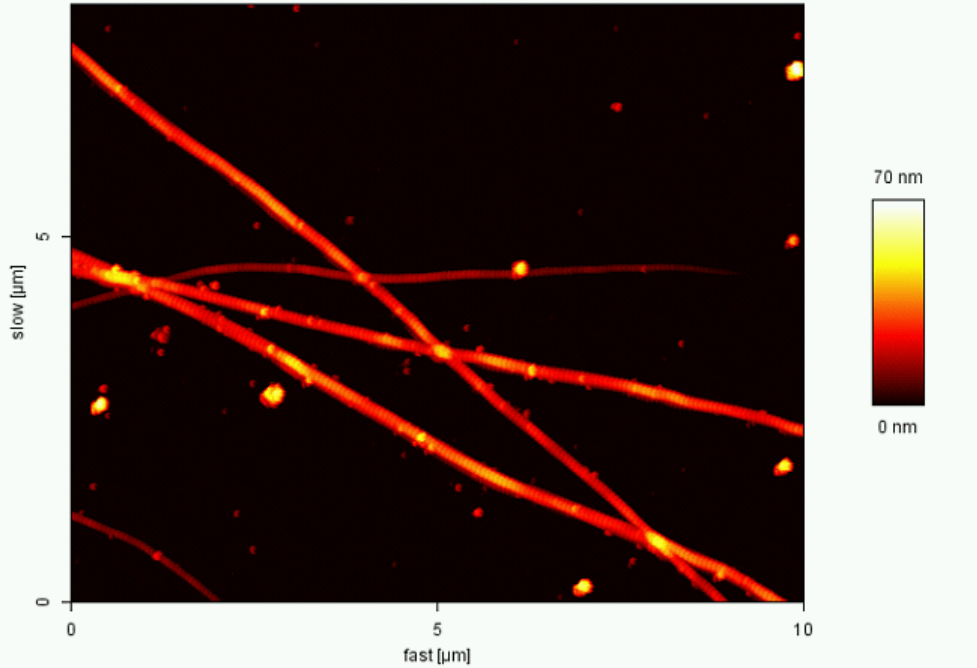
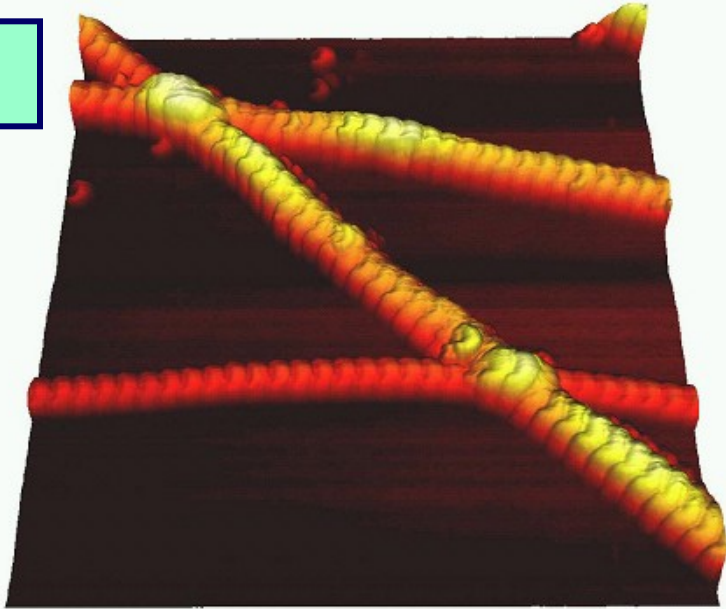
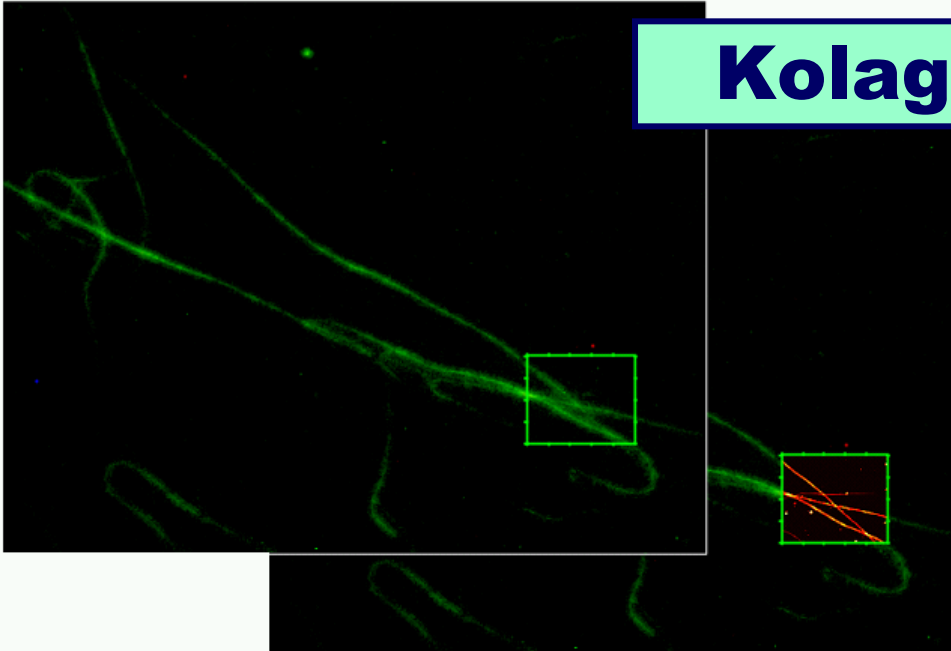
Fluorescence a AFM



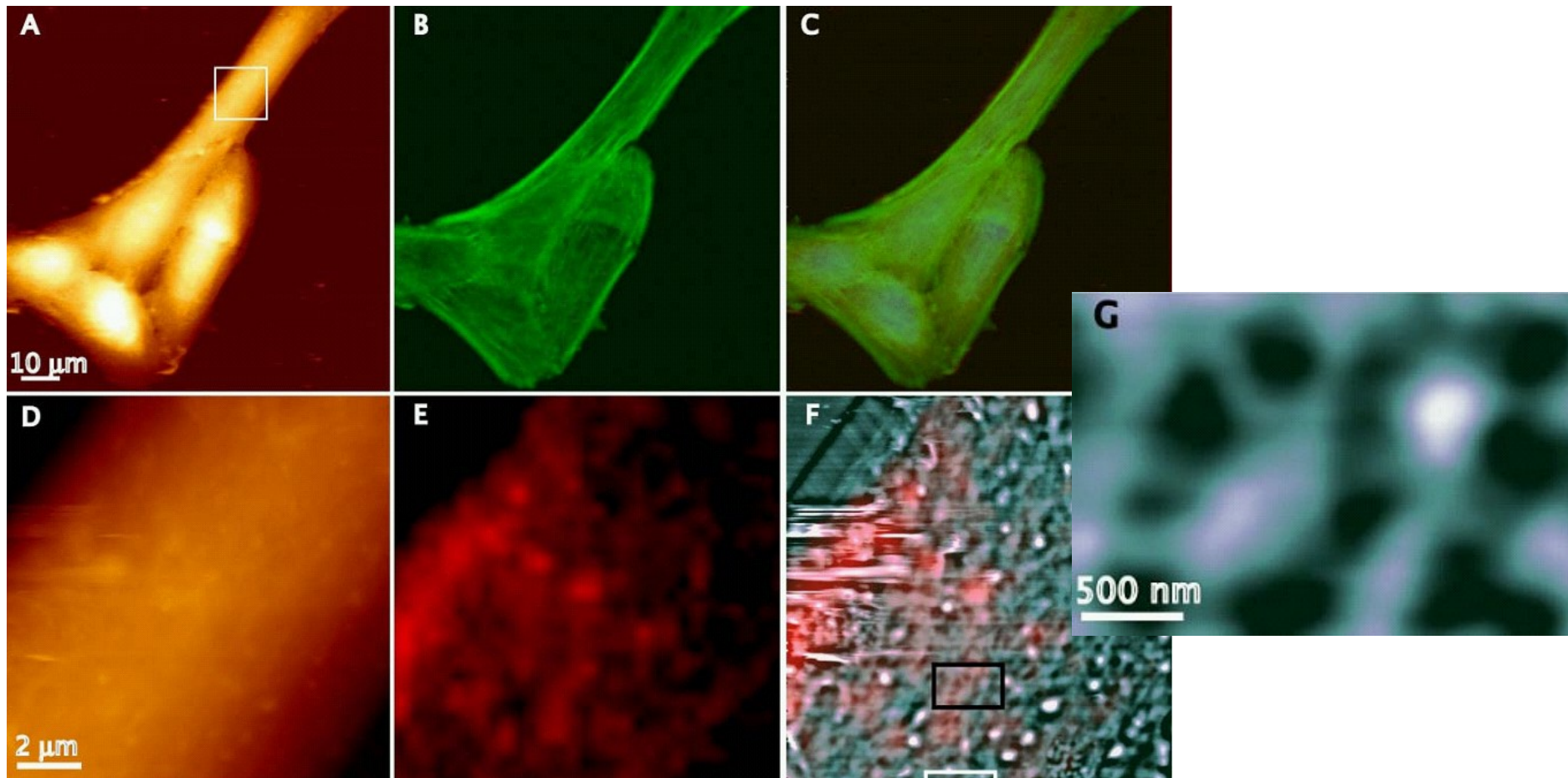
- Rad51 protein (fluorescenčně značený Alexa555) vytváří filameny podél dsDNA
- detailní AFM 3D sken vybrané oblasti



Kolagen



Konfokální mikroskopie a AFM

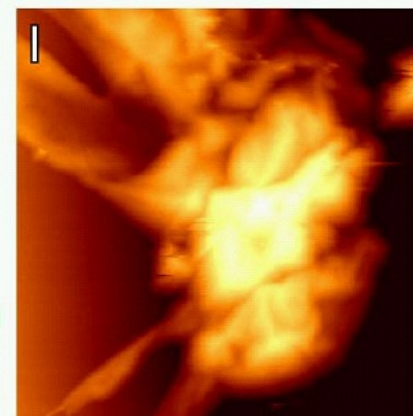
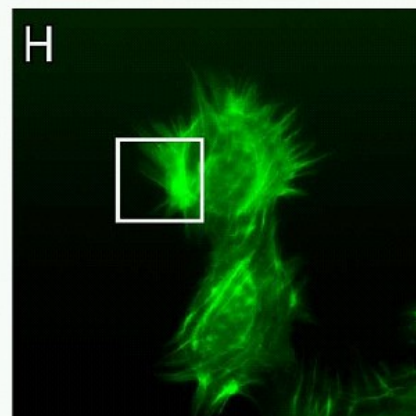
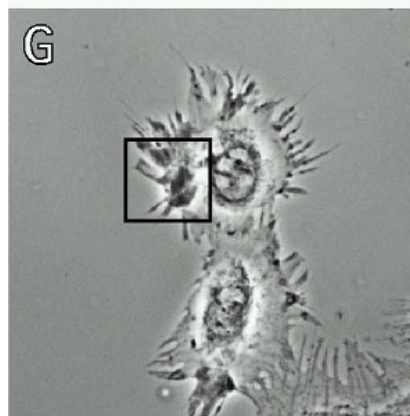
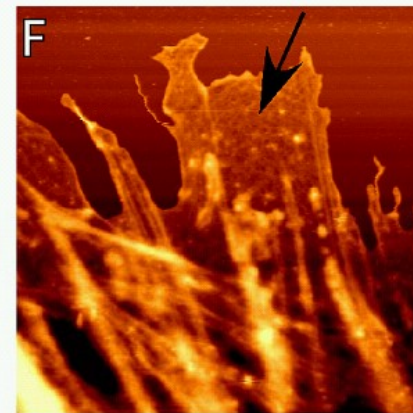
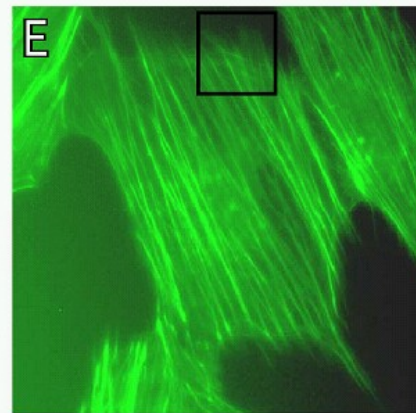
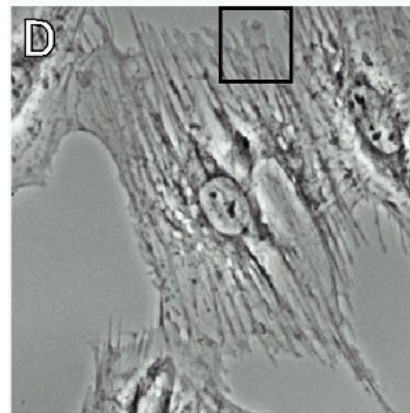
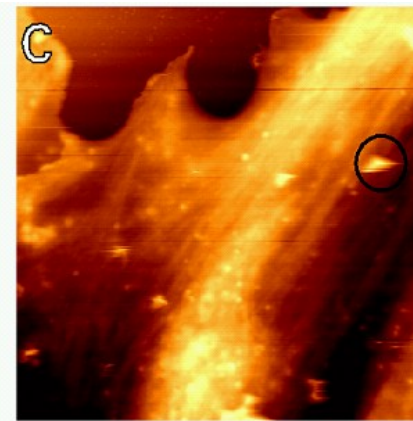
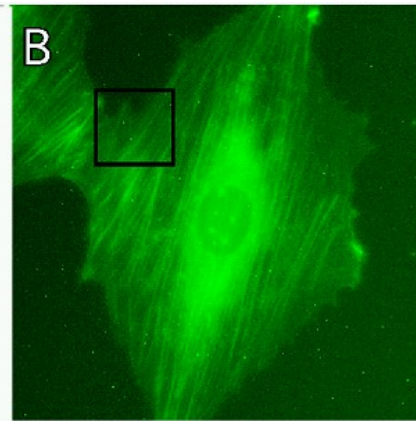
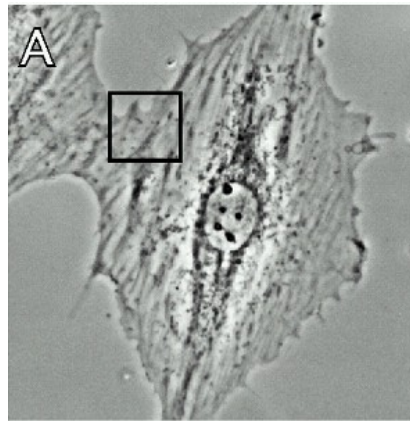


Mouse embryonic fibroblasts were labelled with anti-clathrin heavy chain antibody. To visualise clathrin coated pits a TRITC-labelled secondary antibody was added, and filamentous actin was stained using FITC-phalloidin. An overview of the cells as AFM topography (A), labelled actin (B), and an overlay of the two (C) is provided. A higher resolution AFM topography (D) was acquired as was a LSCM image (E) of an area exhibiting labelled clathrin at the cell surface. An overlay of the two images (F) shows that fluorescent label corresponds to pits at the cell surface. An electronic zoom of the topography from one relevant area (marked in F) is presented in (G).



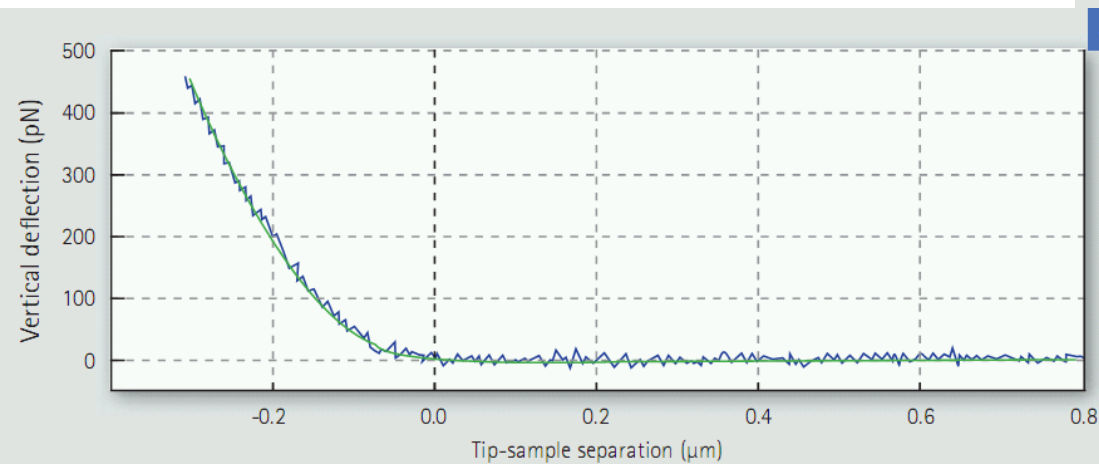
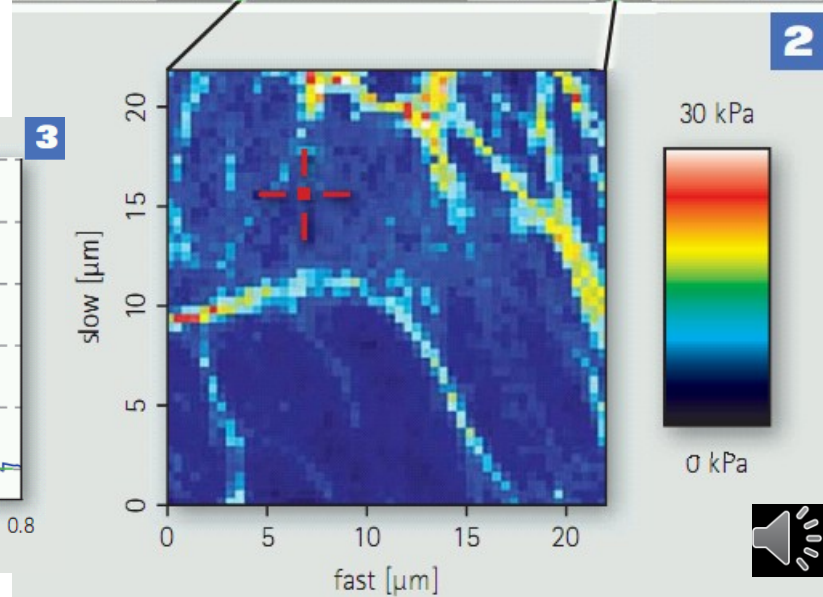
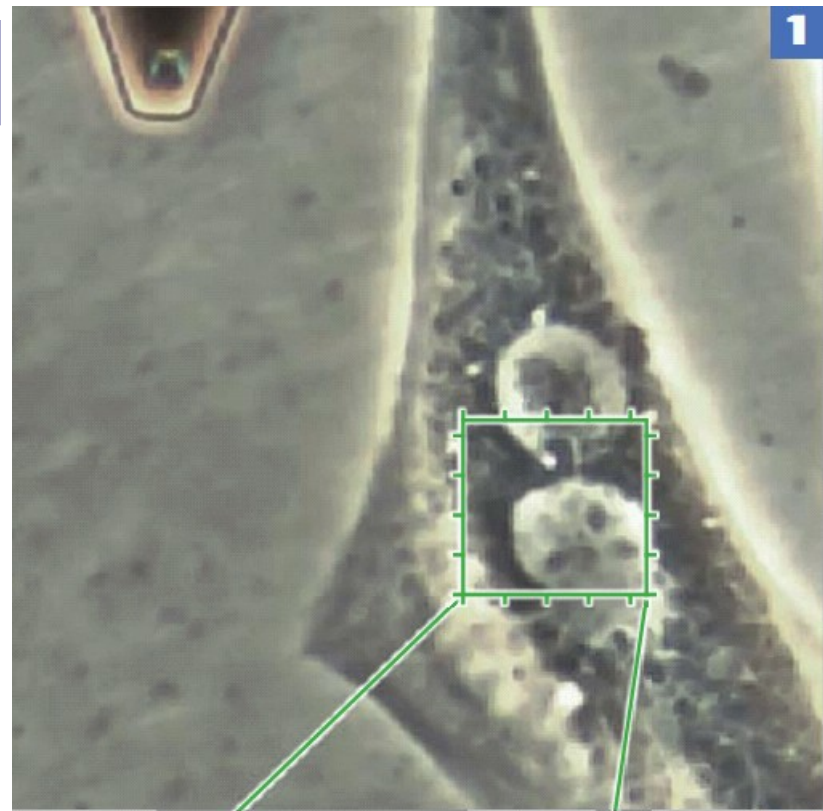
Oxidační stres

- účinek peroxidu vodíku na fibroblasty
- kontrola (A,B,C) / 30 min (D,E,F) a 1 h (G,H,I) působení 0.1 mM H₂O₂
- fázový kontrast
- epifluorescence - aktinová vlákna značená FITC-faloidinem
- AFM 20x20 μm

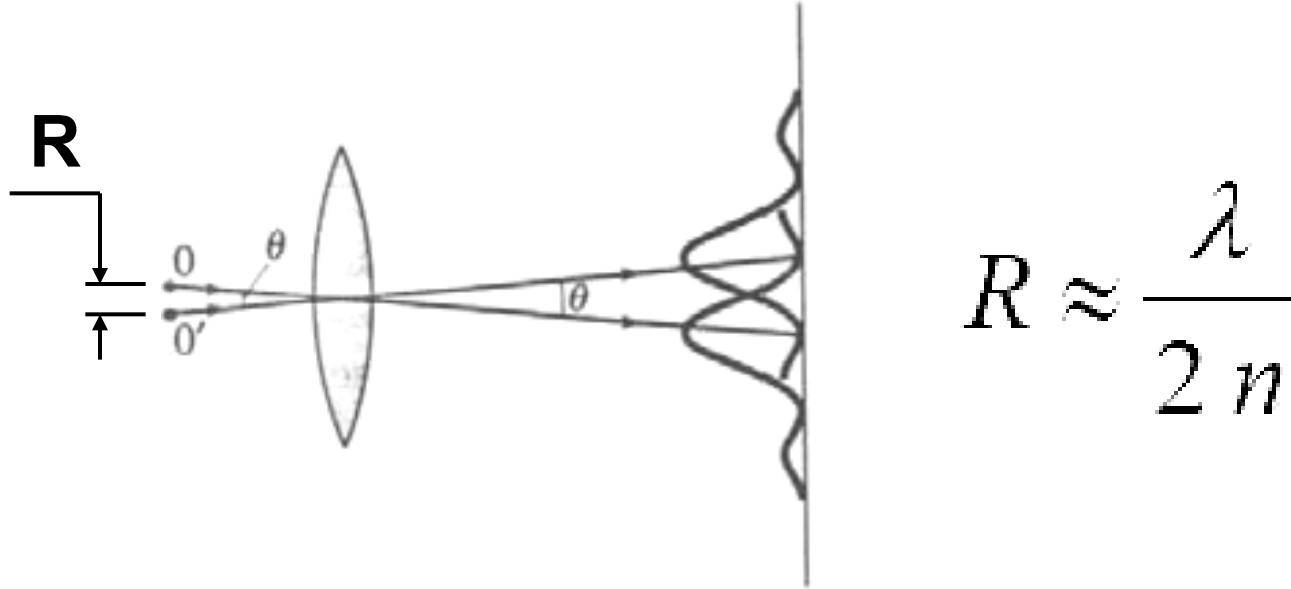


Mechanické vlastnosti

- multinukleární tubulární buňka, fázový kontrast
- mapa distribuce Youngova modulu ukazuje individuální stresová vlákna poblíž povrchu
- indentační křivka z oblasti označené křížkem



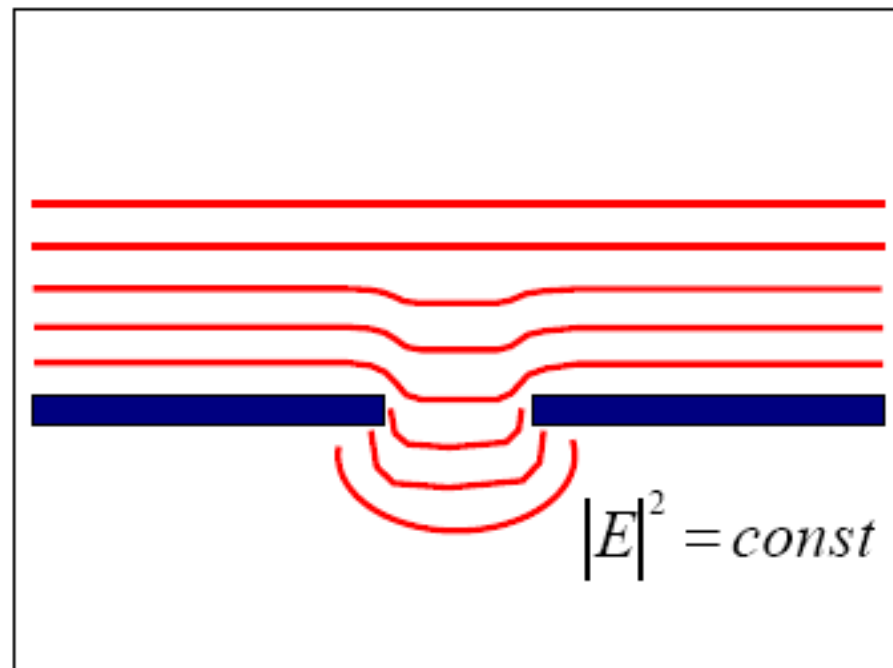
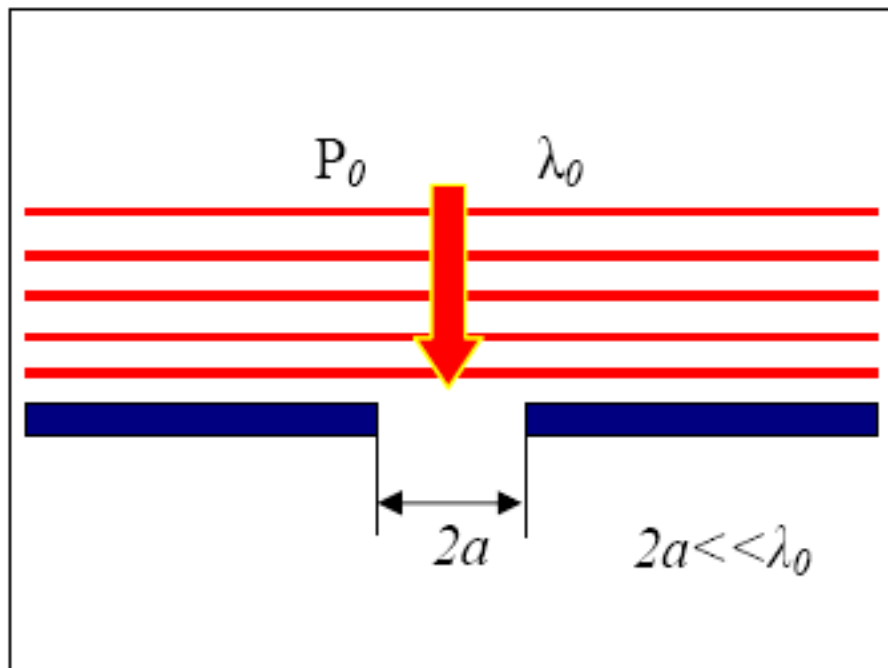
Difrakční limit optických technik



- 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



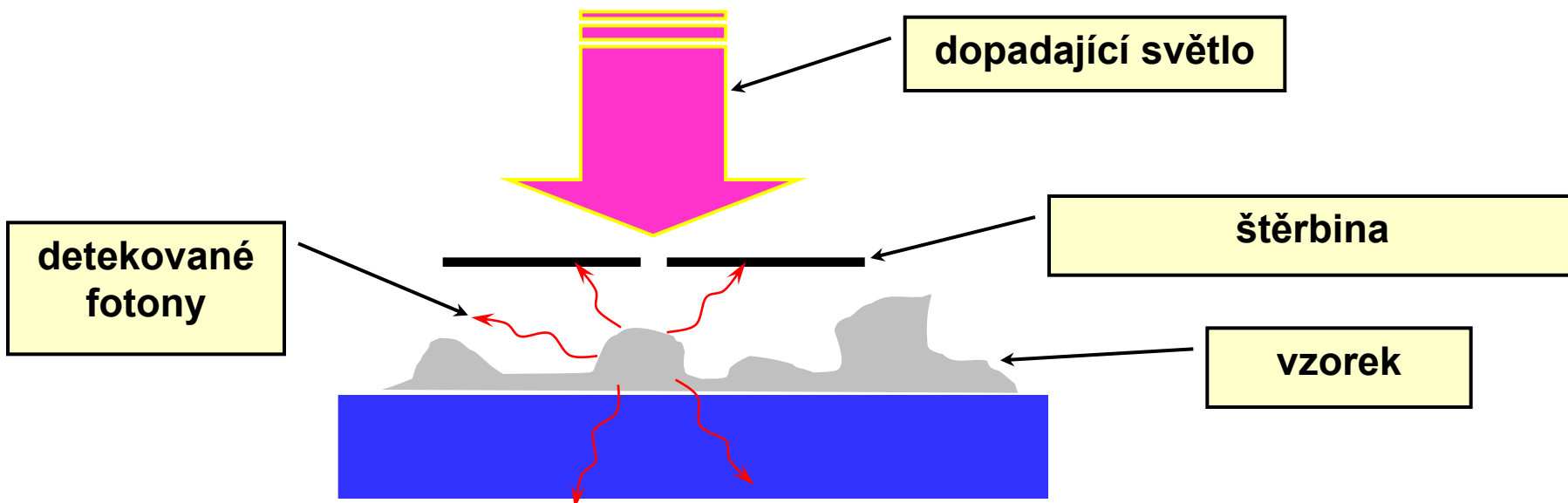
Efekty blízkého pole



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



Základy SNOM



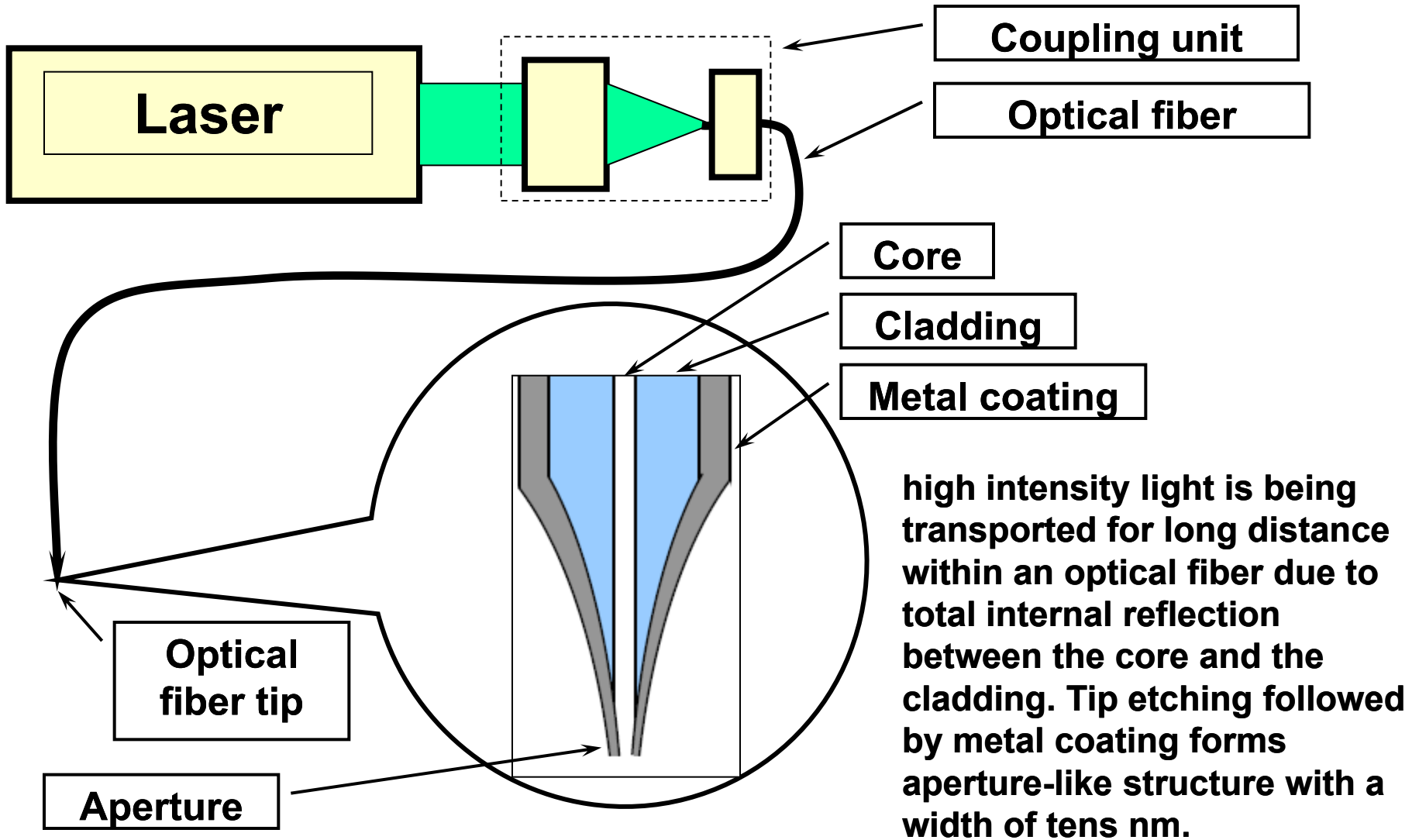
"sub-wavelength" štěrbina se přiblíží na několik nm k povrchu vzorku

generované fotony jsou zachyceny detektorem

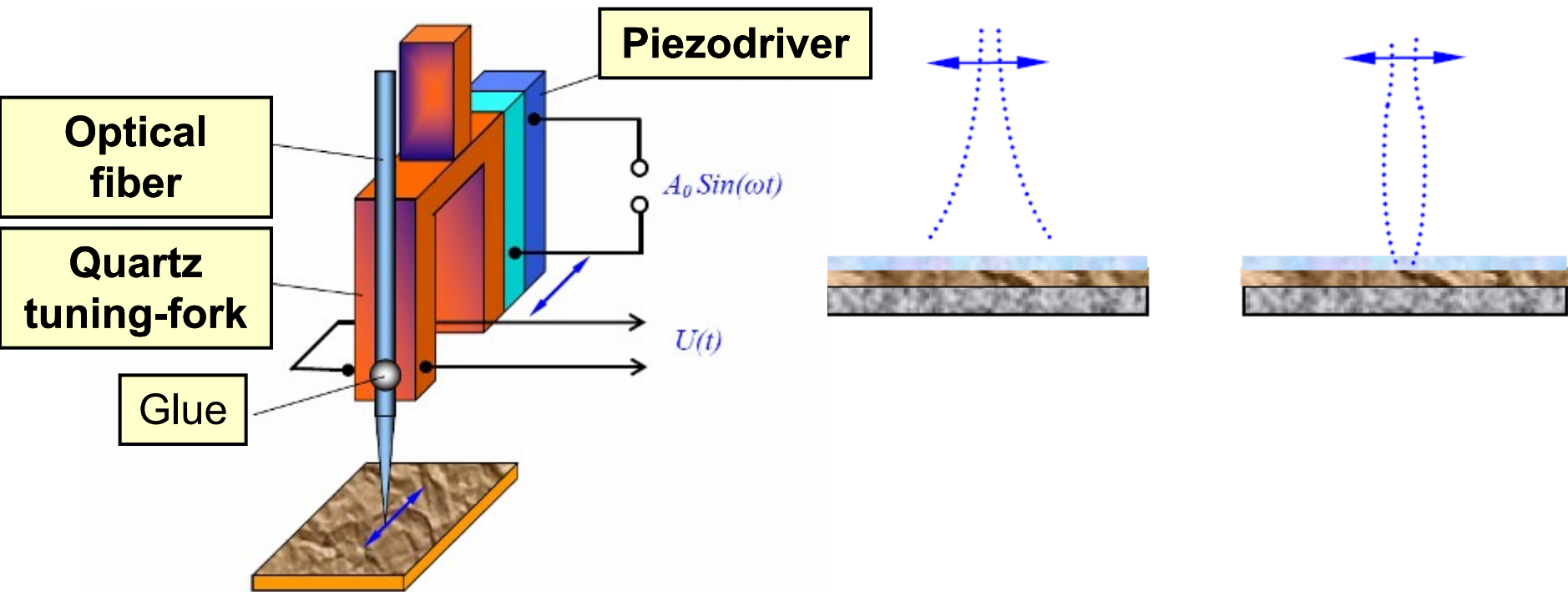
bod po bodu se skenuje 2D obraz povrchu s rozlišením kolem 1 nm.



Optické vlákno jako štěrbinina



Shear-force feedback control

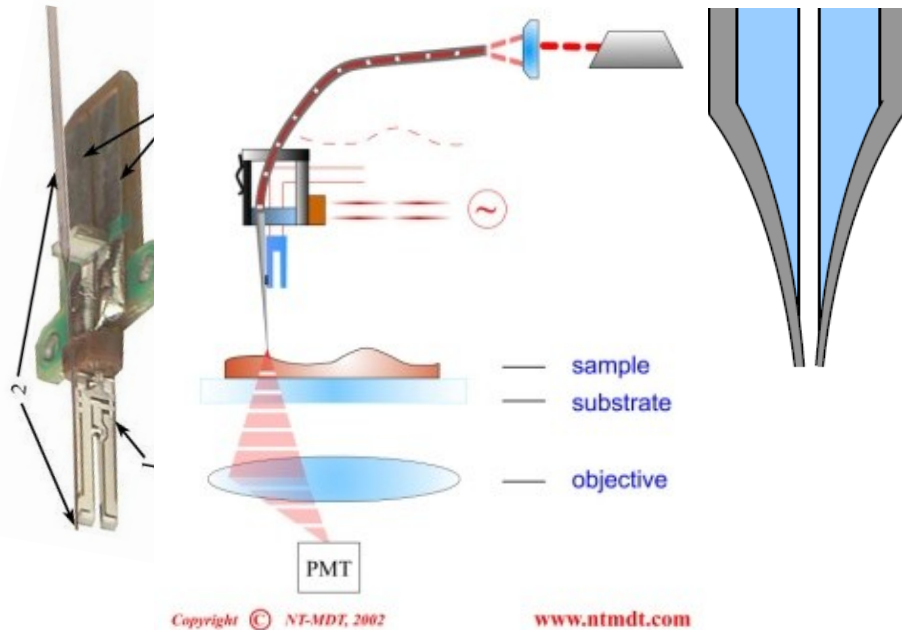


probe vibrates at resonance frequency of quartz tuning-fork. Amplitude and phase of such vibration significantly change when the probe tip arrives the closest proximity of the object surface. Feed-back control mechanism fixes parameters of new state providing precise height positioning of the tip. Thus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

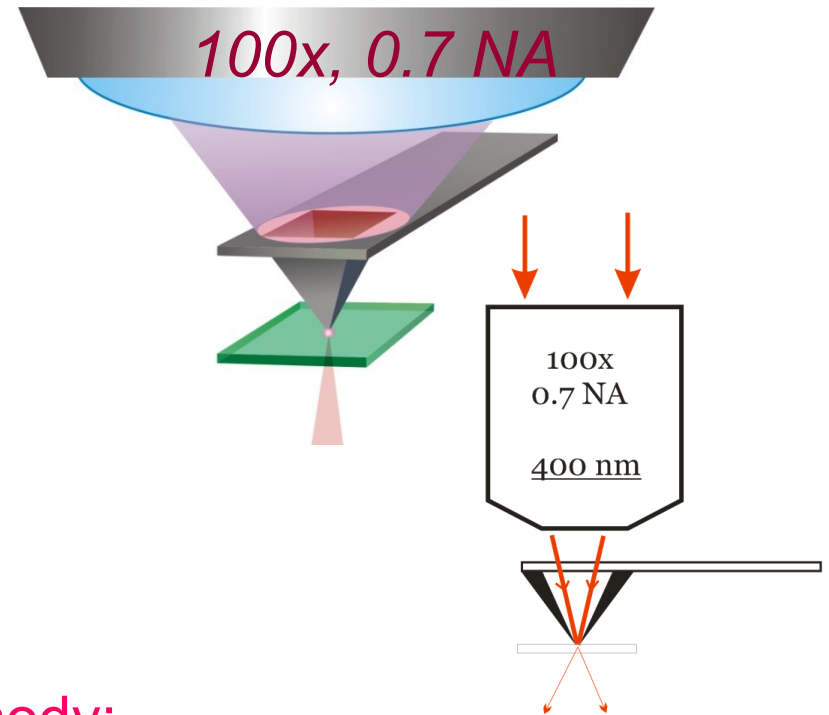


Realizace SNOM

opt. vlákno s otvorem (přilepené k ladicí vidlici)



křemíkové raménko s otvorem

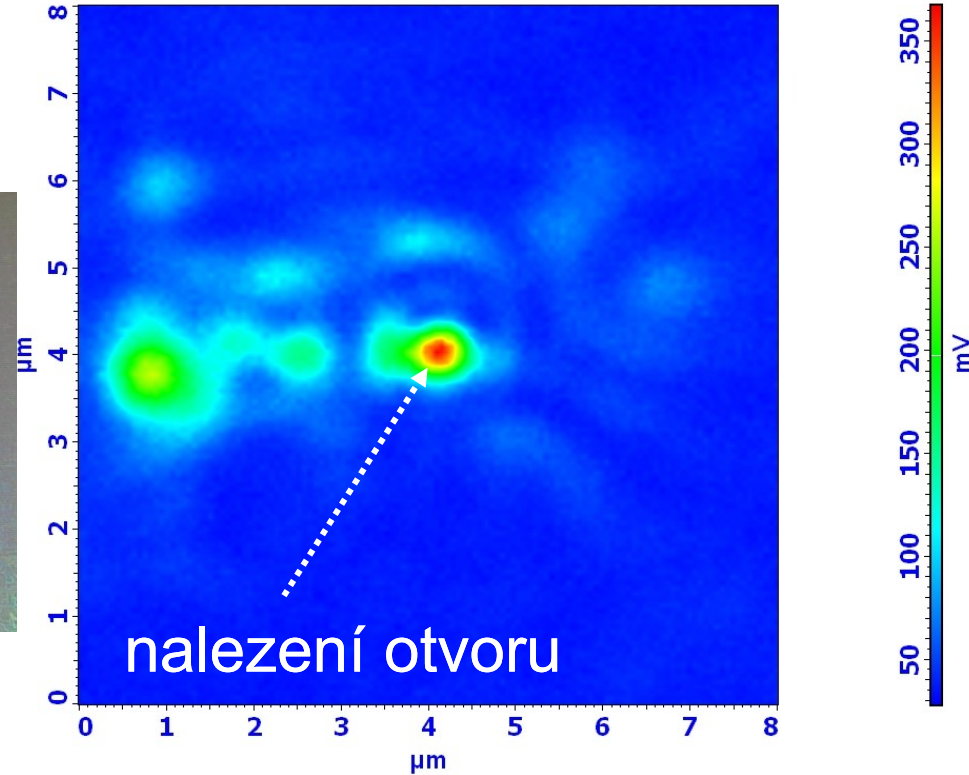
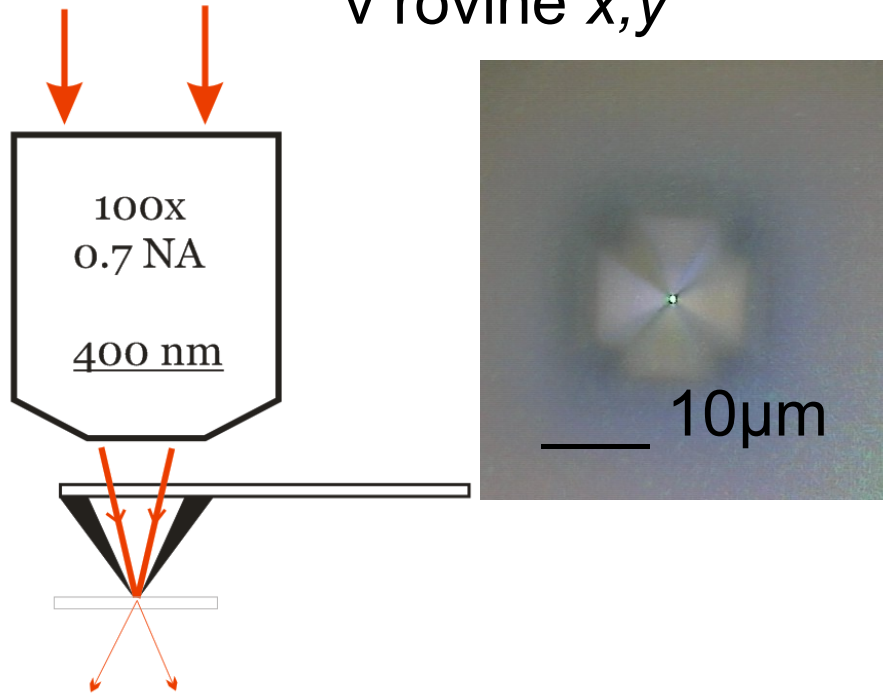


SNOM mody:
kolekce, transmise, reflexe

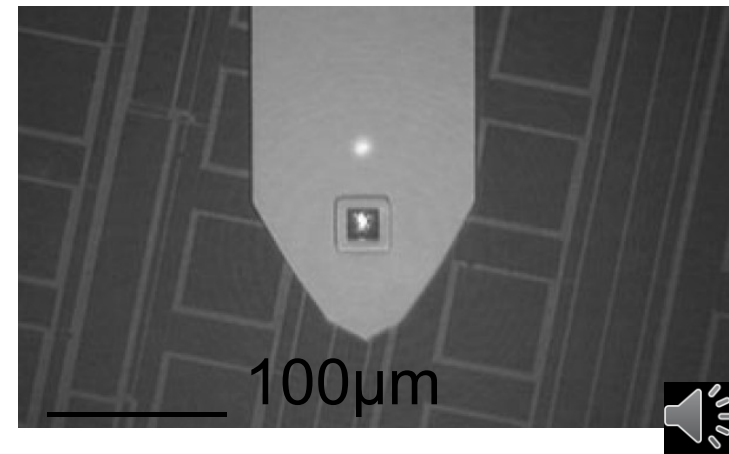


Nasměrování laser. spotu na otvor v kantilevru

laser. spotem je skenováno
v rovině x,y



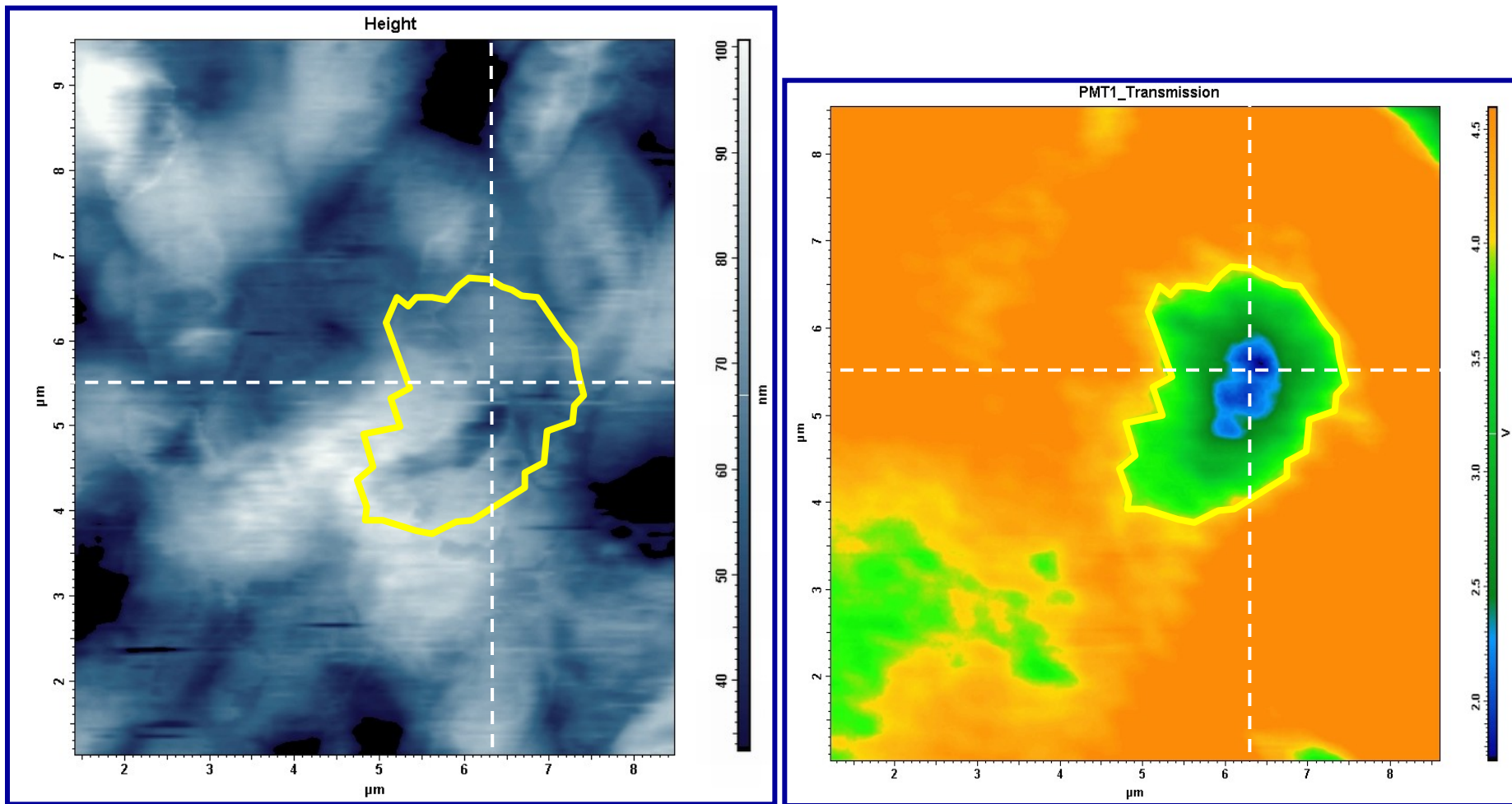
měří se procházející světlo - otvor v kantilevru se nalezne automaticky s přesností <math>< 10\text{ nm}</math>, následně se laserový spot (cca 400 nm velký) zaostří přesně na otvor - dosažení co nejvyšší prostupnosti



SNOM



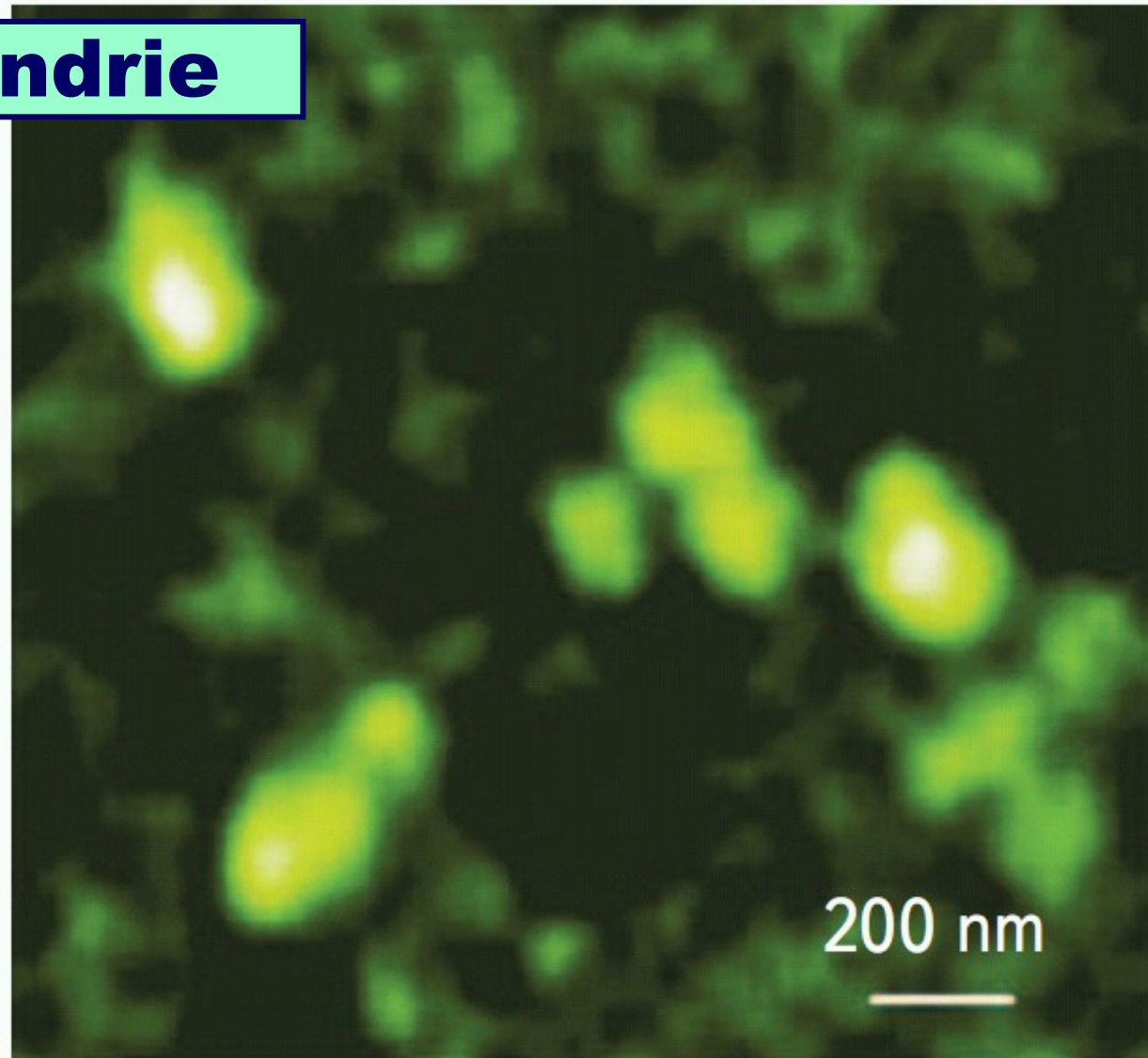
SNOM



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



Mitochondrie

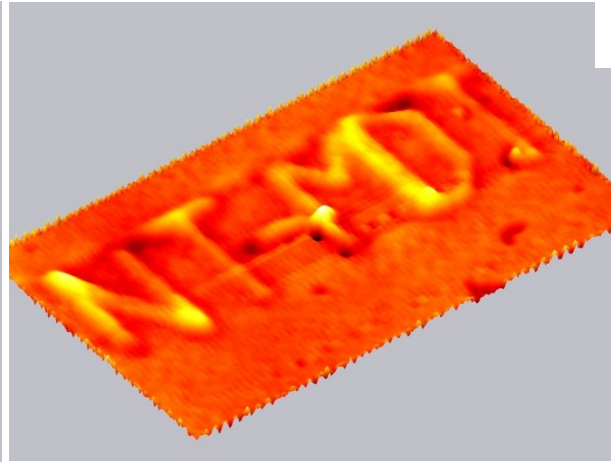
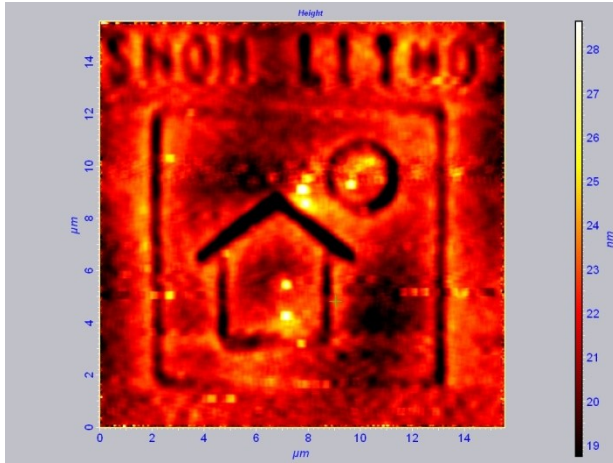


SNOM image of mitochondria dyed with FITC-labeled antibodies.



SNOM litografie

pozitivní fotorezist FP 380 na Si

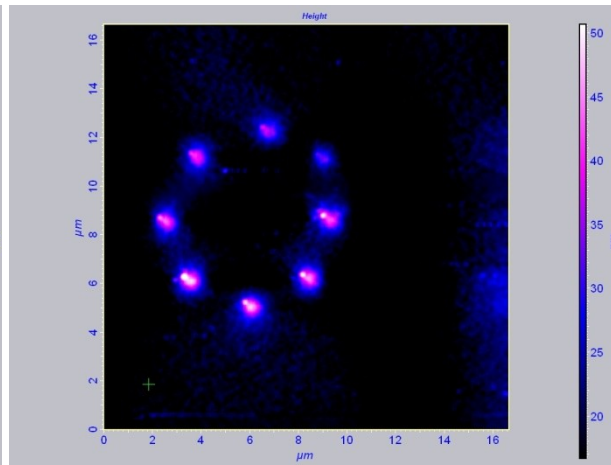
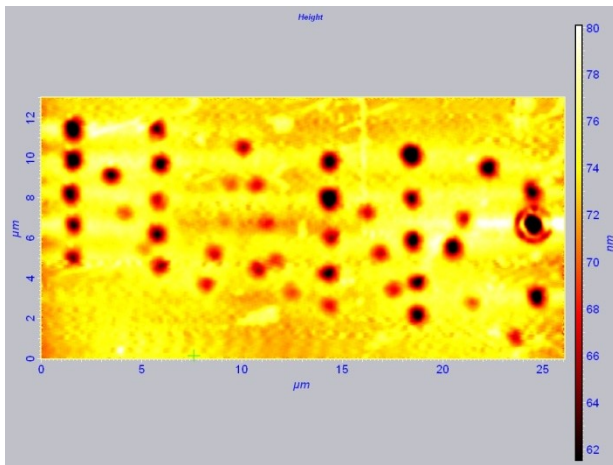


Ar laser 457-
514 nm

opt. vlákno

scanner control

feedback

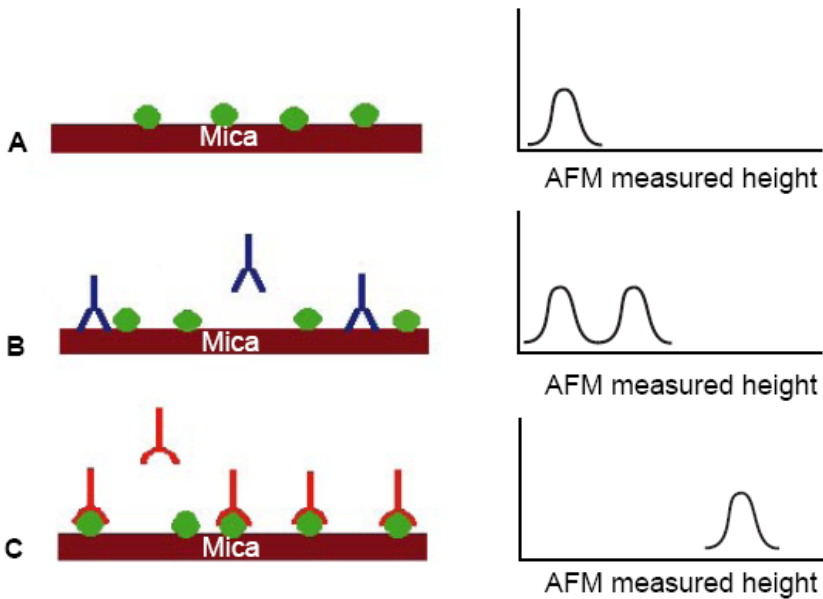


NFO
próba

fotorezist



Sledování biinterakcí

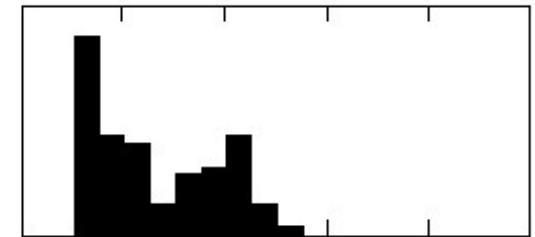


● Antigen Y Non-specific antibody Y Specific antibody

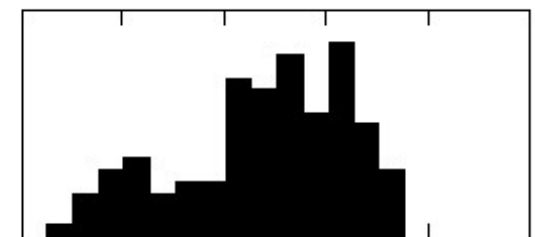
- tapping mod, image 500x500 nm
- histogram pro Z, x osa 0 až 5 nm



A. HSA



B. HSA exposed to IgG

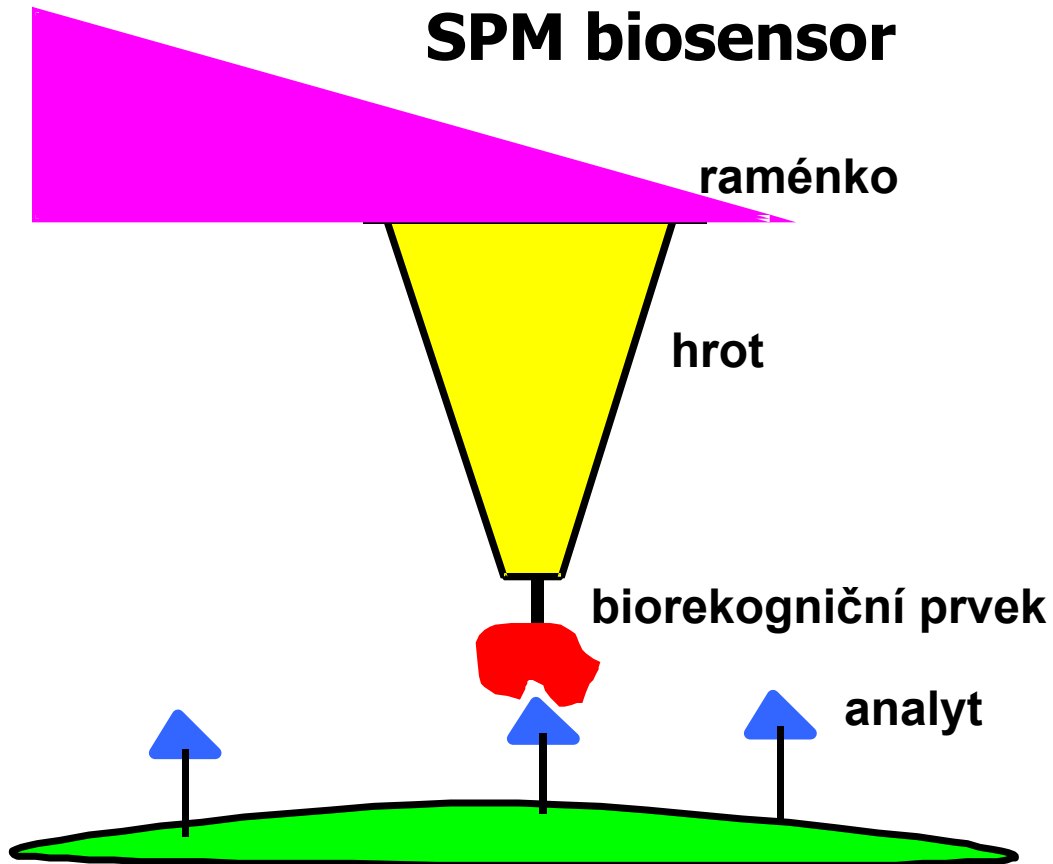


C. HSA exposed to α -HSA



Nanobiosensor

SPM biosensor

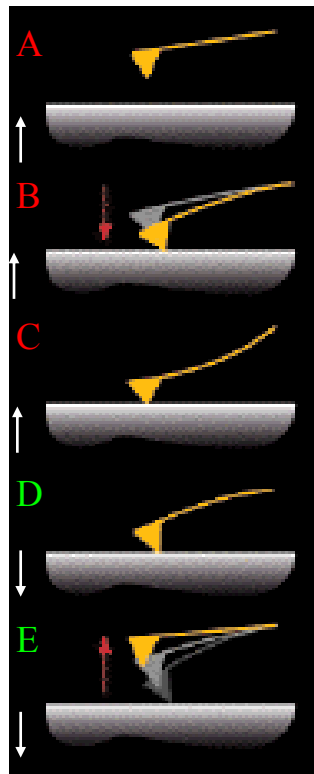


- charakterizace povrchů biosensorů
- hrot je možné modifikovat immobilizací vhodných biorekogničních molekul, čímž dostáváme biosensor teoreticky schopný detekovat jednotlivé molekuly analytu
- tento postup byl použit pro přímé měření síly potřebné k přerušení některých bioafinitních interakcí „roztržením“ 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 deflekce

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

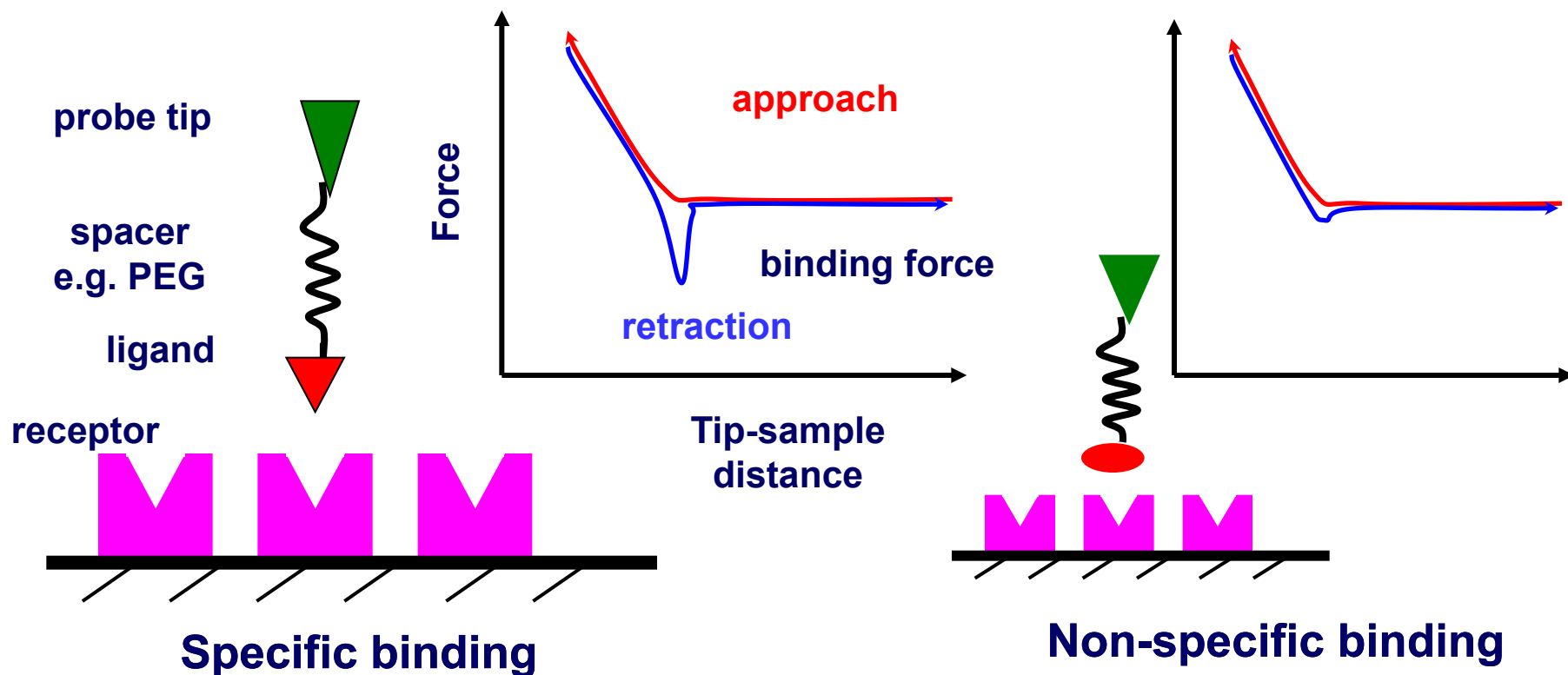
C došlo ke kontaktu s povrchem, zvětšuje se výchylka

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.



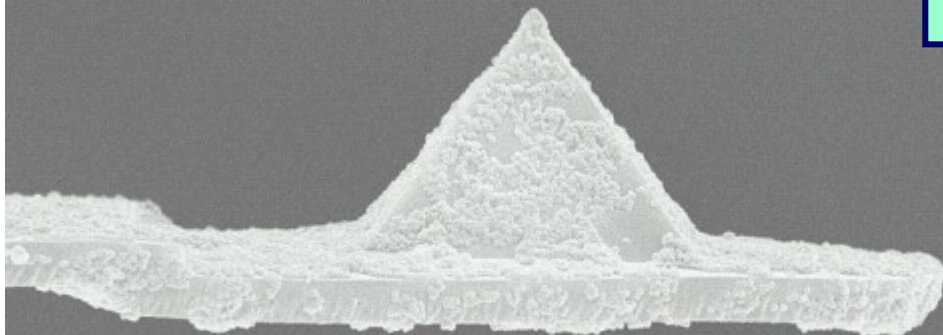
Ligand-receptor vazebné děje



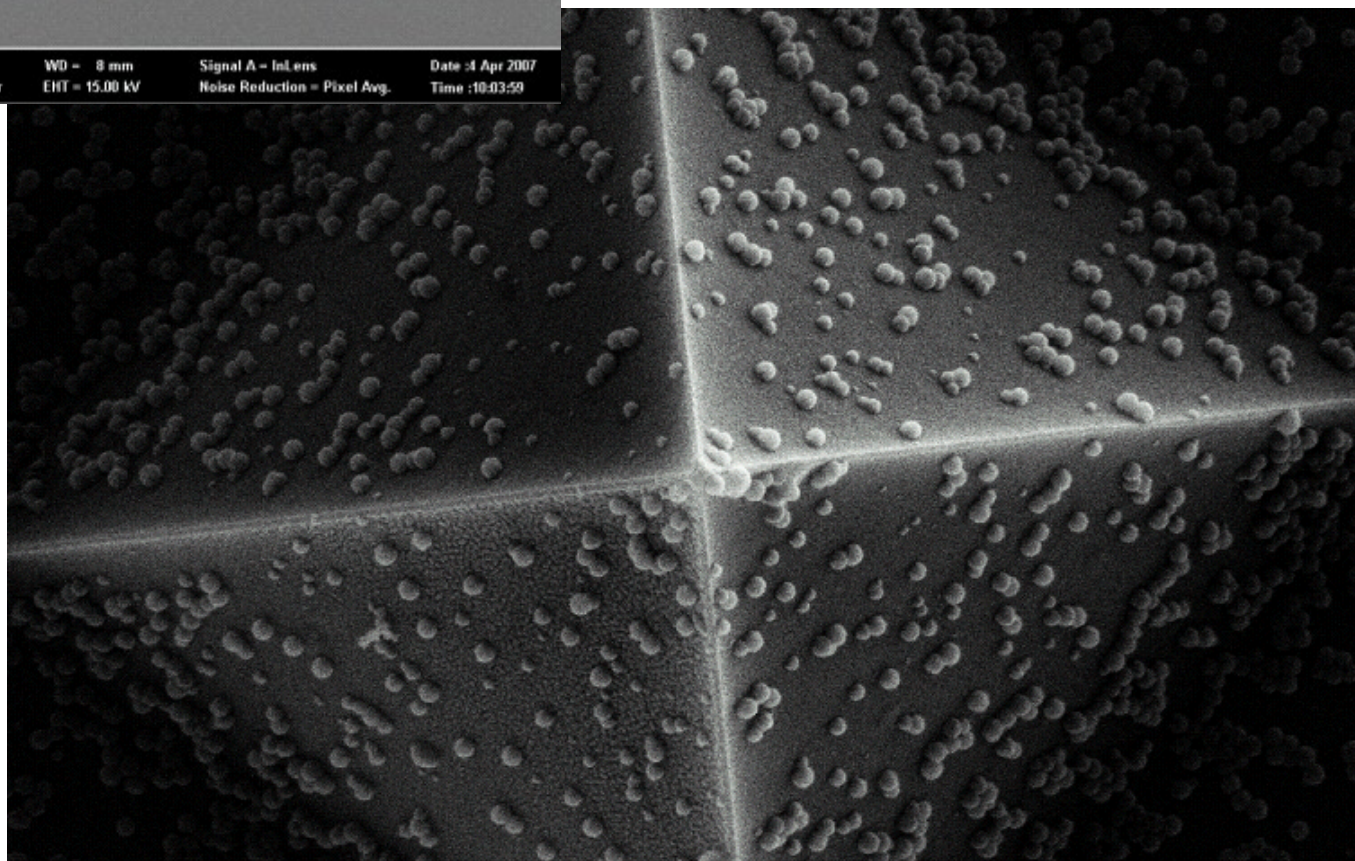
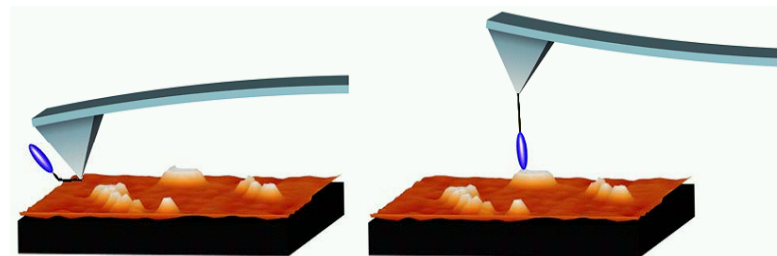
- v přítomnosti specifické interakce je pro "přetržení" vazby potřeba přídatná síla
- takto změřená síla charakterizuje danou biointerakci



Modifikované hroty

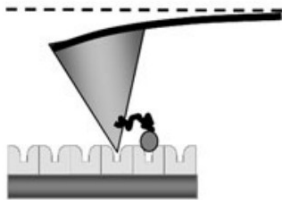
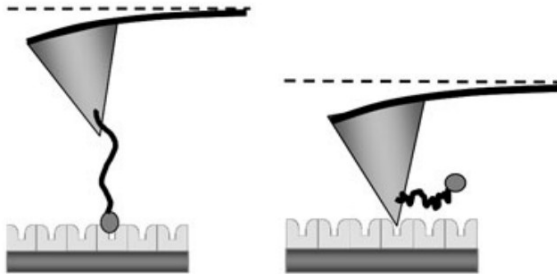


1540XB-27-08 2 μ m Mag = 20.00 K X System Vacuum = 5.57e-007 mBar WD = 8 mm Signal A = InLens Date : 4 Apr 2007 EHT = 15.00 kV Noise Reduction = Pixel Avg. Time : 10:03:59

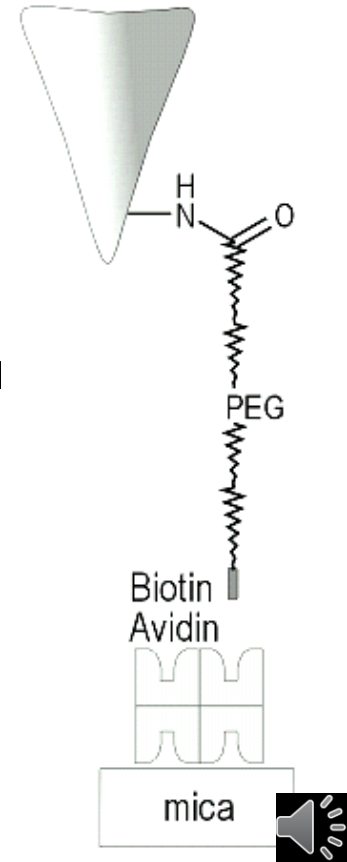
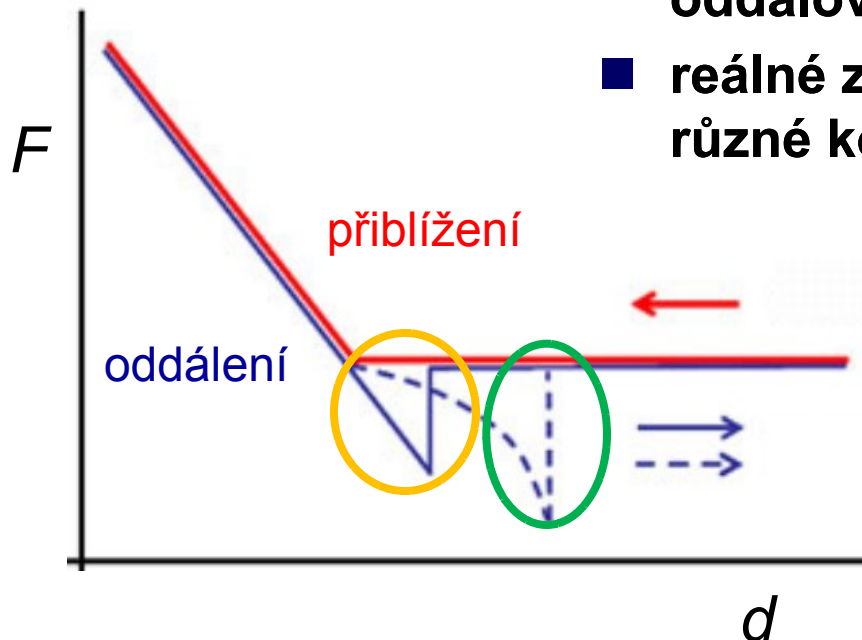


1540XB-27-08 200 nm Mag = 50.00 K X System Vacuum = 8.73e-007 mBar WD = 7 mm Signal A = InLens Date : 29 Apr 2007 EHT = 10.00 kV Noise Reduction = Pixel Avg. Time : 15:11

Biointerakce avidin - biotin



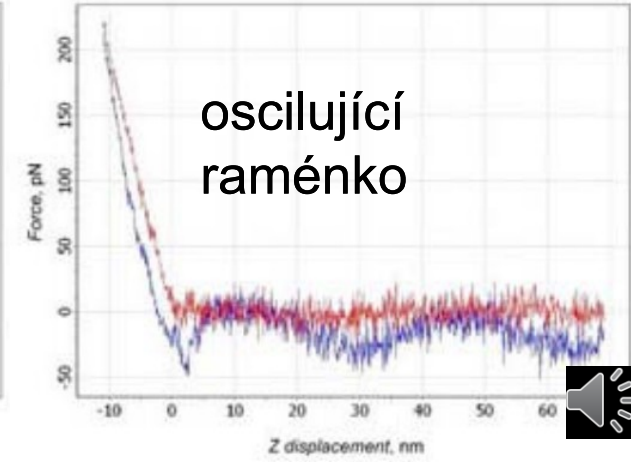
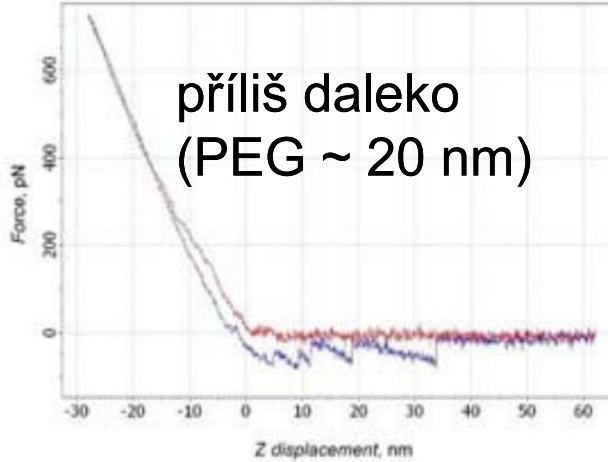
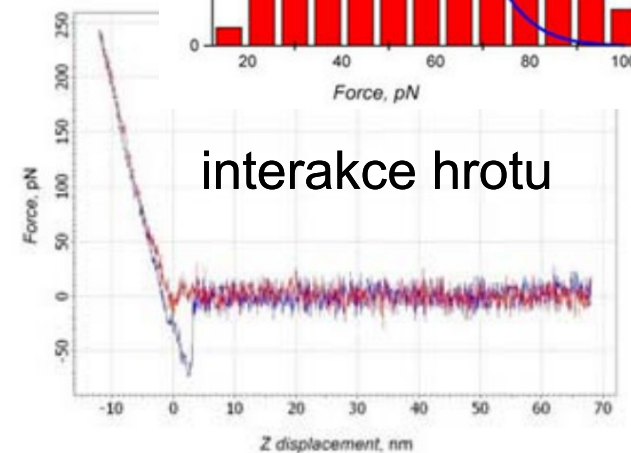
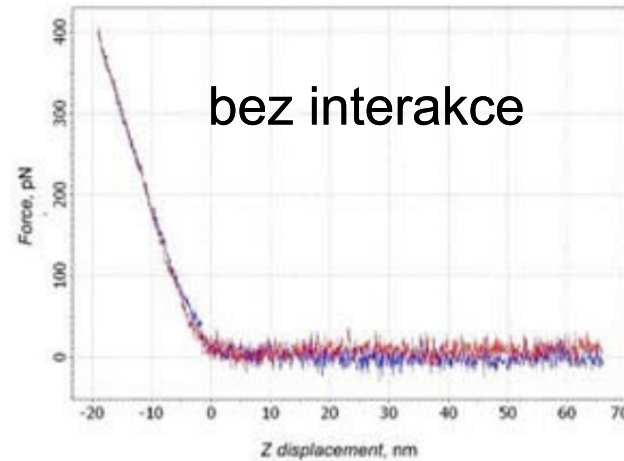
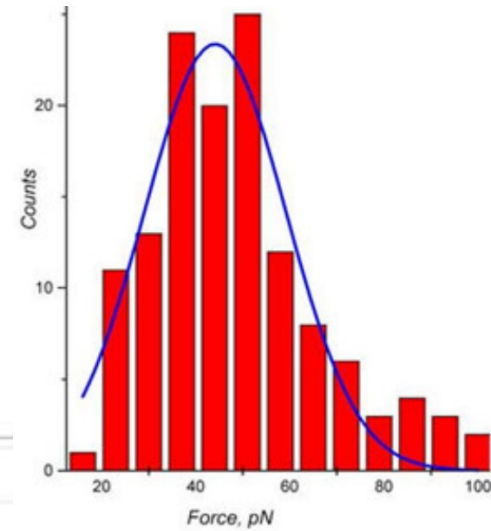
- ligand na hrot vázán přes flexibilní můstek (PEG)
- existuje několik způsobů interakce se vzorkem – pouze ligand (**specificky**), pouze hrot (**nespecificky**), kombinace obou
- oba děje se charakteristicky projeví na Fd křivce ve fázi oddalování (retrakce)
- reálné záznamy obsahují různé kombinace obou průběhů



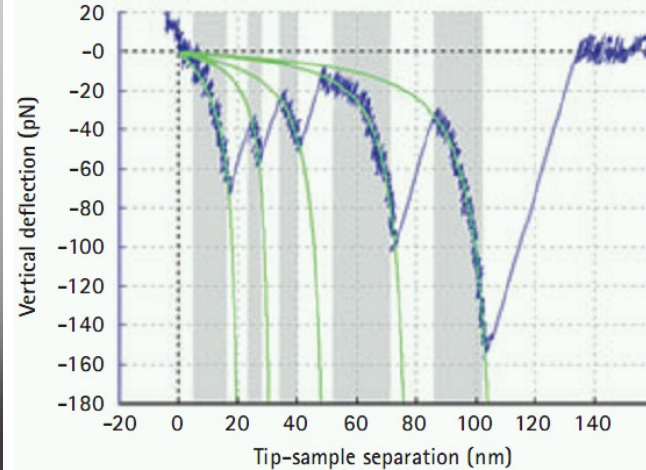
Experimentální F_d křivky

■ možné průběhy zahrnují:

43 ± 15 pN

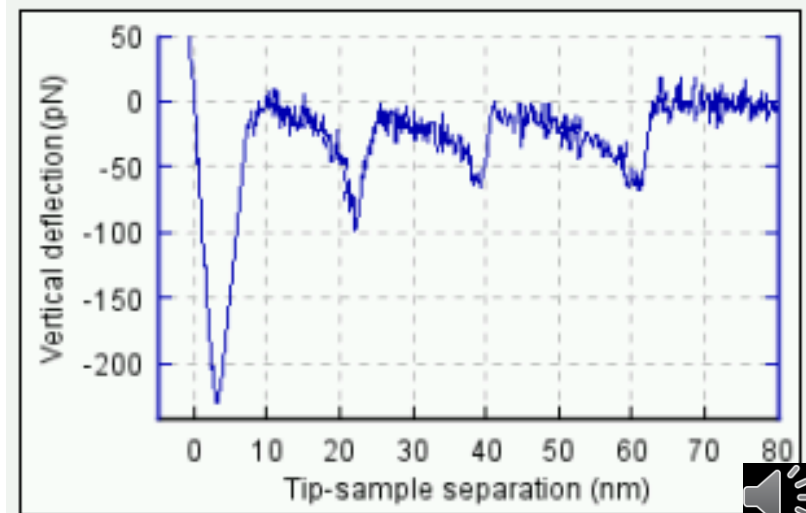


Automatizace Fd měření



JPK Instruments

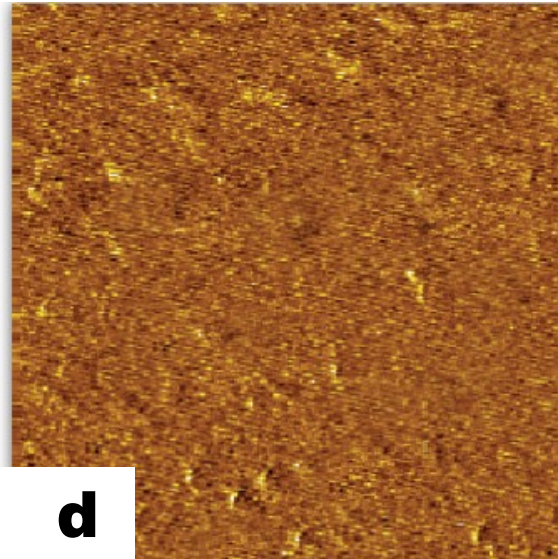
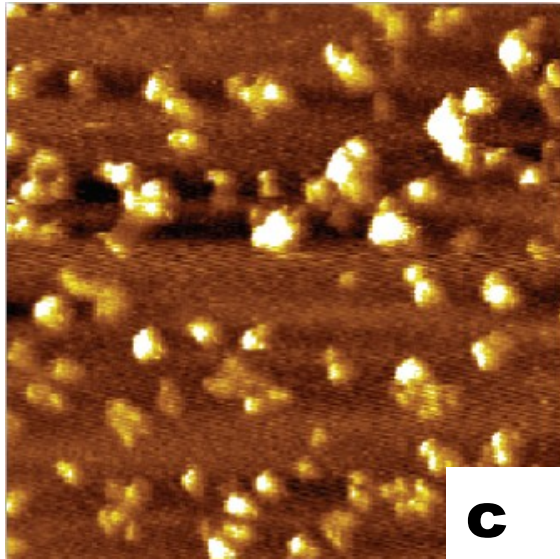
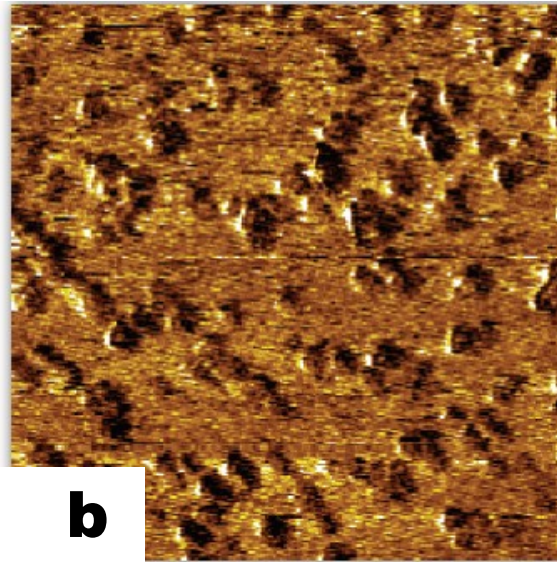
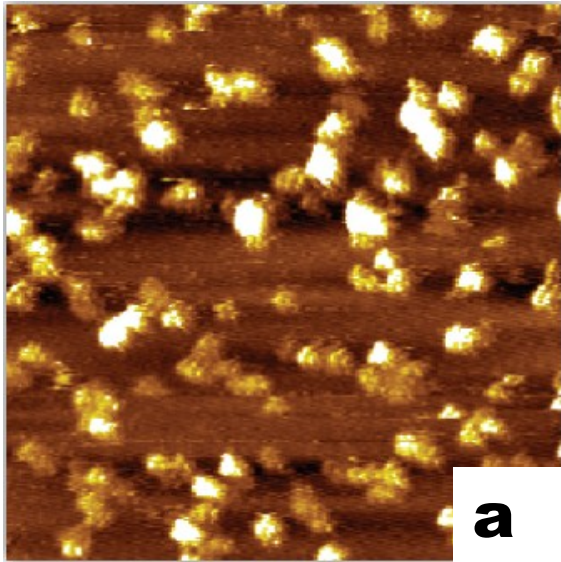
- ForceRobot - automatický systém na záznam křivek silové spektroskopie
- automatické nastavení laseru a detektoru
- kompenzace driftu raménka s hrotem
- 80 tis. Fd křivek za den



Spektroskopické techniky



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
- $1\mu\text{m} \times 1\mu\text{m}$



Interakční síly změřené AFM

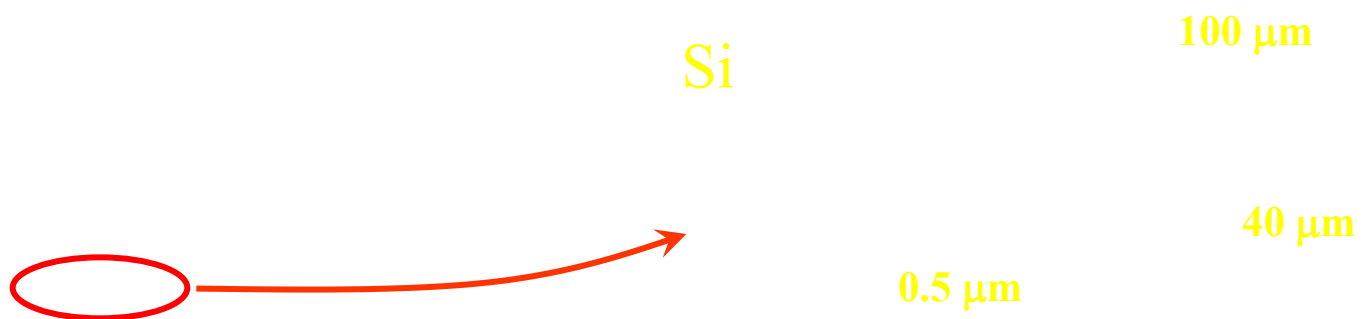
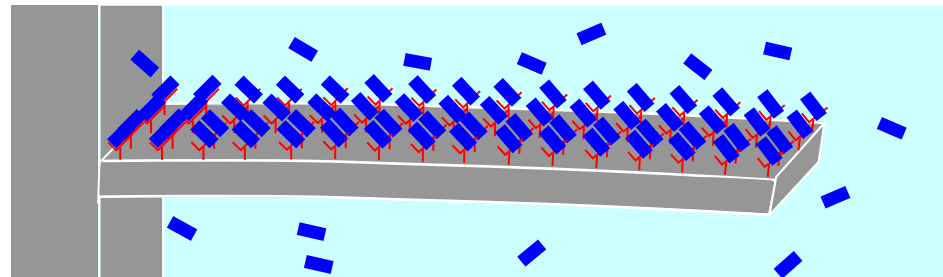
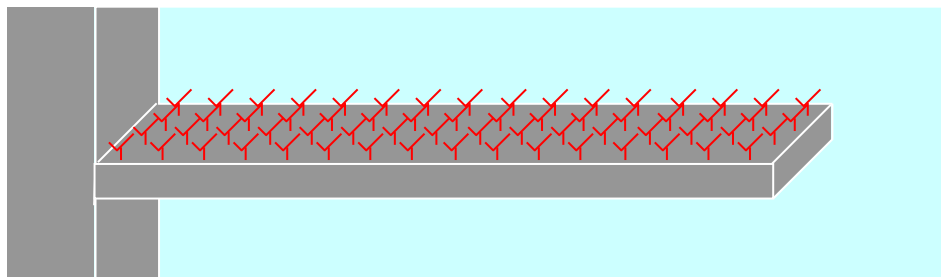
Interakce	Síla (pN)	ΔG (kJ/mol)	ΔH (kJ/mol)
avidin - biotin	160 ± 20	60	90
streptavidin - biotin	260 ± 120	77	134
anti biotin IgG - biotin	240 ± 20	variabilní	variabilní
(ACTG) ₅ - (CAGT) ₅	1500 ± 200	117	430

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

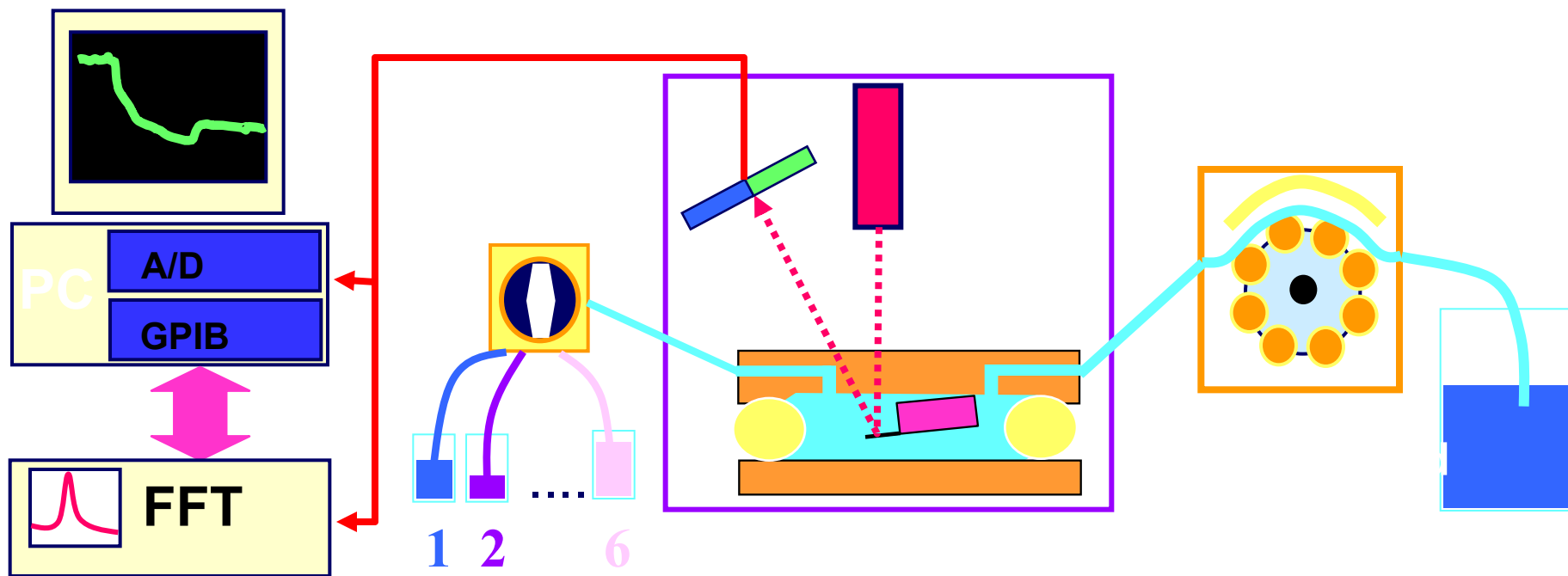


Mikrokantilevry jako biosensory

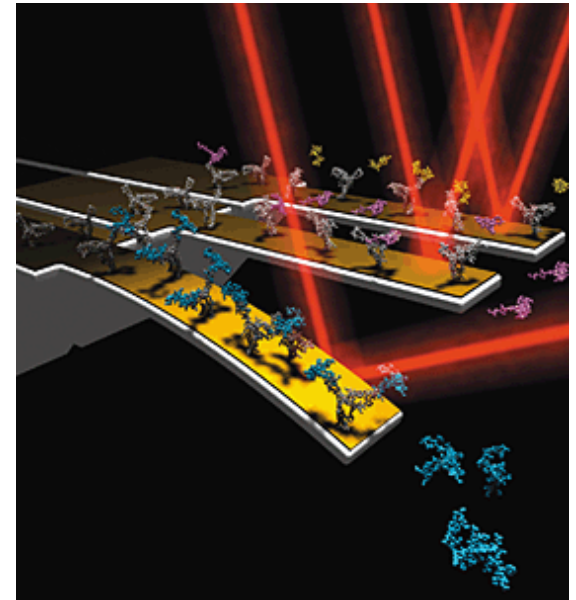
mechanický převodník – ohýbá se v důsledku rozdílného povrchového napětí na protilehlých stranách



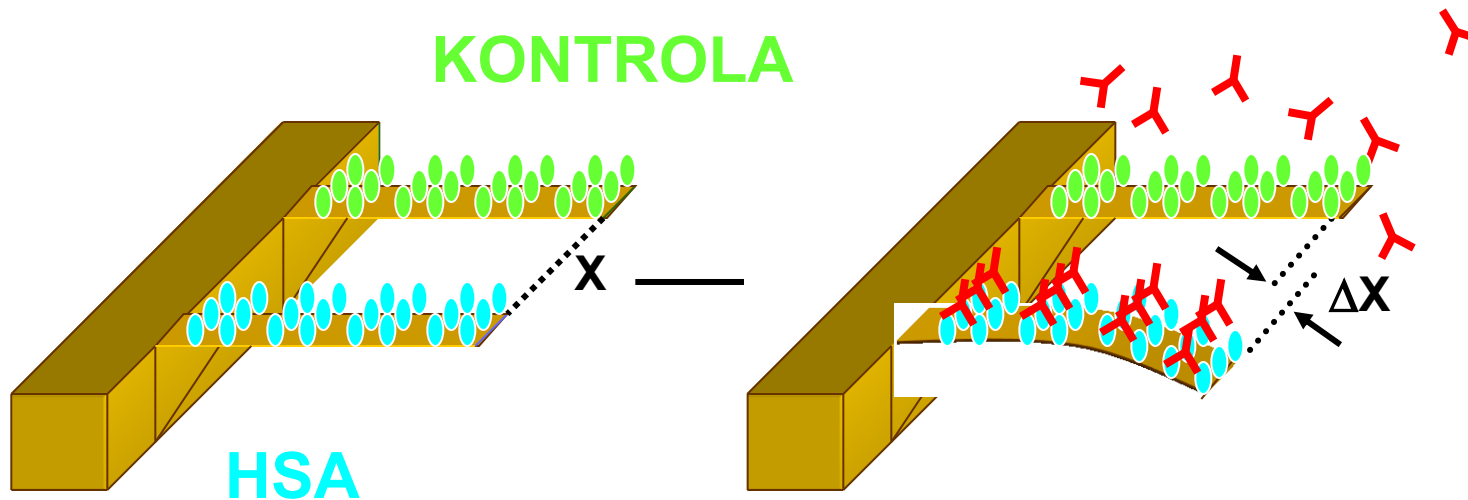
Experimentální uspořádání



Diferenciální uspořádání

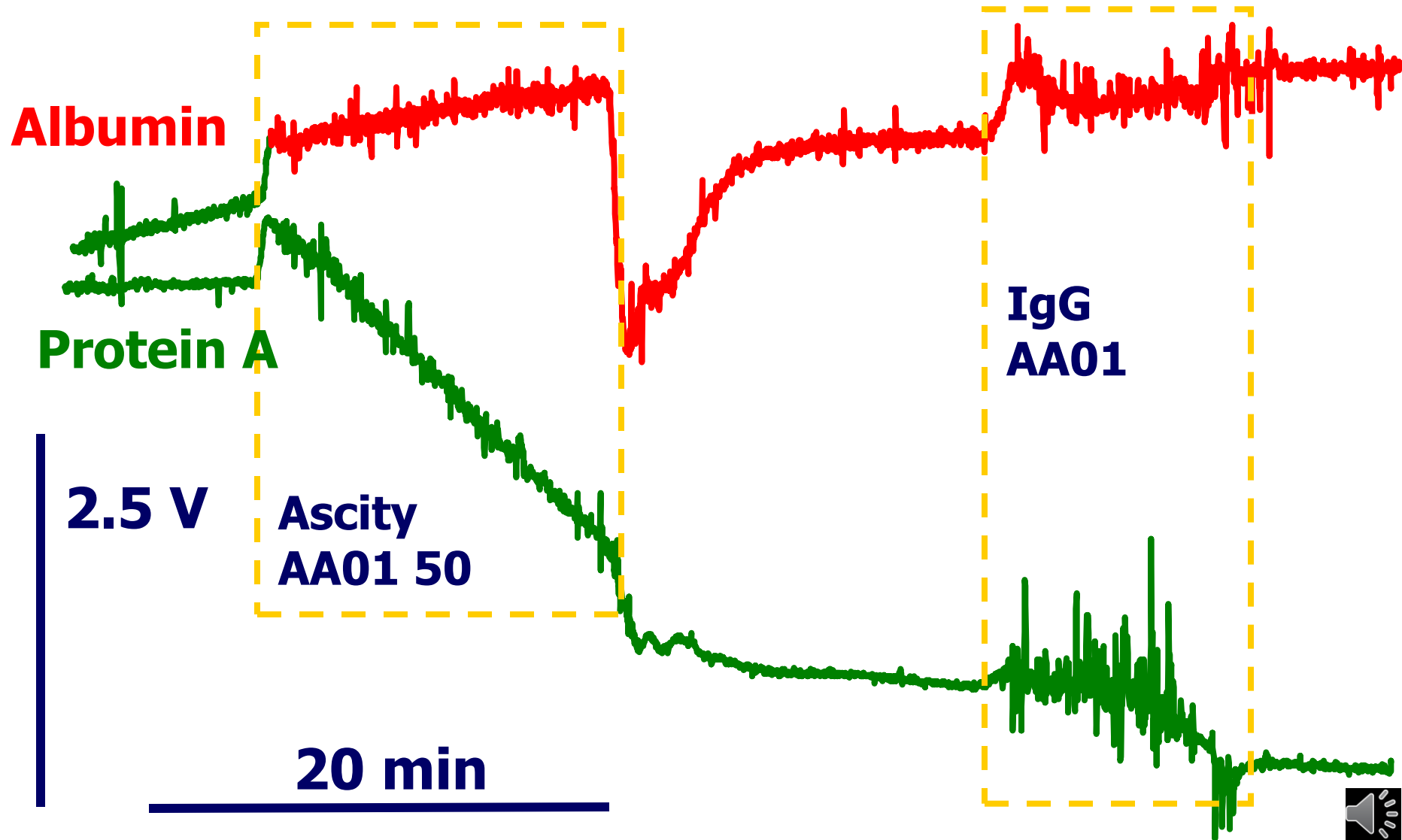


korekce nespecifické vazby

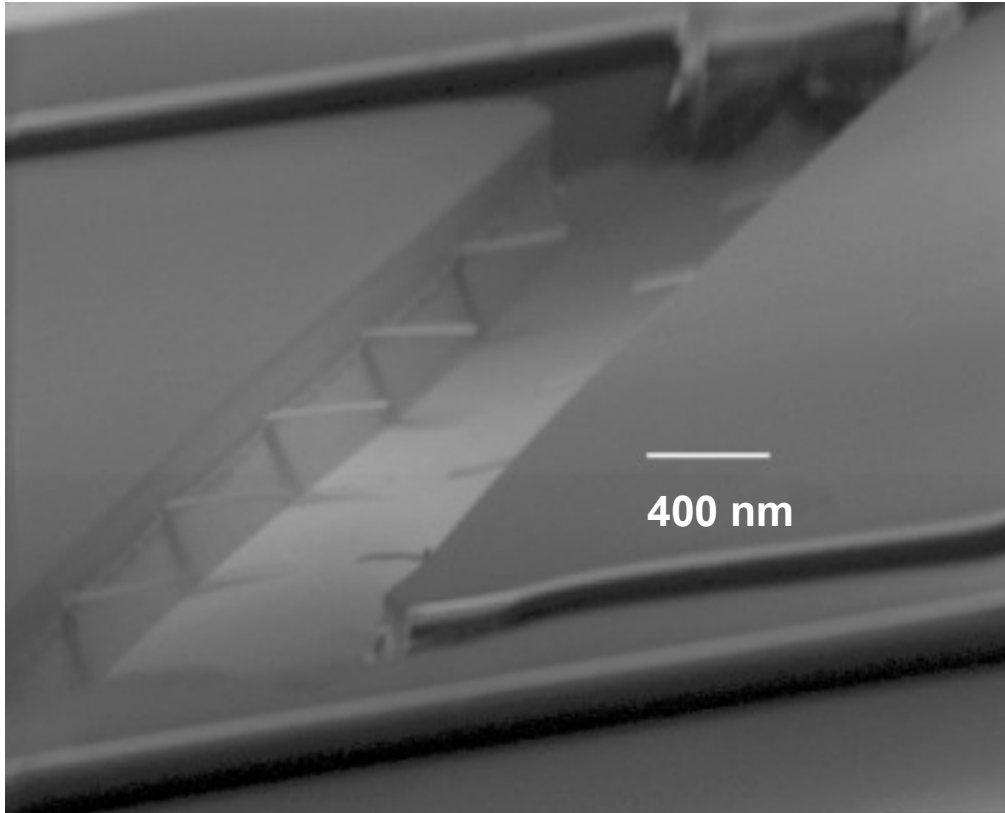


Diferenciální měření

kantilevry modifikované albuminem a Proteinem A

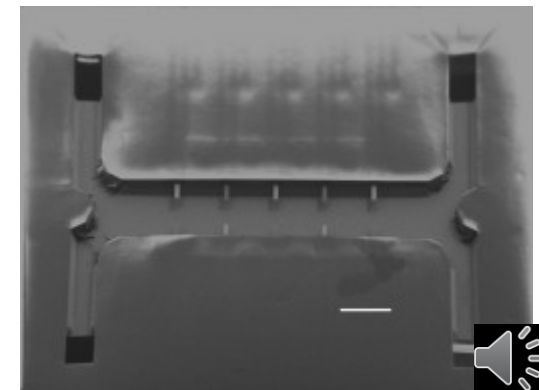


Integrovaný mikrobiosensor



- 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

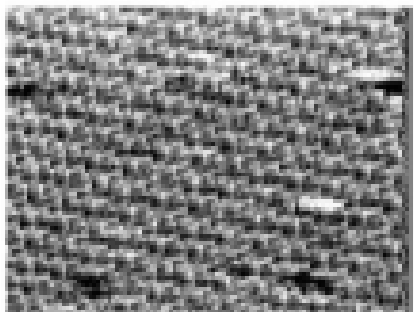
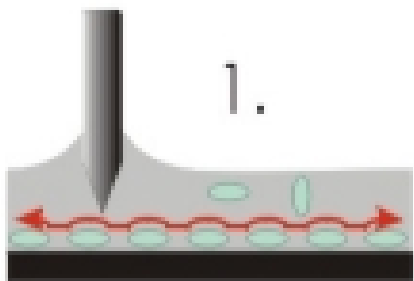


Scanning Probe Lithography

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

Scannen

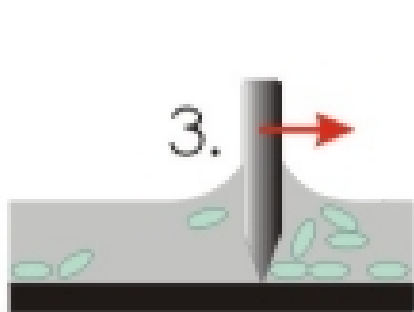
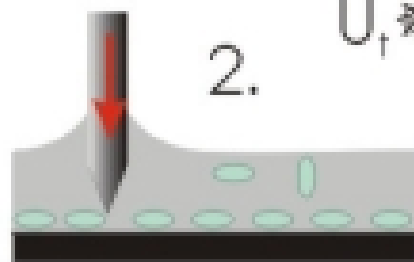
1.



Muster schreiben

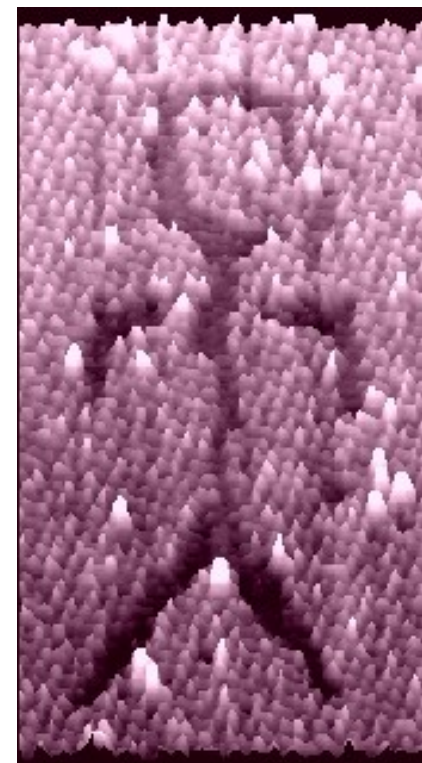
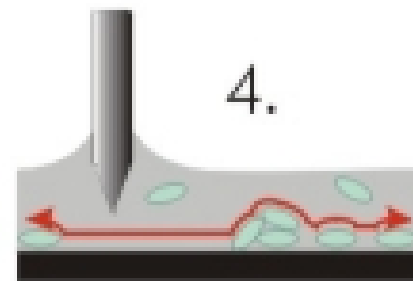
2.

U_1^*

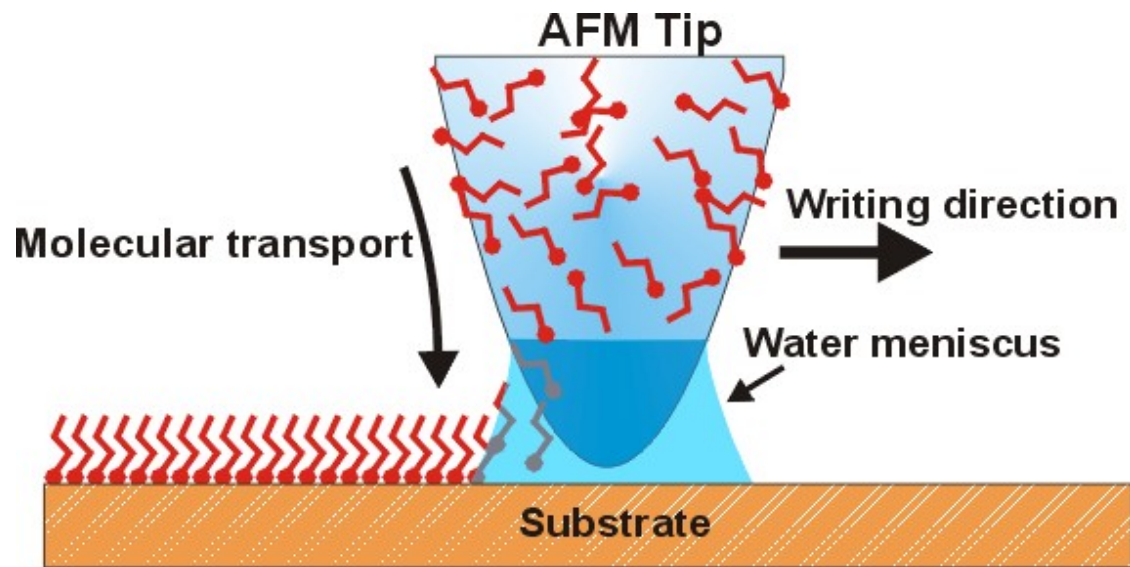


Scannen

4.

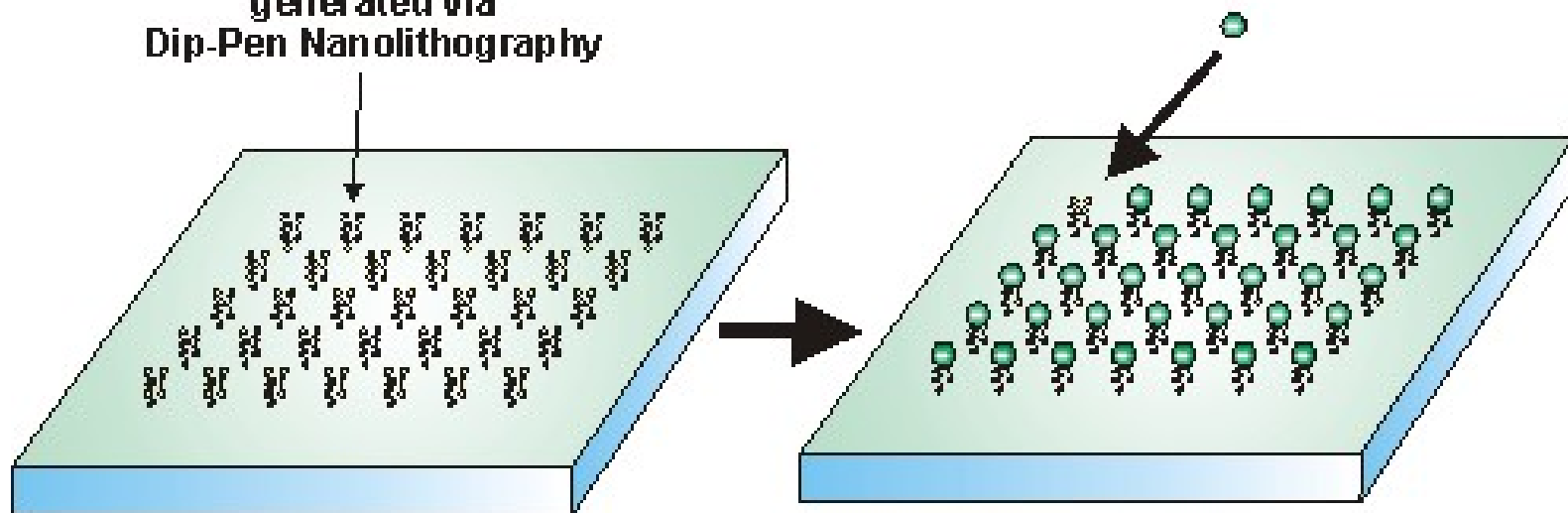


AFM dip pen lithography



Molecular Patterns generated via Dip-Pen Nanolithography

Specific binding of nanostructures

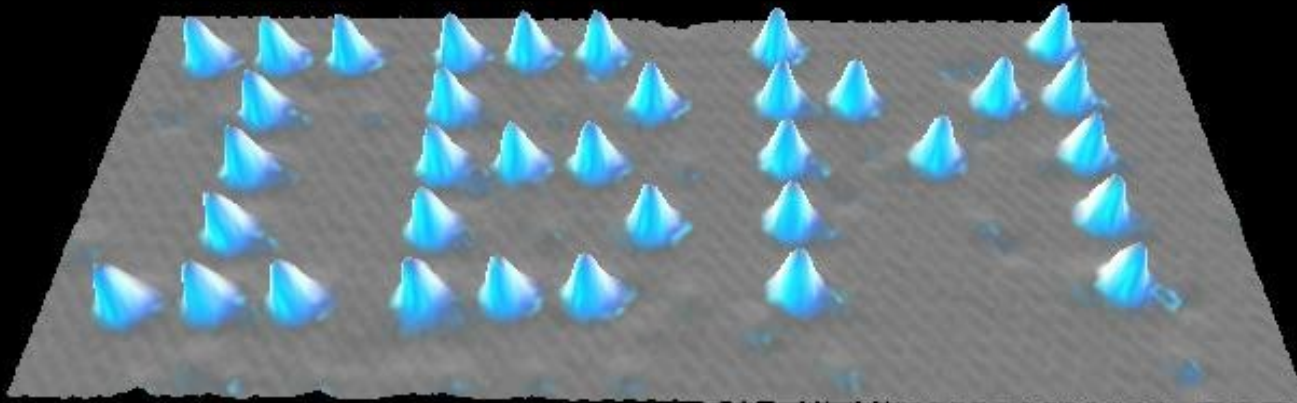


SPM Lithography



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

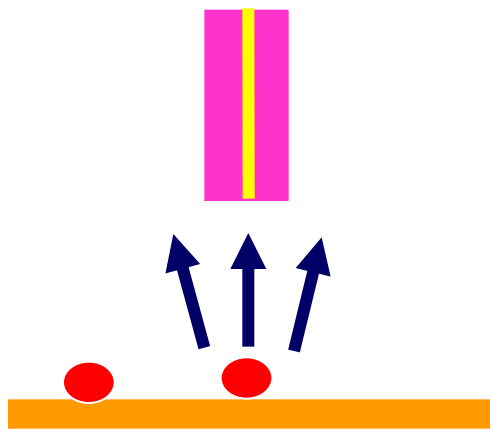
Scanning electrochemical microscopy

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

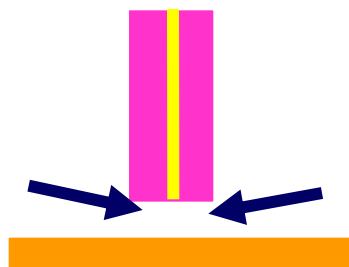
Způsoby činnosti:

generující substrát

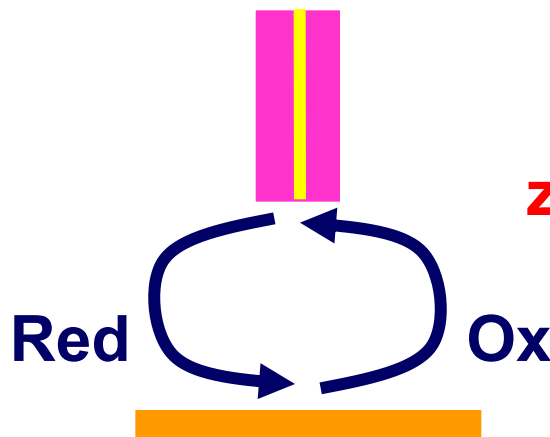
(např. oxidasa \rightarrow H_2O_2)



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



blokovaný přenos
 \rightarrow pokles proudu I



zpětná difúze
 \rightarrow nárůst I

