Wytwarzanie mikromacierzy białkowych

Cel ćwiczenia:

1. Zapoznanie się z metodami pozycjonowania białek.
2. Wytworzenie za pomocą druku mikro-kontaktowego mikro-macierzy białek.
3. Obrazowanie macierzy białkowych technikami mikroskopowymi: mikroskopia fluorescencyjna i skaningowa.
4. Analiza ilościowa otrzymanych wyników.

Zagadnienia:

1. Białka- budowa, struktura i funkcje.
2. Metody pozycjonowania biomolekuł- wiązania chemiczne, adsorpcja fizyczna, oddziaływania specyficzne.
3. Macierze białkowe- rodzaje i zastosowania.
4. Zjawisko fluorescencji.
5. Zasada działania mikroskopów fluorescencyjnego i AFM.
6. Techniki miękkiej litografii- druk mikro-kontaktowy (wpływ geometrii pieczątki).
7. Analiza obrazów AFM oraz fluorescencyjnych metodą Fouriera.

Materiały:
Lektyny znakowane fluorescencyjnie, aldehyd glutarowy, pieczątki PDMS, szkiełka mikroskopowe, 3-aminopropyltrietoksy silan (APTES)

Przebieg ćwiczenia:
Spotkanie I:

- Kolokwium
- przygotowanie podłoży oraz roztworów
- wytworzenie macierzy białkowych

Spotkanie II:

- obrazowanie macierzy białkowych przy równoczesnym użyciu mikroskopu AFM oraz fluorescencyjnego.
- Analiza zarejestrowanych obrazów.

Preparatyka:

- Roztwory

2% roztwór APTES-u w acetonie
Roztwory białek o stężeniach 20 μg, 40 μg oraz 80 μg/ 1mL PBS
2,5% wodny roztworu aldehydu glutarowego GA
2,5 μM roztworu BSA

- Przygotowanie podłoży

Zanurzyć pocięte szkła mikroskopowe w rozpuszczalniku organicznym (etanol) i umieścić naczynie w płuczce ultradźwiękowej na czas 10 min. Po osuszeniu azotem wyczyścić powierzchnię plazmą tlenową (30s). Zanurzyć szkiełka w roztworze APTES-u (30 min), spłukać kilkakrotnie acetonem, wysuszyć pod strumieniem azotu a następnie wygrzewać w temp 110°C przez 20 min. Następnie kilka próbek (ile-decyzja prowadzącego) umieścić na czas 15 min w roztworze GA, które później należy przemyć roztworem BSA w celu zablokowania wolnych grup aldehydowych. Po wypłukaniu podłoży roztworem PBS i osuszeniu podkłady szklane są przygotowane do drukowania białek.

- Przygotowanie pieczątek

Umieścić pieczątki w naczynkach wagowych i zalać etanolem. Naczynka wagowe włożyć do płuczki ultradźwiękowej na 15 min. Minimalny czas mycia pieczątek w etanolu to 30 min.

Następnie wypłukać pieczątki PDMS w wodzie dejonizowanej i wysuszyć.

- Immobilizacja białek

Powierzchnię pieczątki pokryć roztworem białka. Czas depozycji 5-15 min (decyzja prowadzącego). Później spłukać kilkakrotnie pieczątkę roztworem buforu (PBS), wodą dejonizowaną i wysuszyć pod strumieniem azotu. Następnie położyć pieczątkę na zmodyfikowanej powierzchni szkła na czas 30s.

- Wykonać obrazowanie wytworzonych macierzy metodami mikroskopii AFM i fluorescencyjnej.

Dodatkowo, dla wybranych próbek, pokryć macierz białkową drugim roztworem białka (czas depozycji 15 min), spłukać roztworem buforu i wodą dejonizowaną. Po osuszeniu azotem wykonać jednoczesne pomiary AFM i fluorescencyjne.

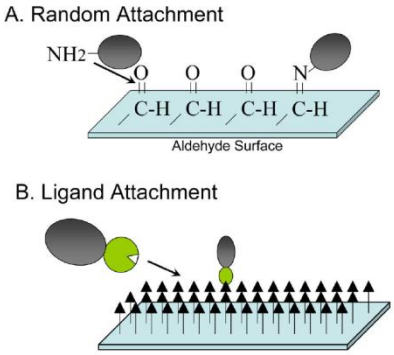
Mikrowzory białek

Tworzenie mikrowzorów białek

Immobilizacja (unieruchomienie) białek na powierzchni jest konieczna w wielu badaniach biotechnologicznych i biomedycznych, a szczególności w wielu zastosowaniach praktycznych takich jak biosensory, różnego rodzaju testy biologiczne czy rusztowania do hodowli komórkowych. W szczególności w celu miniaturyzacji, prowadzenia równoległych testów, a także w wielu badaniach z wykorzystaniem komórek konieczna jest immobilizacja białek w postaci dobrze zdefiniowanych mikrowzorów powierzchniowych.
Dla tego rodzaju zastosowań bardzo ważne jest, aby utworzona na powierzchni warstwa białek spełniała określone warunki takie jak np. jednorodność, duża gęstość powierzchniowa zaadsorbowanych molekuł, zachowanie zdolności biologicznej oraz dobre odtworzenie zadanego wzoru powierzchniowego. Dlatego też bardzo ważne jest opracowanie odpowiedniego sposobu towrzenia mikrowzorów białek na powierzchni, który pozwoli na otrzymanie warstwy o wymaganych właściwościach. Obecnie regularne wzory jednego rodzaju lub wielu rodzaju białek tworzone są głównie z zastoswoaniem techniki druku mikrokontaktowego (μCP), a także fotolitografii czy litografii "dip-pen" [FOR].

Mikromacierze białek

Mikromacierze białek powstają przez immobilizację protein na podłożu w postaci uporządkowanych, regularnych wzorów geometrycznych. Wybrane podłoże musi spełniać dwa warunki. Po pierwsze oddziaływanie podłoże- białko nie może zaburzyć jego konformacji, a po drugie musi umożliwić związanie proteiny z podłożem. Dodatkowo, w zależności od tego czy pożądana jest losowa czy uporządkowana orientacja białek podłoże jest modyfikowane w inny sposób. Losową orientację białek otrzymuje się przez pozycjonowanie ich na podłożach szklanych zmodyfikowanych grupami aminowymi, aldehydowymi, epoksydowymi lub pokrytymi poli-L-lizyną.
Aby uzyskać jednakową orientację immobilizowanych protein stosuje się podłoża zmodyfikowane np. streptawidyną lub białkiem HisX6 (Rys. A).
Identyfikacja związanych specyficznie białek z białkami macierzy odbywa się dzięki znakowaniu znacznikami fluorescencyjnymi lub radioizotopami [HAL].



Rysunek A Sposoby wiązania protein z powierzchnią substratu umożliwiające przypadkową orientację biomolekuł (A) oraz uporządkowaną (B) przez zastosowanie oddziaływań specyficznych białko-ligand [HAL].

Macierze białkowe są stosowane do badania oddziaływań białko-białko, białko-DNA, białka-lipid, białko-lek, białko-receptor, antygen-przeciwciało (Rys. B). Inne funkcje macierzy białkowych to identyfikacja białek, monitorowanie ich ilości oraz funkcje diagnostyczne.

Rodzaje macierzy białkowych

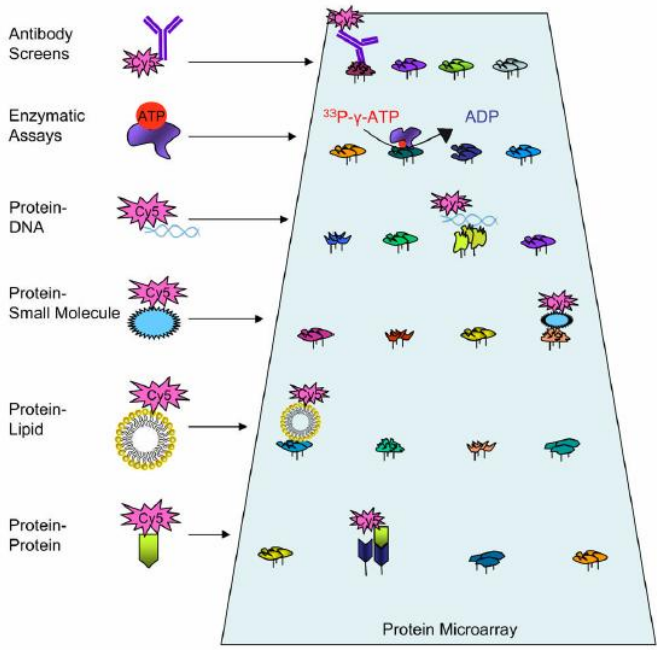
Wyróżnia się trzy podstawowe typy macierzy białkowych: mikromacierze analityczne (ang. analytical microarrays), mikromacierze funkcjonalne (ang. functional microarrays) oraz tzw. odwrócone mikromacierze białek (ang. recerse phase microarrays).
Analityczne mikromacierze białkowe są używane do profilowania roztworów zawierających różne typy białek w celu zbadania oddziaływań specyficznych, powinowactwa oraz poziomu zawartości poszczególnych protein. W tej technice tworzy się macierz złożoną z przeciwciał, aptamerów (oligonukleotydów (krótkie fragmenty DNA lub RNA) lub peptydy, które wiążą się specyficznie z określoną cząsteczką) lub bardzo małych białek (ang. affibody proteins), którą pokrywa się roztworem białek. Mikromacierze przeciwciał są najpopularnieszym typem macierzy analitycznych wykorzystywanych w diagnostyce klinicznej.

Funkcjonalne mikromacierze białkowe zawierają domeny lub całe łańcuchy białka funkcjonalnego*. Są one używane do badania biochemicznych oddziaływań całego proteomu (białkowy odpowiednik genomu) w trakcie jednego eksperymentu. Te oddziaływania to białko-białko, białko-DNA, białka-lipid, białko-lek, białko-receptor, antygen-przeciwciało (Rys. B).

Trzeci typ mikromacierzy białkowych to *odwrócone macierze* RPA. Mikromacierze RPA powstają przez immobilizację lizatu, czyli materiału biologicznego powstałego z komórek (pobranych z tkanek) poddanych lizie. Następnie taka pramacierz jest eksponowana na roztwór przeciwciał wiążących się z interesującymi eksperymentatora białkami. Przeciwciała są identyfikowane za pomocą chemiluminescencji lub fluorescencji. Dodatkowo na drugim podłożu wykonuje się próbkę referencyjną (peptydy), co umożliwia określenie ilości zawartości badanego białka w lizacie. Macierze RPA pozwalają zidentyfikować białka o zmienionej budowie, mogące być skutkiem choroby. Poznanie, które białka wykazują dysfunkcje ułatwia zastosowanie odpowiedniej terapii [HAL].

Lektyny to białka, które wiążą się specyficznie z węglowodanami występującymi w błonach komórkowych ssaków. Konkanawalina A wiąze się specyficznie z mannozą, podczas gdy Lektyna soczewicy rozpoznaje mannozę i fukozę. Wykorzystanie tych białek oraz ich oddziaływań a także zainteresowanie mikromacierzami lektyn wynika z faktu, że wzrost liczby glikanów na powierzchni komórek jest związany ze stanem nowotworowym komórki [ZEM02].

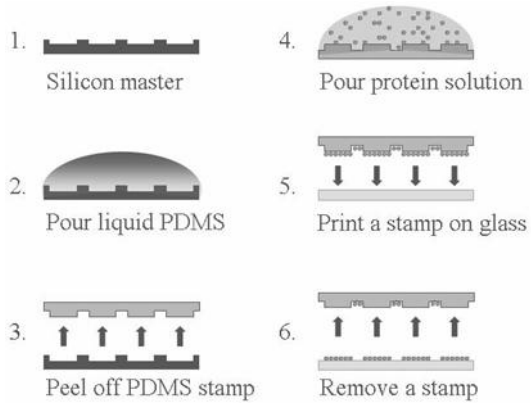
*Białka można podzielić na białka strukturalne, budujące kości i mięśnie np. keratyna, elastyna czy kolagen oraz funkcjonalne, które są odpowiedzialne za prawidłowy przebieg pewnych procesów. Przykładami białek funkcjonalnych są hemoglobina i transferryna odpowiedzialne za transport, magazynowanie-ferrytyna, przeciwciała- odpowiedzialne za obronę komórek przed bakteriami i wirusami, kadheryny- odpowiedzialne za przyleganie komórek, czy aktyna i miozyna odpowiedzialne za skurcze mięśni i in.



Rysunek B Przykłady różnych rodzajów funkcjonalnych macierzy białkowych. Białka są pozycjonowane z wysoką rozdzielczością przestrzenną na powierzchni szkła mikroskopowego, które umożliwiają symultaniczne badanie wielu typów oddziaływań. Cy5- znacznik fluorescencyjny [HAL].

Druk mikrokontaktowy

Druk mikrokontaktowy (μCP ang. *microcontact printing*) jest techniką stosowaną do tworzenia dobrze zdefiniowanych wzorów molekuł na różnych podłożach przy użyciu polimerowej pieczątki wykonanej z polydimetylosiloksanu (PDMS). PDMS jest materiałem łatwo formowalnym, dopasowuje się do kształtu podłoża, a po utwardzeniu może być oderwany bez niszczenia powierzchni. Umożliwia to przenoszenie za pomocą jego powierzchni mikrometrowych wzorów z bardzo dobrą jakością.



Rysunek 1. Schemat tworzenia pieczątek z PDMS (kroki 1-3) oraz zasada drukowania mikrokontaktowego z użyciem pieczątek PDMS (kroki 4-6) [LEB].

Schemat druku mikrokontaktowego z wykorzystaniem pieczątek z PDMS przedstawiono na rys. 1. Początkowo pieczątka z PDMS jest formowana na podstawie krzemowej matrycy posiadającej na

swojej powierzchni żądany wzór, wytworzony najczęściej za pomocą technik fotolitograficznych. W celu wytworzenia pieczątki ciekły polimer jest wylewany na matrycę i pozostawiany do utwardzenia. Po utwardzeniu gotowa pieczątka z PDMS jest odklejana od krzemowej matrycy. Następnie pieczątka z PDMS może zostać użyta do depozycji molekuł na wybranym podłożu. Pieczątka z PDMS jest zanurzana w roztworze molekuł, a następnie po kilkuminutowej inkubacji pieczątka jest przykładana do podłoża. Ponieważ powierzchni PDMS jest hydrofobowa w trakcie odciągania pieczątki od powierzchni molekuły pozostają na podłożu. Zarówno krzemowa matryca jak i pieczątka z PDMS mogą być wielokrotnie wykorzystane [LEB].

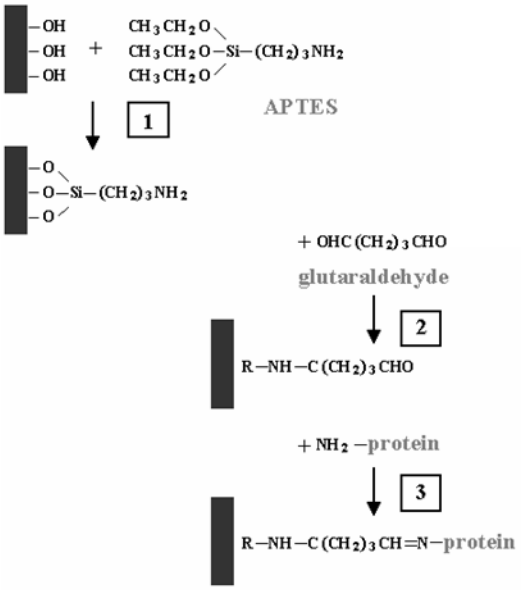
Ważnym czynnikiem determinującym jakość i sposób odtworzenia wzoru pieczątki przez drukowane cząsteczki jest geometria pieczątki PDMS. Stosując pieczątki o periodyczności rzędu kilku μm drukowanie białek odbywa się przez przeniesienie molekuł znajdujących się w obszarach wysokich pieczątki, gdy periodyczność pieczątki jest rzędu kilkudziesięciu do kilkuset μm drukowanie odbywa się z udziałem biomolekuł znajdujących się w rowkach pieczątki PDMS. Efekt ten został nazywany techniką odwróconego druku mikrontaktowego (ang. inverted microcontact printing, i-μCP) [ZEM01].
W druku mikrokontaktowym białek ważnymi czynnikami wpływającymi na jakość otrzymanych wzorów są czas depozycji roztworu białka oraz stężenie roztworu, a także geometria pieczątek [LEB].

Fizyczna adsorpcja, a wiązanie kowalencyjne białek
Unieruchomienie białek na powierzchni może zachodzić poprzez fizyczną adsorpcję białek do powierzchni lub ich kowalencyjne wiązanie.

Proces fizycznej adsorpcji białek, choć powszechnie obserwowany na prawie każdym rodzaju powierzchni, jest procesem bardzo skomplikowanym, będącym rezultatem wielu rodzajów oddziaływań. Adsorpcja napędzana jest głównie przez oddziaływania hydrofobowe, elektrostatyczne oraz oddziaływania van der Waalsa, a także przez wzrost entropii konformacyjnej białka na skutek zmian struktury wywołanych adsorpcją. Różna orientacja białek na powierzchni, a także możliwe zmiany struktury mogą powodować zmniejszenie a nawet całkowite utracenie aktywności biologicznej nieuruchomionych w ten sposób molekuł. Na kinetykę adsorpcji białka do powierzchni wpływ mają zarówno właściwości powierzchni, rodzaj adsorbowanego białka jak i warunki środowiska takie jak temperatura, pH czy siła jonowa roztworu. Do najistotniejszych dla procesu adsorpcji własności powierzchni należą jej właściwości fizyko-chemiczne takie jak polarność, oraz morfologia powierzchni. W większości przypadków powierzchnie hydrofobowe wywołują większe zmiany struktury zaadsorbowanych białek niż powierzchnie hydrofilowe, co skutkuje nieodwracalnością procesu adsorpcji, a tym samym większym obserwowanym stopniem pokrycia powierzchni przez białko [CZES]. W celu zwiększenie fizycznej adsorpcji do podłoży bazujących na krzemie (m. in. szkła) stosuje się modyfikację podłoży za pomocą warstwy organicznej o porządnych właściwościach fizyko-chemicznych. Bardzo często wykorzystuje się do tego celu silany np. APTES ((3-Aminopropyl)triethoxysilane) zwierający grupę aminową.

Wiązanie chemiczne białek do powierzchni zwane także chemisorpcją polega na tworzeniu wiązania chemicznego pomiędzy łańcuchami bocznymi aminokwasów a grupami chemicznymi znajdującymi się na powierzchni. Początkowym etapem chemisorpcji, poprzedzającym utworzenie wiązania chemicznego, jest fizyczna adsorpcja białka do powierzchni. Zaletą immobilizacji białek poprzez tworzenie wiązania kowalencyjnego jest nieodwracalność tego procesu oraz uzyskiwane wysokie pokrycie powierzchni. Istnieje wiele możliwości wiązania kowalencyjnego białek w zależności od rodzaju grup funkcyjnych, którymi została zmodyfikowana powierzchnia. Przykładowe modyfikacje powierzchni pozwalające na kowalencyjne wiązanie białek to [RUS]:

- grupy aldehydowe - tworzące wiązanie z grupami aminowymi białek
- grupy NHS (ang. N-hydroxysuccinimide) - tworzący wiązanie z grupami aminowymi białek
- imid kwasu maleinowego (ang. maleimide) - tworzący wiązanie z grupami tiolowymi znajdującymi się w aminokwasie cysteinie
- grupy epoksydowe - tworzące wiązanie z grupami aminowymi białek



Rysunek 2. Schemat silanizacji podłoża za pomocą APTES (1), jego następnej modyfikacji gluteraldehydem (2) oraz wiązania kowalencyjnego białka do tak przygotowanego podłoża (3). [LEB]

Czynniki kontrolujące adsorpcję białka

Wpływ środowiska zewnętrznego. Warunki, w których zachodzi adsorpcja białka wywierają zasadniczy wpływ na zachowanie tych molekuł. Są to: temperatura, pH, rodzaj buforu, siła jonowa. Temperatura wpływa nie tylko na równowagę termodynamiczną ale również na kinetykę adsorpcji białka. Podwyższona temperatura wywołuje wzmożoną dyfuzję białek w kierunku powierzchni adsorbentu. Główną siłą rządzącą adsorpcją białek jest wzrost entropii spowodowany uwolnieniem z ich powierzchni zaadsorbowanych cząsteczek wody oraz jonów soli, a także przeorganizowanie struktury białka. Ilość zaadsorbowanych białek rośnie wraz ze wzrostem temperatury.
pH determinuje stan elektrostatyczny białek. Kiedy pH równe jest punktowi izoelektrycznemu białka (pI) ładunki na powierzchni białka kompensują się, a cała molekuła jest elektrycznie obojętna. W niskim pH (<pI) białka są pozytywnie naładowane, a w pH> pI są naładowane ujemnie. Jeśli powierzchnia adsorbentu również jest naładowana to adsorpcja jest kontrolowana przez oddziaływania elektrostatyczne. Należy jednak pamiętać, że oprócz oddziaływania bio-molekuł z powierzchnią polimeru, adsorbujące białka oddziałują ze sobą nawzajem. Lateralne oddziaływanie białek może spowodować albo zwiększenie gęstości upakowania molekuł, albo efekt przeciwny związany z odpychającymi siłami elektrostatycznymi. Ponadto działanie sił jonowych sprzyja tworzeniu się agregatów białek [ZEM02].

Wpływ własności białek na ich adsorpcję. Białka to złożone biopolimery zbudowane z 20 aminokwasów budujących monomery (struktura pierwszorzędowa), do których dodatkowo mogą być dołączone łańcuchy boczne oligosacharydów, lipidów. Na skutek wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych formuje się struktura drugorzędowa białek (α- helisa, β- harmonijka), natomiast oddziaływania jonowe, hydrofobowe, mostki siarczkowe odpowiadają za strukturę trzeciorzędową białek. Z połączenia łańcuchów polipeptydowych, każdy o określonej strukturze 1-, 2- i 3- rzędowej, formuje struktura czwartorzędowa białka. Ta wyjątkowa różnorodność

podstawowych elementów budulcowych wpływa na złożoność struktury i funkcjonowania białek, przez co zagadnienie adsorpcji jest trudne.

Klasyfikując białka ze względu na ich oddziaływanie z powierzchnią uwzględnia się ich rozmiar, budowę, stabilność struktury. Małe i sztywne białka (np. lizosomy) wykazują słabą tendencję do zmian konformacyjnych na skutek adsorpcji. Podczas gdy u białek średnich, jak albumina czy immunoglobuliny, adsorpcja powoduje konformacyjną reorientację molekuł, powodującą ekspozycję różnych części molekuły o odmiennych własnościach hydrofobowych/ hydrofilowych, polarnych/ niepolarnych, naładowanych/ elektrycznie obojętnych. W przypadku białek o dużych rozmiarach molekuł, glikoprotein czy glikolipidów, ich oddziaływanie z powierzchnią jest zdominowane przez oddziaływania ich łańcuchów bocznych.

W roztworach wielu białek, ich adsorpcja do powierzchni wynika z efektów: transportu, adsorpcji i działania sił odpychających. Dyfuzja małych molekuł jest szybsza niż dużych białek, dlatego w pierwszym etapie adsorbują małe proteiny. Z drugiej strony duże białka wiążą się mocniej do powierzchni, ze względu na większy obszar kontaktu, oraz mogą odpychać mniejsze białka w czasie dyfuzji po powierzchni. W wyniku tego można zaobserwować lokalne maksimum na izotermie adsorpcji białka. To zachowanie nazywa się efektem Vroman'a [ZEM02].

Wpływ własności powierzchni na adsorpcję białek. Ważnymi dla adsorpcji białek parametrami charakteryzującymi powierzchnię są energia powierzchniowa, polarność, ładunek oraz morfologia i chropowatość. Badania pokazały, że białka chętnie adsorbują do powierzchni niepolarnych niż polarnych, o wysokim napięciu powierzchniowym, a do powierzchni obojętnych elektrycznie adsorbują niechętnie. Jednak za główną, najważniejszą cechę podłoża determinującą adsorpcję białek uznaje się jego hydrofobowość.

Zachowanie pojedynczych białek na powierzchni.

Orientacja białka. Białka są molekułami asymetrycznymi, w wyjątkowych wypadkach mają sferyczny kształt, najczęściej mają formę elipsoidy, lub bardziej wyszukane np. serco- kształtne BSA, czy Y- kształtne immunoglobuliny. W roztworze białka rotują swobodnie, natomiast zaadsorbowane do powierzchni przyjmują określoną orientację, która determinuje jaka część biomolekuły oddziałuje z powierzchnią, a która część jest eksponowana w roztworze. Obrana orientacja białka jest istotna, kiedy zaadsorbowane białka są enzymami, receptorami lub wykazują inną specyficzną bioaktywność, ponieważ niewłaściwa orientacja może zablokować dostęp przeciwciał do miejsc wiążących.
Adsorbujące białka przyjmują orientację zapewniającą uzyskanie minimum energii swobodnej, co wynika z oddziaływań kulombowskich, van der Waals'a, wiązań wodorowych, wzrostu entropi. Ponieważ białka w różnych obszarach mają różne własności wynikające z lokalnej budowy (ładunek, hydrofobowość) sądzi się, że do podłoży hydrofobowych białka eksponują te fragmenty, które są bogate w residua hydrofobowe. Analogicznie, białka adsorbujące do naładowanych powierzchni eksponują fragmenty biomolekuły o ładunku przeciwnym. Jednak, w przypadku dużej gęstości zaadsorbowanych białek oddziaływania między 'sąsiadami' mogą być dominujące w porównaniu do oddziaływania białko- naładowana powierzchnia. Siły odpychające między białkami, mogą spowodować reorientację molekuł, tak że ładunek białka i podłoża będzie taki sam [ZEM02].

Mikroskopia Sił Atomowych AFM

Podstawy działania mikroskopu AFM
Techniki mikroskopii skanującego próbnika (SPM - ang. Scanning Probe Microscopy), do których należy mikroskopia sił atomowych (AFM - ang. Atomic Force Microscopy), pozwalają na badanie własności powierzchni materiałów w skali nanometrowej. Wspólną cechą tego rodzaju mikroskopii jest wykorzystanie przesuwającej się nad próbka sondy, która dzięki oddziaływaniu

z próbką pozwala na pomiar odpowiedniej wielkości fizycznej. Rodzaj wykorzystywanego oddziaływania oraz mierzona wielkość fizyczna zależą od typu mikroskopu. Dzięki przesuwaniu sondy nad próbką pomiar odbywa się punkt po punkcie pozwalając na otrzymanie obrazu badanej powierzchni.

Mikroskopia sił atomowych AFM bazuje na pomiarze siły oddziaływania pomiędzy próbnikiem (ostrzem) a powierzchnią badanej próbki. Próbnik ten to ostro zakończony element w kształcie stożka lub piramidy o wysokości rzędu kilku mikrometrów i promieniu krzywizny rzędu kilkudziesięciu nanometrów. Umieszczony jest on na swobodnym końcu dźwigni AFM, o stałej sprężystości od 0,01 N/m do 0,1 N/m, wykonanej najczęściej z azotku krzemu Si_3N_4. Siła F działająca pomiędzy próbnikiem a powierzchnią powoduje ugięcie się dźwigni, o stałej sprężystości k, o wartość x zgodnie z prawem sprężystości:

$$F = k \cdot x$$

Zmiana wychylenia dźwigni, którą potrafimy rejestrować, niesie informację o zmianie siły działającej pomiędzy próbnikiem a powierzchnią. Ponieważ siła oddziaływania zależy od odległości pomiędzy ostrzem a próbką, rejestracja zmian wychylenia dźwigni AFM pozwala na sporządzenie mapy topograficznej badanej powierzchni.

Budowa mikroskopu AFM

Najczęściej wykorzystywanym układem rejestracji wychylenia dźwigni jest układ optyczny. W skład takiego układu wchodzi dioda laserowa oraz detektor, którego powierzchnia czynna podzielona jest na cztery sektory. Wiązka laserowa pada na koniec dźwigni, odbija się od niej i następnie jest rejestrowana przez fotodetektor. Zmiana wychylenia dźwigni powoduje zmianę natężeń prądów wytwarzanych przez poszczególne sektory detektora. Różnica pomiędzy natężeniami pradu z górnego i dolnego segmentu detektora dostarcza informacji o ugięciu dźwigni, czyli o siłach działających prostopadle do badanej powierzchni. Różnica natężeń prądu z prawego i lewego segmentu detektora informuje natomiast o skręceniu dźwigni, czyli o siłach działających równolegle do powierzchni.

Oprócz dźwigni z próbnikiem oraz układu detekcyjnego w skład mikroskopu AFM wchodzą także skaner piezoelektryczny oraz układ sprzężenia zwrotnego. Skaner piezoelektryczny, najczęściej w kształcie tubki wykonanej ze spieku PZT (tytanian ołowiowo –cyrkonowy), umożliwia bardzo precyzyjne przesuwanie próbki w trzech kierunkach (x, y, z). Układ sprzężenia zwrotnego natomiast odpowiada za kontrolę położenia próbki względem sondy AFM w kierunku z w zależności od zastosowanego trybu pracy mikroskopu.
Schemat budowy mikroskopu sił atomowych AFM przedstawiona na rys.3.



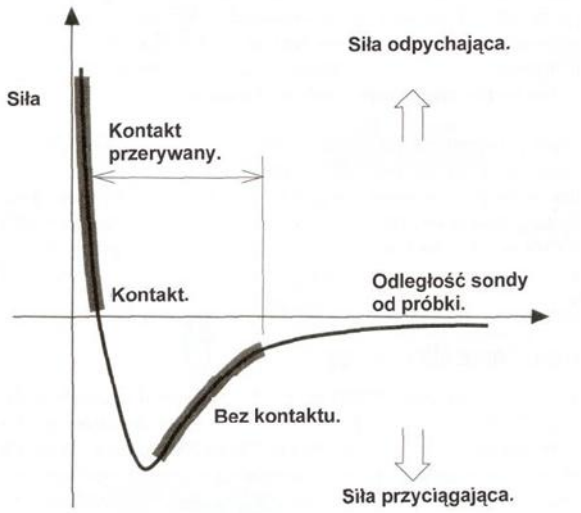
Rysunek 3: Schemat budowy mikroskopu sił atomowych AFM [CZE].

Tryby pracy mikroskopu AFM

Siła działająca pomiędzy próbnikiem a powierzchnią jest wynikiem wielu rodzajów oddziaływań. Najważniejsze z nich to dalekozasięgowe, przyciągające oddziaływanie van der Waalsa oraz bliskozasięgowe, odpychające oddziaływanie związane z przekrywaniem się chmur elektronowych atomów (potencjał sztywnego rdzenia). Wypadkową obu tych oddziaływań opisać można za pomocą potencjału Lennarda-Jonesa:

$$U\ R\ = 4\varepsilon\ \ \frac{\sigma}{R}^{12} - \frac{\sigma}{R}^{6}$$

Gdzie pierwszy człon opisuje potencjał sztywnego rdzenia, a drugi oddziaływanie van der Waalsa,*R* to odległość pomiędzy ostrzem a próbką, ε i σ to stałe.



Rysunek 4: Zależność siły oddziaływania od odległości ostrza od powierzchni próbki [HOW].

Znajomość potencjału oddziaływania pozwala na wyznaczenie zależności siły działającej pomiędzy atomami ostrza i próbki w zależności od ich wzajemnej odległości (rys. 2.2). W zależności od rodzaju siły powodującej wychylenie dźwigni wyróżniamy rożne tryby pracy mikroskopu AFM:

- Tryb kontaktowy - tryb w którym próbnik znajduje się w fizycznym kontakcie z badaną powierzchnią. Odległość ostrza od próbki wynosi ok. 0,1nm, a dominującym typem oddziaływań są oddziaływania odpychające (potencjał sztywnego rdzenia). Obraz topografii powierzchni tworzony jest, w zależności od zastosowanego modu pracy, na podstawie zmian wychylenia dźwigni bądź ruchów skanera piezoelektrycznego.

- Tryb bezkontaktowy - tryb w którym dźwignia wraz z ostrzem drga nad powierzchnią próbki. Odległość ostrza od próbki wynosi kilka do kilkudziesięciu nanometrów, a dominującym typem oddziaływań są oddziaływania przyciągające (głównie oddziaływanie van der Waalsa). Obraz topografii powierzchni tworzony jest na podstawie ruchów skanera piezoelektrycznego, które umożliwiają zachowanie stałej częstotliwości rezonansowej drgań dźwigni AFM.

Ze względu na dużo niższą niż w przypadku trybu kontaktowego siłę oddziaływania pomiędzy ostrzem a powierzchnią pomiar w trybie bezkontaktowym nie powoduje niszczenia delikatnych i elastycznych próbek. Z tego względu tryb bezkontaktowy jest bardzo użyteczny w przypadku badań powierzchni materiałów organicznych i biologicznych.

- Tryb przerywanego kontaktu - tryb w którym dźwignia drga na tyle blisko próbki, że w momencie maksymalnego wychylenia ostrze dotyka jej powierzchni. Jest to tryb pośredni pomiędzy modem kontaktowy i bezkontaktowym, w którym wykorzystywane są oba typy oddziaływań zarówno przyciągające jak i odpychające.

Analiza wyników otrzymanych z mikroskopii AFM

Wynikiem pomiarów przeprowadzanych przy pomocy mikroskopu sił atomowych są obrazy topograficzne, na których lokalną wysokość określa skala kolorów. Ilościowa analiza takich wyników związana jest z koniecznością numerycznej analizy otrzymanych obrazów. Analizy tej dokonać można przy użyciu programu WSxM 5.0 (Nanotec Electronics), dostępnego na stronie: http://www.nanotec.es. Program ten umożliwia analizę wysokości struktur topograficznych na badanej powierzchni, dzięki możliwości wykonania dowolnego przekroju, stworzenia trójwymiarowego przedstawienia otrzymanych wyników oraz wyliczenia histogramu wysokościowego punktów obrazu AFM. Analiza histogramu wysokościowego punktów obrazu AFM pozwala wyznaczyć m. in. następujące miary:

- Średnią wysokość (ang. average height) - jest to średnia wysokość z wszystkich punktów obrazu wyznaczona względem punktu leżącego najniżej.

- Chropowatość R_q (ang. roughness) - jest to wyznacznik jednorodności powierzchni zdefiniowany jako średnie kwadratowe odchylenie profilu wysokości:

$$R_q = \sqrt{\frac{1}{n}\sum_{k=0}^{n} z_i - z^{\,2}}$$

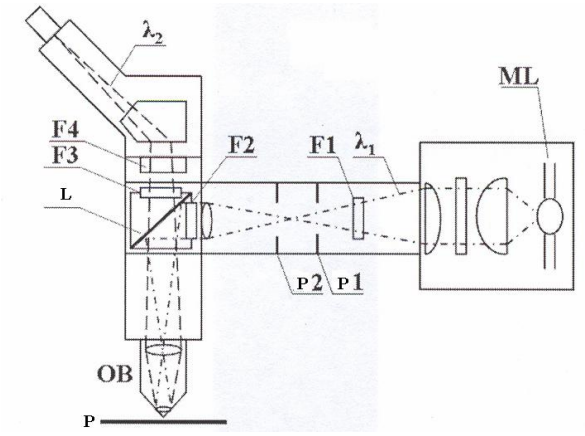
gdzie n jest liczbą punktów pomiarowych, z_i jest wysokością danego punktu, a jest średnią wysokością wszystkich punktów.

Poszerzenie małych struktur na obrazie AFM

W przypadku obrazowania za pomocą mikroskopu sił atomowych AFM bardzo małych struktur, o rozmiarach mniejszych lub porównywalnych z promieniem ostrza, dochodzi do 'przekłamania' ich rozmiarów na obrazie. Obserwowana szerokość struktur jest większa niż ich rzeczywiste wymiary. [FOR]

Mikroskopia fluorescencyjna

Mikroskopia fluorescencyjna pozwala na badanie substancji fluorescencyjnych, czyli takich, które po naświetleniu światłem o danej długości fali emitują własne promieniowanie świetlne. W przypadku niektórych biomolekuł możliwe jest znaczenie ich znacznikami fluorescencyjnymi, co umożliwia ich detekcję za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego. Stosowanie znakowanych biomolekuł pozwala badać struktury biologiczne np. Żywe komórki a także stwierdzać obecności danych typów molekuł np. na powierzchniach materiałów. Użycie kilku znaczników na raz umożliwia równoczesne zidentyfikowanie różnych typów molekuł.



Rysunek 5: Schemat budowy mikroskopu fluorescencyjnego. ML – lampa rtęciowa, P1, P2 – przesłony, F1, F2, F3, F4 – filtry, L – lustro półprzepuszczalne, OB - obiektyw, P – próbka, λ_1- światło wzbudzające, λ_2 - światło fluorescencyjne [LEB].

Schemat budowy mikroskopu fluorescencyjnego przedstawiono na rys.10. Mikroskop fluorescencyjny zawiera lampę rtęciową jako źródło światła wzbudzającego, które po przejściu przez układ filtrów i przysłon pada na powierzchnię badanej próbki. Oddzielenie światła fluorescencyjnego (λ_2) od światła wzbudzającego odbitego (λ_1) od powierzchni próbki odbywa się za pomocą lustra półprzepuszczalnego, tak aby do oka czy kamery docierało jedynie światło fluorescencyjne.

Fluoroforami często wykorzystywanymi do znakowania białek są m.in.: FITC (fluorescein isothiocyanate) oraz TRITC (tetramethyl rhodamine isothiocyanate). FITC absorbuje światło niebieskie (λ_1= 490 nm), a emituje światło zielone (λ_2= 525 nm). Natomiast TRITC pochłania światło zielone (λ_1 = 557nm), później emitując światło czerwone λ_2 = 576 nm). [ZEM03]

[CZE] J. Czerwińczak, praca magisterska, Instytut Fizyki UJ, (2000)
[CZES] C. Czeslik, Zeitschrift fur Physikalische Chemie, 218 (2004) 771
[ZEM01] J. Zemła et al. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 90 (2012) 144-151.
[ZEM02] J. Zemła, praca doktorska, Instytut Fizyki UJ, (2012)
[FOR] K. Fornal, praca magisterska, Instytut Fizyki UJ, (2013)
[HOW] R. Howland, L. Benatar, STM/AFM Mikroskopy ze skanującą sondą elementy teorii i praktyki, tłumaczenie WIM PW, Warszawa, (2002)
[LEB] K. Lebed, praca doktorska, Instytut Fizyki Jądrowej PAN, (2006)
[RUS] F. Rusmini et al., Biomacromolecules 8 (2007) 1175-1789.
[ZEM03] J. Zemła, praca magisterska, Instytut Fizyki UJ, (2007)
[HAL] D. A. Hall, Mech Ageing Dev. 2007 January ; 128(1): 161–167.