

## Úloha: Měření mechanických vlastností buněk/liposomů – AFM

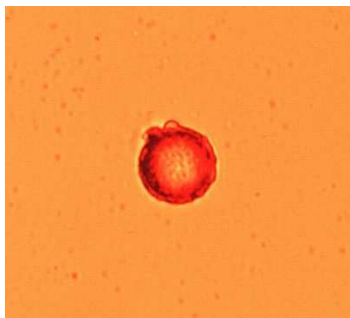
### Úkoly:

- 1.) Připravte vzorek modelu buněk - liposomů.
- 2.) Proveďte indentační zkoušku liposomů pomocí AFM při různých teplotách.
- 3.) Změřte jejich geometrické vlastnosti.
- 4.) Vyhodnoťte jejich modul pružnosti pomocí Hertz-Sneddonova modelu.
- 5.) Porovnejte Youngův modul pružnosti v závislosti na teplotě prostředí, ve kterém bude vzorek měřen.
- 6.) Porovnejte Youngův modul pružnosti v závislosti na velikosti liposomu.
- 7.) Výsledky diskutujte.

**Klíčová slova:** Liposom, Modul pružnosti, AFM, Indentační zkouška, Hertz-Sneddon model.

### Úvod:

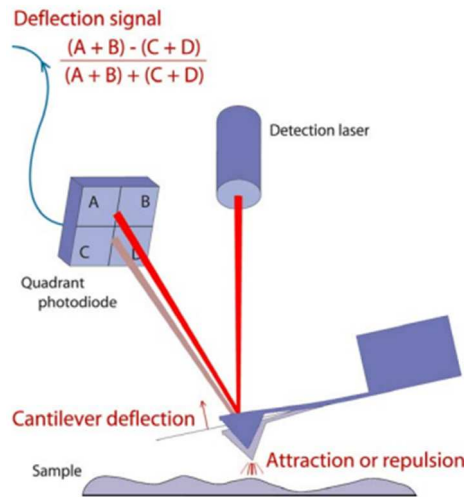
Jelikož buňky často nemají uniformní rozměry, je všeobecně užíván liposom jako model buňky. Uniformní geometrie nám často pomáhá, pokud se snažíme nalézt nějaký model pro popis nějakého problému, jako je v našem případě popis mechaniky buňky. Můžeme tak například ověřit, jaký vliv má velikost měřeného subjektu na jeho mechanické vlastnosti. Proto bude v této úloze využito liposomu, jako modelu buněk.



Obrázek 1 Liposom

Mikroskopie atomárních sil byla vynalezena v roce 1986 prof. Binnigem pro zobrazování objektů, na které již nestačí rozlišení optických mikroskopů. Princip AFM je založen na rastrování objektu velice malým hrotem. Při tomto rastrování je detekována deformace nosníku (cantileveru), na kterém je hrot umístěn. Tato deformace je měřena pomocí takzvané optické páky, kdy na cantilever dopadá laserový paprsek, a jeho odraz je detekován pomocí detektoru (kvadratická fotodiody). Tento princip umožňuje měřit deflexi cantileveru jak v laterálním tak vertikálním směru. Tato metoda nám tak umožňuje měřit topografii měřeného vzorku.

## FBMI ČVUT

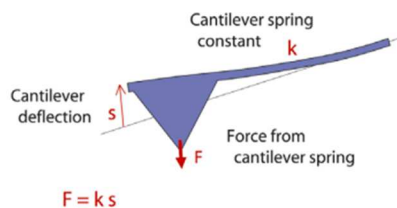


Obrázek 2 Schéma principu AFM - převzato z JPK Instruments NanoWizard® Handbook Version 2.2a

Jednou v současnosti nejvíce využívaných technik, které se používají pro měření mechanických vlastností malých, mikroskopických objektů, jako je buňka, je takzvaná indentační zkouška (dle názvosloví firmy JPK Force spectroscopy). Díky základnímu principu AFM lze takovou zkoušku provádět s jeho využitím. Základem jakéhokoli zjišťování mechanických vlastností je sledování odezvy materiálu na jeho deformaci či zatížení. V případě indentační zkoušky dochází ke vtlačování objektu (hrotu) do materiálu, přičemž je zaznamenávána síla a hloubka indentu. V případě AFM je síla určena opět deformací nosníku, na kterém je umístěn hrot. Každý nosník má svou tuhostní konstantu (spring constant), díky které můžeme získat sílu potřebnou k jeho deformaci.

$$F = k \cdot s$$

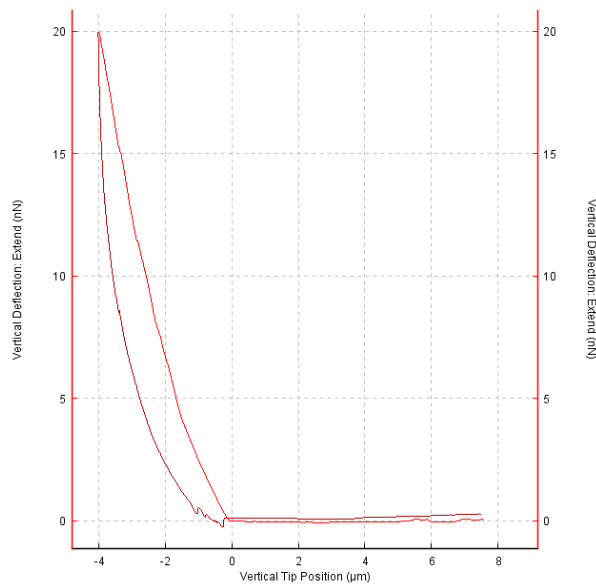
Samotnou hloubku indentu pak získáme přímo ze změřeného posunu hlavy a deflexe nosníku.



Obrázek 3 Schéma deformace cantileveru - převzato z JPK Instruments NanoWizard® Handbook Version 2.2a

Pomocí indentační zkoušky tak získáme finální závislost mezi hloubkou intendace a detekovanou silou, a to jak se zátěžovou, tak odlehčovací křivkou viz obr 3, kde levá křivka je odlehčovací a pravá je zátěžová. Pro naše účely je důležitá právě ta zátěžová.

## FBMI ČVUT

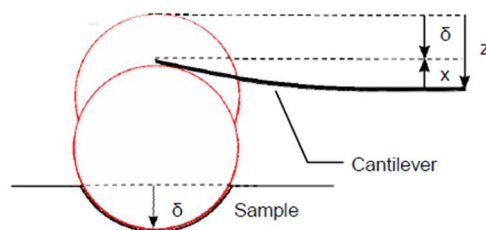


Obrázek 4 Příklad naměřené závislosti Síla - hloubka indentace

Ze základní teorie pružnosti můžeme říci že modul pružnosti je směrnici tečny deformační křivky, to však v případě indentační zkoušky nelze využít, protože se díky geometrii hrotu mění kontaktní plocha. Proto je třeba využít některého z modelů. Takovýchto modelů existuje mnoho, nicméně asi nejčastěji využívaným je model Hertz, popřípadě Hertz/Sneddon. Pro kulový hrot vypadá model následovně:

$$F = \frac{4\sqrt{R}}{3} \frac{E}{1 - \nu^2} \delta^{3/2}$$

Kde  $E[\text{Pa}]$  je modul pružnosti,  $\nu[-]$  je poissonův poměr,  $R[\text{m}]$  je poloměr hrotu, a  $\delta[\text{m}]$  je hloubka indentu.



Obrázek 5 Schéma indentu - převzato z JPK instruments application note (©JPK instruments AG)

Modul pružnosti z této rovnice pak získáme pomocí fitu modelu na křivku. Problém je že na první pohled je zřejmé, že v rovnici jsou dvě neznámé  $E$  a  $\nu$ . Bohužel není možno jednoduše získat poissonův poměr pro každý měřený materiál, proto se odhaduje hodnota tohoto poměru pro biologické materiály 0,5.

Potřebné vybavení: Pipeta, Petriho miska, AFM, Invertovaný mikroskop, CCD Kamera, PBS, Měřicí cela.

### Návod:

Určení mechanických vlastností modelu buněk pomocí AFM:

## FBMI ČVUT

1. Připravte vzorek
  - Z připravené zkumavky s liposomy přeneste vzorek do petriho misky, a zalijte PBS
  - Petriho misku vložte do měřicí cely a nechte zahřát 40°C
2. Připravte AFM
  - Spusťte na měřícím PC program SPM, a na PC k mikroskopu program QuickPHOTO
  - Nainstalujte cantilever s hrotem do držáku (holderu)
    - Holder vložte od přípravku pro instalaci cantileveru pootočte o 90° tak, aby horní plocha držáku byla vodorovná a držák zaaretujte.
    - Vyjměte pinzetou cantilever a vložte do držáku a zaaretujte pomocí křížového šroubu
    - Postupujte opatrně dle návodu a pokynů vyučujících
    - Dbejte na to, aby vám cantilever nevypadl, ani jste se s ním něčeho nedotkli a eliminovali jeho poškození.
    - Před touto procedurou si proces odzkoušejte na poskytnutém poškozeném cantileveru
3. Vložte holder do měřicí hlavy
  - Připojte všechny kabely
  - Dbejte na opatrnost, aby nedošlo k poškození hrotu
4. Proveďte kalibraci cantileveru
  - Do měřícího prostoru vložte podložní sklíčko
  - Vložte AFM měřicí hlavu
  - Nastavte laserový paprsek tak, aby směřoval na cantilever v oblasti hrotu
    - Postupujte dle manuálu
    - Sledujte paprsek na monitoru PC mikroskopu
  - Nastavte detektor a zrcadlo optické dráhy tak, aby laser směřoval do středu detektoru.
    - Postupujte dle manuálu
    - Sledujte na monitoru měřícího PC
  - Nastavte kontaktní mód a modul force spectroscopy
  - Pomalu přiblížte hrot ke sklíčku
    - Dbejte na to, abyste nenarazili hrotem do sklíčka
    - K finálnímu přiblížení použijte automatické přiblížení
  - Proveďte indent sklíčka
    - Nastavení: Setpoint - 0,5mV, z-length - 5um, constant speed – 1um/s
  - Odjed'te do bezpečné vzdálenosti
  - V SPM software spusťte calibration manager, zjistěte a nastavte parametry sensitivity a spring constant
    - Postupujte dle návodu
5. Vložte vzorek v měřicí cele
6. Sjed'te měřicí hlavou tak aby byla ponořena v PBS

## FBMI ČVUT

7. Upravte nastavení Diody a zrcátka tak aby byl kompenzován lom světla na hladině
8. Změřte vybraný liposom
  - Pomocí mikroskopu změřte průměr Liposomu a vyfoťe
  - Přijed'te cantileverem do těsné blízkosti nad liposom tak aby hrot byl ve středu vzorku (shora)
  - Po automatickém přiblížení změřte vzorek.
    - Nastavení: Setpoint – 10nN, z-length - 5um, constant speed – 1um/s
    - Po změření odjed'te do bezpečné vzdálenosti
    - Data uložte
  - Proceduru opakujte u dalšího liposomu, až budete mít změřeno alespoň 5 vzorků
  - Následně snižujte teplotu po 3 stupních až do 28°C a pokaždé proceduru opakujte na stejných liposomech
9. Sejměte měřící hlavu, měřící celu, holder, cantilever uklid'te vzorek a měřící prostor
10. Naměřené křivky vyhodnoťte
  - K vyhodnocení využijte program JPK Data Processing na měřícím PC
    - Postupujte dle návodu k programu
    - Parametry hrotu najdete na příslušné krabičce
11. Před odchodem vypněte PC a zdroje světla
12. Vypracujte protokol
  - Hypotézu (jak předpokládáte že se budou lišit mechanické vlastnosti liposomů při různých teplotách, a jaký vliv má rozměr liposomu na jeho mechanické vlastnosti)
  - Metodiku (identifikaci a popis vzorků, jaký byl postup přípravy vzorků, jaký byl postup měření, jaký byl zvolen zátěžový režim, jaké přístroje byly použity, jakým způsobem byly zpracovány data)
  - Výsledky (Souhrnné výsledky experimentu)
  - Diskuze a interpretace výsledků (Diskutujte jak se liší výsledky jednotlivých vzorků od sebe, případné ovlivnění výsledků apod.)
  - Závěr (Shrňte celý experiment)