

Úloha: Mapování mechanických vlastností měkkého materiálu – AFM

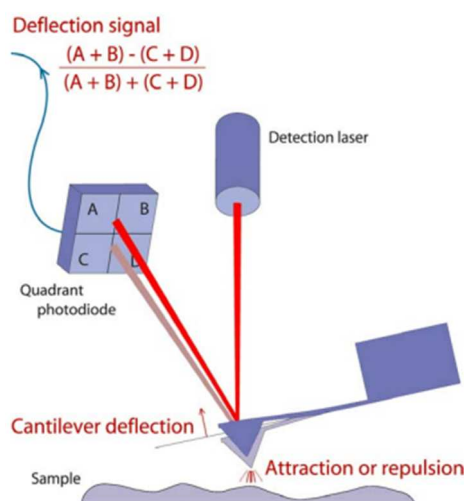
Úkoly:

- 1.) Připravte vzorky jednotlivých materiálů různého složení.
- 2.) Proveďte indentační zkoušky ve čtvercovém paternu 16x16 vzorku pomocí AFM při různých teplotách.
- 3.) Vyhodnoťte jejich modul pružnosti pomocí Hertz-Sneddonova modelu v každém místě indentu.
- 4.) Vytvořte mapu modulů pružnosti a analyzujte ji.
- 5.) Porovnejte Youngův modul pružnosti v závislosti materiálu.
- 6.) Výsledky diskutujte.

Klíčová slova: Modul pružnosti, AFM, Indentační zkouška, Hertz-Sneddon model, modulus mapping, Force mapping.

Úvod:

Mikroskopie atomárních sil byla vynalezena v roce 1986 prof. Binningem 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 fotodioda). Tento princip umožňuje měřit deflexi cantileveru jak v laterálním tak vertikálním směru. Tato metoda nám tak umožňuje měřit topografii měřeného vzorku.



Obrázek 1 Schéma principu AFM - převzato z JPK Instruments NanoWizard® Handbook Version 2.2a

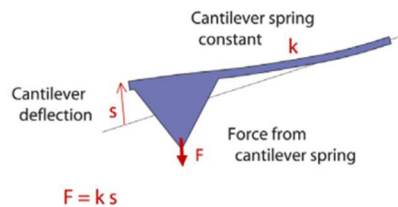
Jednou v současnosti nejvíce využívaných technik, které se používají pro měření mechanických vlastností malých, mikroskopických objektů, jako je buňka, je takzvaná indentační zkouška (dle názvosloví firmy JPK Force spectroscopy). Díky základnímu principu AFM lze takovou zkoušku provádět s jeho využitím. Základem jakéhokoliv zjišťování mechanických vlastností je sledování odezvy materiálu na jeho deformaci či zatížení. V případě indentační zkoušky dochází ke vtlačování objektu

FBMI ČVUT

(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.

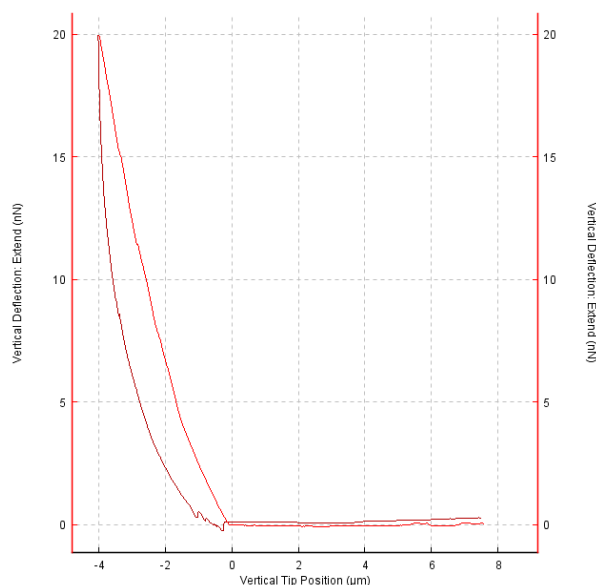
$$F = k \cdot s$$

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



Obrázek 2 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.



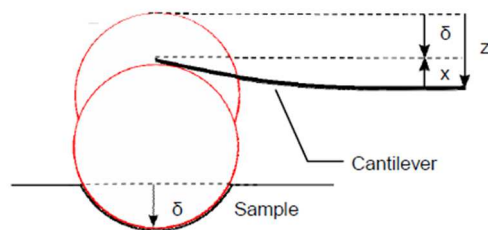
Obrázek 3 Příklad naměřené závislosti Síla - hloubka indentace

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.

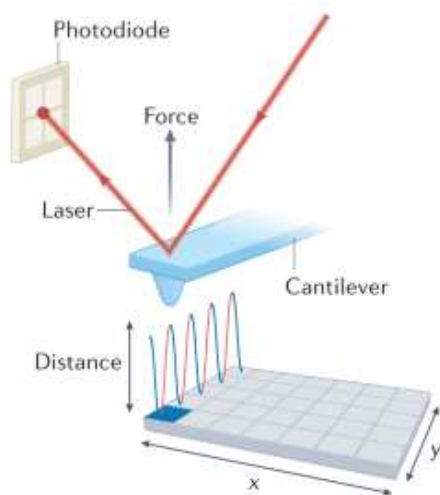
FBMI ČVUT



Obrázek 4 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 ν . Bohužel není možno jednoduše získat poissonův poměr pro každý měřený materiál, proto se odhaduje hodnota tohoto poměru pro biologické materiály 0,5.

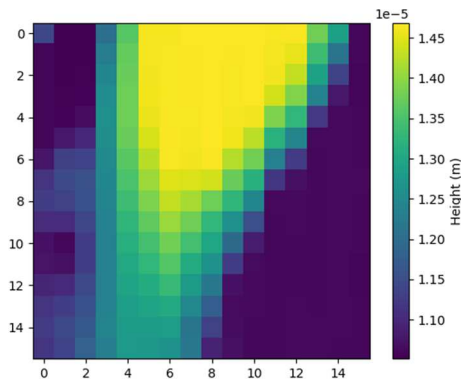
Modulus mapping, nebo také force mapping je metoda v AFM, která slouží k vytváření mapy mechanických vlastností materiálu. Na rozdíl od force spectroscopy, která zaznamenává silovou křivku pouze v jednom bodě, force mapping umožňuje vytvářet mapy interakcí přes větší plochu vzorku. Automaticky provede sadu indentů podle patternu, který zvolíte (čtvercového, či obdélníkového).



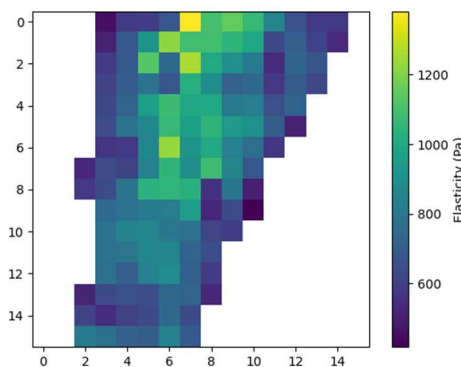
Obrázek 5 Schéma Force mapping módu - převzato z (VILJOEN, Albertus, Marion MATHELIÉ-GUINLET, Ankita RAY et al. Force spectroscopy of single cells using atomic force microscopy. Nature Reviews Methods Primers. 2021, 1(1). ISSN 2662-8449. Dostupné z: doi:10.1038/s43586-021-00062-x)

Vyhodnocení takovéto mapy je shodné s vyhodnocením samotné indentace popsané výše, jen s tím rozdílem že je aplikováno opakovaně na každou křivku mapy. Výsledkem analýzy pomocí force mapping je pak rozložení mechanických vlastností materiálu, jako například modulu pružnosti, tuhost, adheze, nebo také topografie materiálu.

FBMI ČVUT



Obrázek 6 Topografie poloviny buňky při použití force mapping - Převzato z diplomové práce Staňková R.: Analýza mechanických vlastností buněk, FBMI ČVUT, 2023



Obrázek 7 Mapa modulů pružnosti stejné buňky jako na obrázku 6. - Převzato z diplomové práce Staňková R.: Analýza mechanických vlastností buněk, FBMI ČVUT, 2023

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

Návod:

Určení mechanických vlastností modelu buněk pomocí AFM:

1. Připravte vzorek
 - Vzorek materiálu vložte do Petriho misky a zalijte PBS
 - Petriho misku vložte do měřící cely a nechte zahřát na 25°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 měřící hlavy

FBMI ČVUT

- Připojte všechny kabely
 - Dbejte na opatrnost, aby nedošlo k poškození hrotu
4. Proved'te kalibraci cantileveru
- Do měřicího prostoru vložte podložní sklíčko
 - Vložte AFM měřící 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 měřicího 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
 - Proved'te indent sklíčka
 - Nastavení: Setpoint - 0,5mV, z-length - 5μm, constant speed – 1μm/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 do měřicího prostoru
6. Sjed'te měřící hlavou tak aby byla ponořena v PBS
7. Upravte nastavení Diody a zrcátka tak aby byl kompenzován lom světla na hladině
8. Změřte vybraný vybraný materiál
- Přijed'te cantileverem do blízkosti vzorku
 - V tomto případě neuvidíte cantilever na mikroskopu, neboť bude zastíněn, proto se budete přibližovat naslepo! Dbejte proto zvýšené opatrnosti
 - Pozorujte přibližování hrotu z boku a přibližujte se hrotem po kratších krocích,
 - Raději nechte automatické přiblížení na delší vzdálenost
 - Po automatickém přiblížení změřte vzorek.
 - Změňte nastavení mdulu na Force mapping,
 - Nastavení: Setpoint – 10nN, z-length - 5μm, constant speed – 1μm/sGrid 16x16, měřený prostor 17x17μm
 - Po změření odjed'te do bezpečné vzdálenosti
 - Data uložte
 - Proceduru opakujte u dalšího Vzorku
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
 - Otevřete křivky pomocí „Open Batch of force spectroscopy curves“
 - Postupně vyhodnote všechny křivky.
 - 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 vzorků různých materiálů, zda předpokládáte homogenní chování mechanických vlastností jednotlivých vzorků apod.)
- 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, včetně map modulů pružnosti pro jednotlivé vzorky)
- Diskuze a interpretace výsledků (Diskutujte jak se liší výsledky jednotlivých vzorků od sebe, případné ovlivnění výsledků apod.)
- Závěr (Shrňte celý experiment)